(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202490408 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.03

(22) Дата подачи заявки
2022.08.11

(51) Int. Cl. ***A61K 35/17*** (2015.01)
A61K 35/30 (2015.01)
A61K 35/36 (2015.01)
A61K 35/39 (2015.01)
A61K 35/44 (2015.01)
A61K 35/55 (2015.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C12N 5/079 (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(54) ИНДУЦИБИЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ГИПОИММУНОГЕННЫХ КЛЕТКАХ

(31) **63/232,141; 63/270,454**
(32) **2021.08.11; 2021.10.21**
(33) **US**
(86) **PCT/US2022/074837**
(87) **WO 2023/019203 2023.02.16**

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

(72) Изобретатель:
Даудл Уилльям, Там Элеоноре, Рамос-Зейес Ребека, Шрепфер Соня (US)

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

(57) В данном документе описаны сконструированные клетки и/или гипоиммуногенные клетки, включая сконструированные клетки и/или гипоиммуногенные стволовые клетки, сконструированные клетки и/или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из них, и/или сконструированные клетки и/или гипоиммуногенные CAR-T-клетки (первичные или дифференцированные из сконструированных и/или гипоиммуногенных стволовых клеток) и связанные способы их применения и получения, включающие регулируемую сниженную экспрессию одной или более молекул лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и регулируемую сверхэкспрессию CD47. В данном документе представлены клетки, дополнительно демонстрирующие сниженную экспрессию Т-клеточных рецепторов.

202490408 A1

202490408 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580485EA/081

ИНДУЦИБИЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ГИПОИММУНОГЕННЫХ КЛЕТКАХ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 63/232141, поданной 11 августа 2021 г., и предварительной заявки США № 63/270454, поданной 21 октября 2021 г., содержание каждой из которых включено в данный документ в полном объеме.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Готовые терапевтические клетки могут иметь преимущества перед стратегиями на основе аутологичных клеток, включая простоту изготовления, контроль качества и предотвращение контаминации злокачественными клетками и дисфункции Т-клеток. Однако интенсивный иммунный ответ «хозяин против трансплантата» против гистонесовместимых клеток предотвращает размножение и персистенцию аллогенных клеток и снижает эффективность данного подхода.

[0003] Существует достаточное количество данных, полученных как для животных моделей, так и для пациентов-людей, подтверждающих, что трансплантация гипоиммуногенных клеток является научно реализуемым и клинически перспективным подходом к лечению многочисленных расстройств, патологических состояний и заболеваний.

[0004] Остается потребность в новых подходах, композициях и способах получения клеточных терапевтических средств, которые могут избегать выявления иммунной системой реципиента.

[0005] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0006] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка, содержащая регулируемые модификации, которые увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем.

[0007] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки (PSC), индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC), мезенхимальной стволовой клетки (MSC), гемопоэтической стволовой клетки (HSC), эмбриональной стволовой клетки (ESC), островковой клетки поджелудочной железы, островковой бета-клетки, иммунной клетки, В-клетки, Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), естественной Т-клетки-киллера (NKT), макрофагальной клетки, иммунопривилегированной клетки, зрительной клетки, клетки пигментированного эпителия сетчатки (RPE), гепатоцита,

клетки щитовидной железы, эндотелиальной клетки, клетки кожи, глиальной клетки-предшественника, нейрональной клетки, мышечной клетки, сердечной клетки и клетки крови.

[0008] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная островковая клетка поджелудочной железы, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0009] В некоторых вариантах осуществления островковая клетка поджелудочной железы представляет собой островковую бета-клетку.

[0010] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная эндотелиальная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0011] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка сердечной мышцы, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0012] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная гладкомышечная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0013] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка скелетных мышц, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0014] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен сконструированный гепатоцит, содержащий модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0015] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная глиальная клетка-предшественник, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом

сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0016] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен сконструированный дофаминергический нейрон, содержащий модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0017] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная иммуннопривилегированная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0018] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка пигментного эпителия сетчатки, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0019] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка щитовидной железы, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0020] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная иммунная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0021] В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная клетка содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[0022] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная Т-клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0023] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[0024] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная NK-клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii)

увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0025] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[0026] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная макрофагальная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[0027] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно одинаковое количество CD47 по сравнению с контролем.

[0028] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммуннопривилегированную клетку.

[0029] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

[0030] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

[0031] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

[0032] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

[0033] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[0034] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[0035] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз или примерно в 5,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[0036] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[0037] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[0038] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по

меньшей мере примерно в 5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[0039] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 5,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[0040] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 16 раз, примерно в 17 раз , примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[0041] В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

[0042] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно, при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

[0043] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

[0044] В некоторых вариантах осуществления эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

[0045] В некоторых вариантах осуществления исходный уровень представляет собой изотипический контроль, при этом необязательно уровень CD47 определяют с помощью анализа на основе антител.

[0046] В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

[0047] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой островковую бета-клетку, которая экспрессирует по меньшей мере около 200 000, 250 000, 300 000, 350 000 или 400 000 молекул CD47 на клетку.

[0048] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой клетку пигментного эпителия сетчатки, которая экспрессирует по меньшей мере примерно в 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 12 раз, 14 раз, 16 раз, 18 раз, 20 раз или более высокое увеличение экспрессии CD47 по сравнению с исходным уровнем.

[0049] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой Т-клетку, которая экспрессирует по меньшей мере примерно 180 000, 190 000, 200 000, 210 000, 220 000, 230 000, 240 000, 250 000, 260 000, 270 000, 280 000, 290 000, 300 000, 350 000, 400 000, 450 000, 500 000, 550 000, 600 000, 650 000 или 700 000 молекул CD47 на клетку.

[0050] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одного или более антигенов человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и/или ГКГС класса II

и ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует толерогенный фактор на пороговом или более высоком уровне.

[0051] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки (PSC), индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC), мезенхимальной стволовой клетки (MSC), гемопоэтической стволовой клетки (HSC), эмбриональной стволовой клетки (ESC), островковой клетки поджелудочной железы, островковой бета-клетки, иммунной клетки, B-клетки, T-клетки, естественной клетки-киллера (NK), естественной T-клетки-киллера (NKT), макрофагальной клетки, иммунопривилегированной клетки, зрительной клетки, клетки пигментированного эпителия сетчатки (RPE), гепатоцита, клетки щитовидной железы, эндотелиальной клетки, клетки кожи, глиальной клетки-предшественника, нейрональной клетки, мышечной клетки, сердечной клетки и клетки крови.

[0052] В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

[0053] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно, при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

[0054] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

[0055] В некоторых вариантах осуществления эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

[0056] В некоторых вариантах осуществления исходный уровень представляет собой изотипический контроль, необязательно при этом количество толерогенного фактора определяют с помощью анализа на основе антител.

[0057] В некоторых вариантах осуществления количество толерогенного фактора определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

[0058] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно одинаковое количество толерогенного фактора по сравнению с контролем.

[0059] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммуннопривилегированную клетку.

[0060] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество толерогенного фактора по сравнению с контролем.

[0061] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество толерогенного фактора по сравнению с контролем.

[0062] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество толерогенного фактора по сравнению с контролем.

[0063] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество толерогенного фактора по сравнению с контролем.

[0064] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

[0065] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

[0066] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень по меньшей мере примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз или примерно в 5,5 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

[0067] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

[0068] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4,5 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

[0069] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 5 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

[0070] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 5,5 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

[0071] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 16 раз, примерно в 17 раз , примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

[0072] В некоторых вариантах осуществления модификации снижают экспрессию: (a) молекулы ГКГС класса I; (b) молекулы ГКГС класса II; или (c) молекулы ГКГС класса I и молекулы ГКГС класса II.

[0073] В некоторых вариантах осуществления модификации снижают экспрессию одного или более из B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B и/или NFY-C по сравнению с контролем.

[0074] В некоторых вариантах осуществления клетка не экспрессирует молекулу

ГКГС класса I и/или молекулу ГКГС класса II.

[0075] В некоторых вариантах осуществления клетка не экспрессирует один или более из B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B и/или NFY-C по сравнению с контролем.

[0076] В некоторых вариантах осуществления модификации включают нокаут одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B и/или NFY-C.

[0077] В некоторых вариантах осуществления модификации снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M, TAP1, NLRC5 и/или CIITA.

[0078] В некоторых вариантах осуществления модификации включают нокаут одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M, TAP1, NLRC5 и/или CIITA.

[0079] В некоторых вариантах осуществления нокаут происходит в обоих аллелях.

[0080] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит одну или более модификаций, которые снижают экспрессию CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, белка, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с контролем.

[0081] В некоторых вариантах осуществления белок, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, выбран из группы, состоящей из белка, взаимодействующего с тиоредоксином (TXNIP), PKR-подобной ЭПР-киназы (PERK), инозитол-требующего фермента 1α (IRE1α) и DJ-1 (PARK7).

[0082] В некоторых вариантах осуществления модификации включают нокаут одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, белка, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

[0083] В некоторых вариантах осуществления нокаут происходит в обоих аллелях.

[0084] В некоторых вариантах осуществления модификации снижают экспрессию B2M.

[0085] В некоторых вариантах осуществления модификации снижают экспрессию CIITA.

[0086] В некоторых вариантах осуществления модификации снижают экспрессию B2M и CIITA.

[0087] В некоторых вариантах осуществления модификации включают нокаут B2M и/или CIITA.

[0088] В некоторых вариантах осуществления нокаут B2M и/или CIITA происходит в обоих аллелях.

[0089] В некоторых вариантах осуществления модификации снижают экспрессию

лиганда NK-клетки, необязательно MIC-A и/или MIC-B.

[0090] В некоторых вариантах осуществления модификации включают нокаут MIC-A и/или MIC-B.

[0091] В некоторых вариантах осуществления нокаут MIC-A и/или MIC-B происходит в обоих аллелях.

[0092] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит модификацию, которая снижает экспрессию одного или более генов Y-хромосомы по сравнению с контролем.

[0093] В некоторых вариантах осуществления один или более генов Y-хромосомы выбраны из группы, состоящей из Y-сцепленного протокадгерина-11 и Y-сцепленного нейролигина-4.

[0094] В некоторых вариантах осуществления модификации снижают экспрессию TXNIP.

[0095] В некоторых вариантах осуществления модификации включают нокаут TXNIP.

[0096] В некоторых вариантах осуществления нокаут TXNIP происходит в обоих аллелях.

[0097] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит модификации, которые снижают экспрессию B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, белка, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

[0098] В некоторых вариантах осуществления клетка не экспрессирует B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, белка, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

[0099] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит модификации, которые снижают экспрессию B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с контролем.

[00100] В некоторых вариантах осуществления клетка не экспрессирует B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

[00101] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит дополнительные модификации, которые снижают экспрессию одного или более толерогенных факторов.

[00102] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из A20/TNFAIP3, C1-ингибитора, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-

G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9.

[00103] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из A20/TNFAIP3, C1-ингибитора, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9.

[00104] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат CD47.

[00105] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат HLA-E.

[00106] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат CD24.

[00107] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат PD-L1.

[00108] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат CD46.

[00109] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат CD55.

[00110] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат CD59.

[00111] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат CR1.

[00112] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат MANF.

[00113] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат A20/TNFAIP3.

[00114] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов включают HLA-E и CD47.

[00115] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат один или более из CD24, CD47 и/или PDL1.

[00116] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат один или более из HLA-E, CD24, CD47 и/или PDL1.

[00117] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат один или более из CD46, CD55, CD59 и/или CR1.

[00118] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат один или более из HLA-E, CD46, CD55, CD59 и/или CR1.

[00119] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов содержат один или более из HLA-E, CD24, CD47, PDL1, CD46, CD55, CD59 и/или CR1.

[00120] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных

факторов включают HLA-E и PDL1.

[00121] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов включают один или более из HLA-E, PDL1 и/или A20/TNFAIP.

[00122] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов включают один или более из HLA-E, PDL1 и/или MANF.

[00123] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов включают один или более из HLA-E, PDL1, A20/TNFAIP и/или MANF.

[00124] В некоторых вариантах осуществления модификации: (a) снижают экспрессию молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II; (b) снижают экспрессию MIC-A и/или MIC-B; (c) увеличивают экспрессию CD47 и, необязательно, CD24 и PD-L1; и (d) увеличивают экспрессию CD46, CD55, CD59 и CR1.

[00125] В некоторых вариантах осуществления модификация: (a) снижает экспрессию молекулы ГКГС класса I; (b) снижает экспрессию MIC-A и/или MIC-B; (c) снижает экспрессию TXNIP; и (d) увеличивает экспрессию PD-L1 и HLA-E.

[00126] В некоторых вариантах осуществления модификации дополнительно увеличивают экспрессию A20/TNFAIP3 и MANF.

[00127] В некоторых вариантах осуществления клетка получена из клетки человека или клетки животного.

[00128] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой дифференцированную клетку, полученную из стволовой клетки или ее потомства.

[00129] В некоторых вариантах осуществления стволовую клетку выбирают из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC), мезенхимальной стволовой клетки (MSC), гемопоэтической стволовой клетки (HSC) и эмбриональной стволовой клетки (ESC).

[00130] В некоторых вариантах осуществления клетка получена из первичной клетки или ее потомства.

[00131] В некоторых вариантах осуществления клетка избегает цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту.

[00132] В некоторых вариантах осуществления клетка защищена от клеточного лизиса зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту.

[00133] В некоторых вариантах осуществления клетка избегает поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту.

[00134] В некоторых вариантах осуществления клетка не индуцирует врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[00135] В некоторых вариантах осуществления клетка не индуцирует иммунный ответ на основе антител на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[00136] В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций являются регулируемыми модификациями.

[00137] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка, содержащая одну или более регулируемых модификаций для

изменения экспрессии одной или более мишеней в сконструированной клетке по сравнению с контролем, необязательно, при этом одна или более регулируемых модификаций увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем.

[00138] В некоторых вариантах осуществления одна или более регулируемых модификаций содержат условный или индуцируемый компонент на основе РНК для i) увеличения или ii) снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по сравнению с контролем.

[00139] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый компонент на основе РНК выбран из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi).

[00140] В некоторых вариантах осуществления условный компонент на основе РНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[00141] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый компонент на основе РНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[00142] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый компонент на основе ДНК для i) увеличения или ii) снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по сравнению с контролем.

[00143] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый компонент на основе ДНК выбран из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз, условного или индуцируемого прайм-редактирования, условного или индуцируемое редактирование PASTE и условных или индуцируемых мегануклеаз.

[00144] В некоторых вариантах осуществления условный компонент на основе ДНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[00145] В некоторых вариантах осуществления условный компонент на основе ДНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[00146] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый белковый компонент для i) увеличения или ii) снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по сравнению с контролем.

[00147] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый белковый компонент представляет собой условный или индуцируемый компонент дегрон.

[00148] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый компонент дегрон выбран из группы, состоящей из индуцированной лигандом деградации (LID) с использованием метки SMASH, LID с использованием Shield-1, LID с использованием ауксина, LID с использованием рапамицина, условных или индуцируемых пептидных дегронов (*например*, дегронов на основе IKZF3) и условных или индуцируемых химер, нацеленных на протеолиз (PROTAC).

[00149] В некоторых вариантах осуществления условный белковый компонент находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[00150] В некоторых вариантах осуществления условный белковый компонент находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[00151] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит условный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов или CD47.

[00152] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий условный промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более толерогенных факторов или CD47.

[00153] В некоторых вариантах осуществления условный промотор выбран из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[00154] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов или CD47.

[00155] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий индуцируемый промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более толерогенных факторов или CD47.

[00156] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[00157] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100%

идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129.

[00158] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:130.

[00159] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые увеличивают экспрессию одного или более из A20/TNFAIP3, C1-ингибитора, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9 по сравнению с контролем.

[00160] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество ингибитора A20/TNFAIP3, C1, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9 по сравнению с контролем.

[00161] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество ингибитора A20/TNFAIP3, C1, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9 по сравнению с контролем.

[00162] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество A20/TNFAIP3, ингибитора C1, CCL21, CCL22, CD16, рецептора Fc CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелая цепь HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9 по сравнению с контролем.

[00163] В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

[00164] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно, при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

[00165] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

[00166] В некоторых вариантах осуществления эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

[00167] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов или CD47 кодируются первым экзогенным полинуклеотидом.

[00168] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[00169] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вставлен в первый и/или второй специфический локус по меньшей мере одного аллеля клетки.

[00170] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй специфический локус выбран из группы, состоящей из безопасного локуса, целевого локуса, локуса *RHD*, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*.

[00171] В некоторых вариантах осуществления безопасный локус выбран из группы, состоящей из локуса *CCR5*, локуса *PPP1R12C*, локуса *Rosa*, локуса гена *ROSA26* и локуса *CLYBL*.

[00172] В некоторых вариантах осуществления целевой локус выбран из группы, состоящей из локуса *CXCR4*, локуса *ALB*, локуса *SHS231*, локуса *F3* (*CD142*), локуса *MICA*, локуса *MICB*, локуса *LRP1* (*CD91*), локуса *HMGB1*, локуса *ABO*, локуса *FUT1* и локуса *KDM5D*.

[00173] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в клетку с использованием лентивирусного вектора.

[00174] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вносят в клетку, используя фузоген-опосредованную доставку или систему на основе транспозазы, выбранную из группы, состоящей из кондициональных или индуцибельных транспозаз, кондициональных или индуцибельных транспозонов PiggyBac, кондициональных или индуцибельных транспозонов Sleeping Beauty (SB11), кондициональных или индуцибельных транспозонов Mos1 и кондициональных или индуцибельных транспозонов Tol2.

[00175] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена островковая клетка поджелудочной железы, имеющая пониженную экспрессию HLA ГКГС класса I и/или пониженную экспрессию HLA ГКГС класса II и которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

[00176] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную островковую бета-клетку, которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00177] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с контролем, или которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00178] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%

большее количество CD47 по сравнению с контролем, или которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00179] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно на 100%, примерно 200%, примерно 300%, примерно 400%, примерно 500%, примерно 600%, примерно 700%, примерно 800%, примерно 900% или примерно 1000% выше по сравнению с контролем.

[00180] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00181] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную островковую клетку поджелудочной железы, которая экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 1000% или по меньшей мере примерно на 2000% выше по сравнению с контролем.

[00182] В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

[00183] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно, при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

[00184] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

[00185] В некоторых вариантах осуществления эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

[00186] В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

[00187] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная Т-клетка, имеющая сниженную экспрессию HLA ГКГС класса I и/или сниженную экспрессию HLA ГКГС класса II и которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с контролем, которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемого в контроле, или которая экспрессирует по меньшей мере примерно 170 000 молекул CD47.

[00188] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, которая экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 300% или по меньшей мере примерно на 400% выше по сравнению с контролем.

[00189] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-

клетку, которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00190] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная Т-клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно 170 000 молекул CD47.

[00191] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка экспрессирует по меньшей мере примерно 180 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 190 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 200 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 210 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 220 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 230 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 240 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 250 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 260 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 270 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 280 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 290 000 молекул CD47 или по меньшей мере примерно 300 000 молекул CD47.

[00192] В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

[00193] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно, при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

[00194] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

[00195] В некоторых вариантах осуществления эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

[00196] В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

[00197] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит 1, 2, 3, 4 или 5 копий экзогенного полинуклеотида, кодирующего CD47.

[00198] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит конститутивный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47.

[00199] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, доставляется в клетку посредством опосредованной вирусом интеграции.

[00200] В некоторых вариантах осуществления опосредованная вирусом интеграция является опосредованной лентивирусом.

[00201] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрируется в сайт клеточного генома посредством HDR.

[00202] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрирован в локус гена TRAC, локус гена TRBC или их комбинацию.

[00203] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрирован по меньшей мере в один аллель TRAC, по меньшей мере в один аллель TRBC или их комбинацию.

[00204] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрирован по меньшей мере в два аллеля TRAC, по меньшей мере в два аллеля TRBC или их комбинацию.

[00205] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит экзогенный полинуклеотид, содержащий полипептид CD47, имеющий по меньшей мере примерно 80% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 129, по меньшей мере примерно 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:129, по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:129, по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:129, по меньшей мере примерно 98% идентичности последовательности с аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129, по меньшей мере примерно на 99% идентичную последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129.

[00206] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит экзогенный полинуклеотид, содержащий полипептид CD47, имеющий по меньшей мере примерно 80% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130, по меньшей мере примерно 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:130, по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:130, по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:130, по меньшей мере примерно 98% идентичности последовательности с аминокислотную последовательность SEQ ID NO:130, по меньшей мере примерно на 99% идентичную последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:130, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:130.

[00207] В некоторых вариантах осуществления клетка имеет сниженную экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с контролем.

[00208] В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II вызвано конститутивными модификациями одного или более генов, кодирующих HLA ГКГС класса I и/или класса II.

[00209] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более

нокаутов мишеней, выбранных из группы, состоящей из HLA ГКГС класса I и ГКГС класса II.

[00210] В некоторых вариантах осуществления один или более нокаутов являются конститутивными нокаутами.

[00211] В некоторых вариантах осуществления клетка имеет сниженную экспрессию одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M и CIITA, по сравнению с контролем.

[00212] В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии B2M и/или CIITA вызвано конститутивными модификациями гена B2M и/или гена CIITA.

[00213] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более нокаутов мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M и CIITA.

[00214] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нокауты обоих аллелей B2M и/или обоих аллелей CIITA.

[00215] В некоторых вариантах осуществления один или более нокаутов являются конститутивными нокаутами.

[00216] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более дополнительных толерогенных факторов.

[00217] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CI-ингибитора и IL-35.

[00218] В некоторых вариантах осуществления клетка имеет сниженную экспрессию B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с контролем.

[00219] В некоторых вариантах осуществления клетка не экспрессирует B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

[00220] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.

[00221] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC), гемопоэтическую стволовую клетку (HSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC).

[00222] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой дифференцированную клетку, полученную из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[00223] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из островковой клетки поджелудочной железы, Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), клетки CAR-M, эндотелиальной клетки, клетки сердечной мышцы, гладкомышечной клетки, клетки скелетных мышц, гепатоцита,

глиальной клетки-предшественника, дофаминергического нейрона, клетки пигментного эпителия сетчатки и клетки щитовидной железы.

[00224] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную клетку или ее потомство.

[00225] В некоторых вариантах осуществления первичная клетка или ее потомство представляет собой Т-клетку или NK-клетку.

[00226] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка дополнительно характеризуется сниженной экспрессией Т-клеточного рецептора (TCR)-альфа и/или TCR-бета.

[00227] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа и/или TCR-бета.

[00228] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[00229] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с контролем и сниженную экспрессию одного или более антигенов человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и ГКГС класса II по сравнению с контролем.

[00230] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 2 раза, примерно в 3 раза, примерно в 4 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в клетке дикого типа или контрольной клетке, которая не имеет экспрессии CD47 или имеет низкую экспрессию CD47, а также сниженную экспрессию одного или более антигенов человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и ГКГС класса II по сравнению с контрольной клеткой.

[00231] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 4 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в клетке дикого типа или контрольной клетке того же типа клеток, которая не имеет экспрессии CD47 или имеет низкую экспрессию CD47.

[00232] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой островковую клетку поджелудочной железы, Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK), клетку CAR-M, эндотелиальную клетку, клетку сердечной мышцы, гладкомышечную клетку, клетку скелетной мышцы, гепатоцит, глиальную клетку-предшественника, дофаминергический нейрон, клетку пигментного эпителия сетчатки или клетку щитовидной железы.

[00233] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка или ее потомство избегают цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту, защищены от лизиса клеток зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту, избегают лизиса клеток зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту, избегают поглощения

макрофагами при введении пациенту-реципиенту, не индуцируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту и/или не индуцируют иммунный ответ на основе антител на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[00234] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологичную клетку.

[00235] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00236] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию сконструированных клеток, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемую добавку, носитель, разбавитель или эксципиент.

[00237] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой островковую бета-клетку, а фармацевтическая композиция дополнительно содержит одну или более дополнительных островковых клеток поджелудочной железы.

[00238] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту клинически эффективного количества или терапевтически эффективного количества сконструированных клеток, описанных в данном документе.

[00239] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту популяции клеток, содержащей сконструированные клетки, описанные в данном документе.

[00240] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту популяции клеток, содержащей дифференцированные клетки, описанные в данном документе.

[00241] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[00242] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из рака, генетического нарушения, хронического инфекционного заболевания, аутоиммунного нарушения, неврологического нарушения, сердечного нарушения (выбранного из группы, состоящей из детской кардиомиопатии, возрастной кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, гипертрофической кардиомиопатии, рестриктивной кардиомиопатии, хронической ишемической кардиомиопатии, перипартальной кардиомиопатии, воспалительной кардиомиопатии, идиопатической

кардиомиопатии, другой кардиомиопатии, ишемического реперфузионного поражения миокарда, желудочковой дисфункции, сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, терминальной стадии сердечной недостаточности, атеросклероза, ишемии, гипертонии, рестеноза, стенокардии, ревматической болезни сердца, воспаления артерий, сердечно-сосудистого заболевания, инфаркта миокарда, ишемии миокарда, инфаркта миокарда, ишемии сердца, поражения сердца, ишемии миокарда, сосудистого заболевания, приобретенного порока сердца, врожденного порока сердца, ишемической болезни сердца, дисфункций проводящей системы, дисфункций коронарных артерий, легочной гипертензии, сердечных аритмий, мышечной дистрофии, аномалий мышечной массы, мышечной дегенерации, миокардита, инфекционного миокардита, мышечных аномалий, вызванных лекарственными средствами или токсинами, миокардита, обусловленного реакцией гиперчувствительности, митральной недостаточности, аутоиммунного эндокардита, первичных аритмических заболеваний, сердечных каналеллопатий, синдромов удлиненного интервала QT, синдромов короткого интервала QT, синдрома Бругада, катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии, синдрома Джервелла и Ланге-Нильсена, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, кардиомиопатии, врожденного порока сердца, заболевания или дисфункции сердечного клапана, эндокардита, ревматической лихорадки, пролапса митрального клапана, инфекционного эндокардита, гипертрофической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, миокардита, кардиомегалии, митральной недостаточности), неврологического нарушения (выбранного из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, болезни Пелизеуса-Мерцбахера, других нейродегенеративных заболеваний или состояний, синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), ишемии, рассеянного склероза, черепно-мозговой травмы, эпилепсии, каталепсии, энцефалита, менингита, мигрени, инсульта, транзиторной ишемической атаки, субарахноидального кровоизлияния, субдурального кровоизлияния, гематомы, экстрадурального кровоизлияния, травмы спинного мозга, шейного спондилеза, синдрома запястного канала, опухолей головного или спинного мозга, периферической нейропатии, синдрома Гийена - Барре, невралгии, бокового амиотрофического склероза (БАС), тауопатий, болезни Пика, прогрессирующего супрануклеарного паралича, кортикобазальной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, паралича Белла, церебрального паралича, болезни двигательных нейронов, нейрофиброматоза, энцефалита, менингита, синдрома Туретта, шизофрении, психоза, депрессии и других нервно-психических расстройств), сосудистой деменции, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, рассеянного склероза, других нейродегенеративных заболеваний или состояний, синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), синдрома Туретта (СТ), шизофрении, психоза, депрессии, другого нервно-психического расстройства, нейрокогнитивного нарушения, связанного с ВИЧ-1, черепно-мозговой травмы, инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС),

кровоизлияния в мозг, эпилептического припадка, повреждения спинного мозга, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен (AGD), бокового амиотрофического склероза (БАС), кортико-базальной дегенерации (CBD), паркинсонизма, связанного с хромосомой 17 (FTDP-17), множественной системной атрофии (MSA), болезни Паркинсона/диффузной болезни с тельцами Леви (PD/DLBD) или болезни Альцгеймера, атеросклероза, атерогенеза, артериального тромбоза, венозного тромбоза, тромбоцитарных микроангиопатий, транссудации, диффузного внутрисосудистого свертывания крови, диабета, инсулинорезистентности, сердечно-сосудистого заболевания, сосудистых заболеваний, заболеваний периферических сосудов, ишемической болезни, инфаркта миокарда, застойной сердечной недостаточности, обструктивной болезни периферических сосудов, инсульта, реперфузионного поражения, ишемии конечностей невропатии (например, периферической невропатии или диабетической невропатии), органной недостаточности (например, печеночная недостаточность, почечная недостаточность и т.п.), диабета, ревматоидного артрита, остеопороза, поражения сосудов, поражения тканей, гипертонии, стенокардии и инфаркта миокарда вследствие ишемической болезни сердца, почечной сосудистой гипертензии, почечной недостаточности вследствие стеноза почечных артерий, хромоты нижних конечностей, транзиторной ишемической атаки или инсульта, инфаркта миокарда и ишемии конечностей, восстановления ишемизированных тканей, формирования кровеносных сосудов и клапанов сердца, проектирования искусственных сосудов, восстановления поврежденных сосудов и стимуляции образования кровеносных сосудов в сконструированных тканях (например, перед трансплантацией), восстановления или замены тканей, нуждающихся в сосудистых клетках или васкуляризации, сердечной ткани, ткани печени, ткани поджелудочной железы, почечной ткани, мышечной ткани, нервной ткани, костной ткани и т. д. (это может быть ткань, поврежденная и характеризующаяся избыточной гибелью клеток, ткань с риском повреждения или искусственно созданная ткань), ишемической болезни сердца, цереброваскулярного заболевания, стеноза аорты, аневризмы аорты, заболевания периферических артерий, атеросклероза, варикозного расширения вен, ангиопатии, инфаркта области сердца с недостаточной коронарной перфузией, незаживающих ран, диабетических или недиабетических язв или любого другого заболевания или нарушения, при которых желательно вызвать образование кровеносных сосудов, улучшая протезные имплантаты (например, сосуды, изготовленные из синтетических материалов, таких как дакрон и гортекс), которые используются в сосудистой реконструктивной хирургии, сосудистом заболевании, выбранном из группы, состоящей из повреждений сосудов, сердечно-сосудистого заболевания, сосудистых заболеваний, заболеваний периферических сосудов, ишемической болезни, инфаркта миокарда, застойной сердечной недостаточности, обструктивного заболевания периферических сосудов, гипертонии, ишемического поражения тканей, реперфузионного поражения, ишемии конечностей, инсульта, невропатии (например, периферическая невропатия или диабетическая невропатия),

органная недостаточность (например, печеночная недостаточность, почечная недостаточность и т.п.), диабета, ревматоидного артрита, остеопороза, цереброваскулярного заболевания, гипертонии, стенокардии и инфаркта миокарда вследствие ишемической болезни сердца, почечной сосудистой гипертензии, почечной недостаточности вследствие стеноза почечной артерии, хромоты нижних конечностей, других сосудистых состояний или заболеваний, аутоиммунного тиреоидита, зоба, гиперпаратиреоза, гипопаратиреоза (врожденного или аутоиммунного), тиреоидита, тиреоидита Хашимото, послеродового тиреоидита, подострого тиреоидита, ятрогенного гипотиреоза, болезни Грейвса и тиреоидной офтальмопатии, инфекционного гепатита (A, B и C), аутоиммунного гепатита, первичного билиарного холангита, первичного склерозирующего холангита, заболевания неалкогольной жировой дистрофии печени, цирроза печени, гемохроматоза, гипероксалурии, дефицита альфа-1-антитрипсина, печеночной недостаточности, болезни Вильсона, печеночной энцефалопатии, желтухи, острых печеночных порфирий, синдрома Алажиля, билиарной атрезии, синдрома Бадда-Киари, гипербилирубинемий, синдрома Криглера-Найяра, синдрома Жильбера-Мейленграхта, синдрома Дубина-Джонсона, синдрома Ротора, галактоземии, болезни накопления гликогена 1-го типа, гепаторенального синдрома, внутрипеченочного холестаза беременных, прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза, синдрома Рея, дефицита лизосомальной кислой липазы, алкоголь-ассоциированного панкреатита, желчнокаменного панкреатита, сахарного диабета (типа 1 и типа 2), преддиабета, гестационного диабета, сахарного диабета, экзокринной недостаточности поджелудочной железы, острого панкреатита, хронического панкреатита, наследственного панкреатита, гиперинсулинемии, кист поджелудочной железы, синдрома Золлингера-Эллисона, синдрома Швахмана-Даймонда, наследственного гемохроматоза, талассемии, отложения железа в поджелудочной железе, муковисцидоза, разделенной поджелудочной железы и резекции поджелудочной железы, макулярной дегенерации или пациента с поврежденными клетками ПЭС, возрастной макулярной дегенерации (ВМД), ранней ВМД, промежуточной ВМД, поздней ВМД, неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, сухой макулярной дегенерации (сухая возрастная дегенерация желтого пятна), влажной макулярной дегенерации (влажная возрастная дегенерация желтого пятна), вителлиформной макулярной дистрофии у взрослых (ВМДВ), вителлиформной макулярной дистрофии Беста, штаргардтоподобной макулярной дистрофии (STGD3), дистрофии глазного дна Сорби (SFD), заболевания, связанного с ABCA4, синдрома Ашера IB типа, аутосомно-рецессивной бесстрофинопатии, аутосомно-доминантной витреоретинохориоидопатии, ювенильной макулярной дегенерации (ЮМД), врожденного амавроза Лебера или пигментного ретинита, отслойки сетчатки разрывы сетчатки, тяжелых комбинированных иммунодефицитов (ТКИД), синдрома Оменна, хрящево-волосяной гипоплазии, ретикулярной дисгенезии, синдрома Вискотта-Олдрича, атаксии-телеангиэктазии, синдрома ДиДжорджа, иммуно-костных дисплазий, врожденного дискератоза, хронического кожно-слизистого кандидоза, гематологических

злокачественных новообразований, фолликулярной лимфомы (ФЛ), миелоидного новообразования, зрелых новообразований из T/NK-клеток, гистиоцитарных новообразований, множественной миеломы (ММ), миелодиспластических синдромов (МДС), лимфоплазмоцитарной лимфомы (ЛПЛ), макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы Беркитта (BL), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBL), лимфомы Ходжкина, мантийноклеточной лимфомы (MCL), волосатоклеточного лейкоза (HCL), миелопролиферативного/миелодиспластического синдрома (МДС), острого лимфоидного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), острого В-клеточного лимфоидного лейкоза (В-ОЛЛ), острого Т-клеточного лимфоидного лейкоза (Т-ОЛЛ), Т-клеточной лимфомы, В-клеточной лимфомы, аутоиммунных заболеваний, включая, например, волчанку, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит, рассеянный склероз, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Аддисона, болезнь Грейвса, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, сахарный диабет 1 типа, первичный билиарный цирроз печени, аутоиммунный гепатит, целиакию, онкологических заболеваний, включая, помимо прочего, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, рак печени, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак легких, немелкоклеточный рак легких, острый миелоидный лимфоидный лейкоз, множественная миелома, рак желудка, аденокарцинома желудка, аденокарцинома поджелудочной железы, глиобластома, нейробластома, плоскоклеточный рак легкого, гепатоцеллюлярная карцинома, рак мочевого пузыря, системной красной волчанки (СКВ), диабета 1 типа, аутоиммунного заболевания печени, синдрома Шегрена, ревматоидного артрита, системного склероза (склеродермии), органоспецифических аутоиммунных заболеваний (аутоиммунный гепатит, первичный склерозирующий хонлангит), алкогольного заболевания печени, рассеянного склероза, дефицита NK-клеток (NKD) (функциональный (FNKD) или классический (CNKD)), синдрома Х-сцепленной иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии (IPEX-синдром), синдрома Блума, анемии Фанкони, врожденного дискератоза, синдрома Чедиака-Хигаси, семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (СГЛ), синдрома Гришелли 2 типа, синдрома Германски Пудлака, синдрома Папийона-Лефевра, синдрома Вискотта-Олдрича, аутосомно-рецессивного варианта гипер-IgE-синдрома, аномалии Мея - Хегглина и дефицита адгезии лейкоцитов I или III типа.

[00243] В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из мезенхимальной стволовой клетки (MSC), гемопоэтической стволовой клетки (HSC), островковой клетки поджелудочной железы, островковой бета-клетки, иммунной клетки, В-клетки, Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), естественной Т-клетки-киллера (NKT), макрофагальной клетки, иммунопривилегированной клетки, зрительной клетки, клетки пигментированного

эпителия сетчатки (RPE), гепатоцита, клетки щитовидной железы, эндотелиальной клетки, клетки кожи, глиальной клетки-предшественника, нейрональной клетки, мышечной клетки, сердечной клетки и клетки крови.

[00244] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту перед введением популяции клеток.

[00245] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение пациенту одного или более иммуносупрессивных агентов.

[00246] В некоторых вариантах осуществления пациенту вводили один или более иммуносупрессивных агентов.

[00247] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов представляют собой малую молекулу или антитело.

[00248] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов выбраны из группы, состоящей из циклоспорина, азатиоприна, микофеноловой кислоты, микофенолата мофетила, кортикостероидов, преднизолона, метотрексата, солей золота, сульфасалазина, противомалярийных средств, брекинара, лефлуномида, мизорибина, 15-дезоксиспергуалина, 6-меркаптопурина, циклофосфамида, рапамицина, такролимуса (FK-506), OKT3, антитимоцитарного глобулина, тимопентина (тимозин-α) и иммунодепрессивного антитела.

[00249] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов включают циклоспорин.

[00250] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов включают микофенолата мофетил.

[00251] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов включают кортикостероид.

[00252] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов включают циклофосфамид.

[00253] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов включают рапамицин.

[00254] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов включают такролимус (FK-506).

[00255] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов включают антитимоцитарный глобулин.

[00256] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов представляют собой один или более иммуномодулирующих агентов.

[00257] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуномодулирующих агентов представляют собой малую молекулу или антитело.

[00258] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с одним или более рецепторами или лигандами, выбранными из группы, состоящей из p75 рецептора IL-2, ГКГС, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-

5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, CD58, и антитела связываются с любым из их лигандов.

[00259] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту до введения сконструированных клеток.

[00260] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней до введения сконструированных клеток.

[00261] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более до введения сконструированных клеток.

[00262] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней после введения сконструированных клеток.

[00263] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после введения сконструированных клеток.

[00264] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту в тот же день, что и первое введение сконструированных клеток.

[00265] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту после введения сконструированных клеток.

[00266] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту после введения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

[00267] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту до проведения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

[00268] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней до проведения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

[00269] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более до проведения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

[00270] В некоторых вариантах осуществления один или более

иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней после введения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

[00271] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после введения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

[00272] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных агентов вводят в более низкой дозе по сравнению с дозой одного или более иммуносупрессивных агентов, вводимых для снижения иммунного отторжения иммуногенными клетками, которые не содержат модификаций сконструированных клеток.

[00273] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено применение популяции сконструированных клеток, описанных в данном документе, для лечения нарушения или состояния у пациента-реципиента, которому будет полезна клеточная терапия.

[00274] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ получения сконструированных клеток, описанных в данном документе, или популяции клеток, содержащей сконструированные клетки, описанные в данном документе, при этом способ включает: (a) получение выделенной клетки; и (b) приведение выделенной клетки в контакт с одним или более реагентами и/или компонентами для модификации экспрессии гена в выделенной клетке, тем самым создавая сконструированную клетку или популяцию клеток, содержащую сконструированную клетку.

[00275] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровней экспрессии CD47 сконструированных клеток или популяции клеток.

[00276] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает отбор сконструированной клетки или популяции клеток для применения в производстве терапевтического продукта, если установлено, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют CD47 на пороговом или более высоком уровне.

[00277] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно одинаковое количество CD47 по сравнению с контролем.

[00278] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

[00279] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

[00280] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

[00281] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

[00282] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00283] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00284] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 4раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз или примерно в 5,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00285] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 4 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00286] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 4,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00287] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00288] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 5,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00289] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или популяция клеток экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00290] В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клетку дикого типа или популяцию клеток дикого типа, контрольную клетку или популяцию контрольных клеток, или эталон исходного уровня.

[00291] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка или популяция контрольных клеток содержат немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно, при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

[00292] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка или популяция контрольных клеток представляют собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

[00293] В некоторых вариантах осуществления эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

[00294] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой островковую бета-клетку, а популяция клеток включает бета-островковые клетки и дополнительные островковые клетки поджелудочной железы.

[00295] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит регулируемые модификации, которые изменяют экспрессию одной или более мишеней в сконструированной клетке по сравнению с контролем.

[00296] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с клеткой дикого типа, популяцией клеток дикого типа, контрольной клеткой или популяцией контрольных клеток.

[00297] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с клеткой дикого типа, популяцией клеток дикого типа, контрольной клеткой или популяцией контрольных клеток.

[00298] В некоторых вариантах осуществления один или более реагентов для модификации экспрессии гена в выделенной клетке включают i) условный или индуцируемый компонент на основе РНК для изменения экспрессии одной или более мишеней, ii) условный или индуцируемый компонент на основе ДНК для изменения экспрессия одной или более мишеней, или iii) условный или индуцируемый белковый компонент для изменения экспрессии одной или более мишеней.

[00299] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение выделенной клетки в контакт с экзогенным фактором или воздействие на выделенную клетку условий для активации условного или индуцируемого промотора, тем самым вызывая экспрессию одной или более мишеней, тем самым создавая сконструированную клетку.

[00300] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ получения сконструированной клетки, включающий регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с контролем, причем способ включает: (a) получение выделенной клетки; (b) введение в клетку условного или индуцируемого компонента на основе РНК для регулируемой сниженной экспрессии молекул человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, условного или индуцируемого компонента на основе ДНК для регулируемого снижения экспрессии ГКГС класса I и/или молекул человеческих лейкоцитов ГКГС класса II, или условного или индуцируемого белкового компонента для

регулируемой сниженной экспрессии молекул человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и/или ГКГС класса II; (c) воздействие на клетку условия или экзогенного фактора для активации условного или индуцируемого компонента, тем самым вызывая снижение экспрессии молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса; (d) введение в выделенную клетку нуклеиновой кислоты, содержащей условный или индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов, для регулируемой увеличенной экспрессии одного или более толерогенных факторов; и (e) воздействие на сконструированную клетку условия или экзогенного фактора для активации условного или индуцируемого промотора, тем самым вызывая экспрессию экзогенного одного или более толерогенных факторов и тем самым создавая сконструированную клетку.

[00301] В некоторых вариантах осуществления этапы (a)-(d) выполняют в любом порядке.

[00302] В некоторых вариантах осуществления один или более этапов (a)-(d) выполняют одновременно.

[00303] В некоторых вариантах осуществления этапы (b) и (c) выполняют перед этапами (d) и (e).

[00304] В некоторых вариантах осуществления этапы (d) и (e) выполняют перед этапами (b) и (c).

[00305] В некоторых вариантах осуществления этапы (c) и (e) выполняют последовательно.

[00306] В некоторых вариантах осуществления этапы (c) и (e) выполняют одновременно.

[00307] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ идентификации популяции клеток или популяции клеток, содержащей сконструированные клетки, описанные в данном документе, подходящие для использования в качестве терапевтического продукта, при этом способ включает: (a) получение выделенных клеток; (b) введение в клетки одной или более модификаций, которые снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с контролем; (c) введение в клетки одной или более модификаций, увеличивающих экспрессию CD47 по сравнению с контролем; (d) измерение уровней экспрессии CD47 в клетках; и (e) отбор популяции клеток, которые экспрессируют количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с контролем, и определение популяции как подходящей для применения в качестве терапевтического продукта.

[00308] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ идентификации популяции клеток или популяции клеток, содержащей сконструированные клетки, описанные в данном документе, подходящие для использования в качестве терапевтического продукта, при этом способ включает: (a)

получение выделенных клеток; (b) введение в клетки одной или более модификаций, которые снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с контролем; (c) введение в клетки одной или более модификаций, увеличивающих экспрессию CD47 по сравнению с контролем; (d) измерение уровней экспрессии CD47 в клетках; и (e) отбор популяции клеток, которые экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 2,5 раза, примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз, примерно в 10 раз, примерно в 11 раз, примерно в 12 раз, примерно в 13 раз, примерно в 14 раз, примерно в 15 раз, примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле, и определение популяции как подходящей для применения в качестве терапевтического продукта.

[00309] В некоторых вариантах осуществления этап (b) выполняют перед этапом (c).

[00310] В некоторых вариантах осуществления этап (c) выполняют перед этапом (b).

[00311] В некоторых вариантах осуществления этапы (b) и (c) выполняют одновременно.

[00312] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ определения того, пригодна ли популяция клеток для применения в качестве терапевтического продукта, при этом способ включает: (a) получение сконструированных клеток, содержащих первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, необязательно сконструированных клеток, описанных в данном документе; (b) измерение уровней экспрессии CD47 в клетках; и (c) определение того, что популяция клеток пригодна для применения в качестве терапевтического продукта, если клетки экспрессируют количество CD47 примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с контролем.

[00313] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ определения того, пригодна ли популяция клеток для применения в качестве терапевтического продукта, при этом способ включает: (a) получение сконструированных клеток, содержащих первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, необязательно сконструированных клеток, описанных в данном документе; (b) измерение уровней экспрессии CD47 в клетках; и (c) определение того, что популяция клеток пригодна для применения в качестве терапевтического продукта, если клетки экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 2,5 раза, примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз, примерно в 10 раз, примерно в 11 раз, примерно в 12

раз, примерно в 13 раз, примерно в 14 раз, примерно в 15 раз, примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

[00314] В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

[00315] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно, при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

[00316] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

[00317] В некоторых вариантах осуществления эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

[00318] В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

[00319] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ определения порогового уровня экспрессии CD47, необходимого для уклонения от иммунного ответа гипоиммуногенных клеток, при этом способ включает: (a) получение сконструированных клеток, содержащих первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47; (b) сортировку сконструированных клеток на основе уровней экспрессии CD47 для создания пулов клеток, имеющих схожие уровни экспрессии CD47; (c) оценку иммунного ответа, индуцированного пулами клеток; и (d) определение порогового уровня экспрессии CD47, необходимого для уклонения от иммунного ответа.

[00320] В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

[00321] В некоторых вариантах осуществления этап (a) способа дополнительно включает конструирование клеток, обеспечивающих сниженную экспрессию одного или более генов Y-хромосомы и антигенов человеческих лейкоцитов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I и/или класса II по сравнению с клеткой дикого типа или контрольной клеткой.

[00322] В некоторых вариантах осуществления оценку иммунного ответа проводят с использованием анализов in vitro или анализов in vivo.

[00323] В некоторых вариантах осуществления оценку иммунного ответа проводят путем измерения цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, лизиса зрелыми NK-клетками, поглощения макрофагами, иммунного ответа на клетки на основе антител или путем измерения процента клеток, все еще присутствующих у реципиента через определенный период времени после введения пациенту-реципиенту.

[00324] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен

способ идентификации популяции клеток или популяции клеток, содержащей сконструированные клетки, описанные в данном документе, подходящие для применения в качестве терапевтического продукта, при этом способ включает: (a) введение в выделенные клетки одной или более модификаций, которые снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с контролем, и (b) введение в клетки одной или более модификаций, которые увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем.

[00325] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап (c) измерения уровней экспрессии CD47 в клетках.

[00326] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап (d) отбора популяции клеток, которые экспрессируют количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с контролем, и определения популяции как подходящей для применения в качестве терапевтического продукта.

[00327] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап (d) отбора популяции клеток, которые экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 2,5 раза, примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз, примерно в 10 раз, примерно в 11 раз, примерно в 12 раз, примерно в 13 раз, примерно в 14 раз, примерно в 15 раз, примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле, и определения популяции как подходящей для применения в качестве терапевтического продукта.

[00328] В некоторых вариантах осуществления этап (a) выполняют перед этапом (b).

[00329] В некоторых вариантах осуществления этап (b) выполняют перед этапом (a).

[00330] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) и (b) выполняют одновременно.

[00331] Подробные описания гипоиммуногенных клеток, способов их получения и способов их применения можно найти в предварительной заявке США № 63/065,342, поданной 13 августа 2020 г., предварительной заявке США № 63/136,152, поданной 31 декабря 2020 г., предварительной заявке № 63/175,030, поданной 14 апреля 2021 г., предварительной заявке США № 63/175,003, поданной 14 апреля 2021 г., и предварительной заявке США, поданной 11 января 2021 г. (дело поверенного № 18615-30046.00), WO2016/183041 поданной 9 мая 2015 г., WO2018/132783 поданной 14 января 2018 г., WO2020/018615 поданной 17 июля 2019 г., WO2020/018620 поданной 17 июля 2019 г., WO2020/168317 поданной 16 февраля 2020 г., заявке PCT/US2021/029443,

поданной 27 апреля 2021 г., описания которых, включая примеры, списки последовательностей и фигуры, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00332] На Фиг. 1A, 1C, 1E, 1G, 1I, 1K и 1M показаны данные проточной цитометрии, измеряющие уровни CD47 на клеточной поверхности первичных мышиных островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg*, которые были получены из островковых бета-клеток, выделенных от мышей C57BL/6 (B6) с нокаутом B2M и затем трансдуцированных лентивирусами, содержащими трансгены CD47. Различные MOI оценивали с помощью островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg*. Уровни CD47 сравнивали с изотипическим контролем (слева). На Фиг. 1B, 1D, 1F, 1H, 1J, 1L и 1N показаны данные о опосредованном NK-клетками уничтожении островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg* NK-клетками мыши.

[00333] На Фиг. 2A-2AB показаны данные анализов Xelligence по опосредованному NK-клетками и макрофагами уничтожению $B2M^{-/-}$; CD47*tg*-Т-клеток NK-клетками и макрофагами, или его отсутствию.

[00334] На Фиг. 3A-3L представлены данные анализов Xelligence по опосредованному NK-клетками уничтожению $B2M^{-/-}$; CD47*tg*-Т-клетки NK-клетками, или его отсутствию.

[00335] На Фиг. 4A-4C показаны данные проточной цитометрии, измеряющие уровни HLA-I, HLA-II и CD47 на клеточной поверхности немодифицированных первичных клеток RPE.

[00336] На Фиг. 5A-5D показана морфология клеток (5A) и данные проточной цитометрии (5B-5D), измеряющие уровни HLA-I, HLA-II и CD47 на клеточной поверхности первичных клеток RPE $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; CD47*tg*.

[00337] На Фиг. 6A-6I показаны данные проточной цитометрии, измеряющие уровни HLA-I, HLA-II и CD47 на клеточной поверхности немодифицированных (6A-6C), первичных клеток RPE $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$ (6D-6F) и $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; CD47*tg* (6G-6I).

[00338] На Фиг. 7A-7I представлены данные анализов Xelligence по опосредованному NK-клетками и макрофагами уничтожению немодифицированных (7A-7C), первичных клеток RPE $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$ (7D-7F) и $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; CD47*tg* (7G-7I) NK-клетками и макрофагами, или его отсутствию.

[00339] Другие цели, преимущества и варианты осуществления настоящего изобретения станут очевидны из нижеследующего подробного описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Введение

[00340] В данном документе описаны сконструированные или модифицированные уклоняющиеся от иммунитета клетки, частично основанные на платформе гипоиммунного редактирования, описанной в WO2018132783 и PCT/US21/65157, поданными 23 декабря 2021 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном

объеме, включая, помимо прочего, человеческие уклоняющиеся от иммунитета клетки. Для преодоления проблемы иммунного отторжения у субъекта таких первичных и/или полученных из стволовых клеток трансплантатов авторы изобретения разработали и описали в настоящем документе гипоиммуногенные клетки (*например*, гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные клетки), которые представляют жизнеспособный источник для любого типа трансплантируемых клеток. Такие клетки защищены от отторжения со стороны адаптивного и/или врожденного иммунитета при введении субъекту-реципиенту. Преимущественно, клетки, описанные в настоящем документе, не отторгаются иммунной системой субъекта-реципиента вне зависимости от генетического профиля субъекта, так как они защищены от отторжения со стороны адаптивного и врожденного иммунитета при введении субъекту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки регулируемо лишены экспрессии одной или более молекул антигена ГКГС класса I и класса II и/или Т-клеточных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки регулируемо лишены экспрессии молекул антигена главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) I и II и/или Т-клеточных рецепторов и регулируемо сверхэкспрессируют один или более толерогенных факторов. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки, такие как гипоиммуногенные Т-клетки, регулируемо лишены экспрессии одной или более молекул антигена ГКГС I и II и/или Т-клеточных рецепторов, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и регулируемо экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки регулируемо лишены экспрессии одной или более молекул антигенов ГКГС I и II и/или Т-клеточных рецепторов и/или одного или более генов Y-хромосомы. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки регулируемо лишены экспрессии одной или более молекул антигенов ГКГС I и II и/или Т-клеточных рецепторов и/или одного или более генов Y-хромосомы и регулируемо сверхэкспрессируют CD47. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки регулируемо лишены экспрессии одной или более молекул антигенов ГКГС I и II и/или Т-клеточных рецепторов и/или RHD и регулируемо сверхэкспрессируют белки CD47. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки регулируемо лишены экспрессии одной или более молекул антигенов ГКГС I и II и/или Т-клеточных рецепторов и/или ABO и регулируемо сверхэкспрессируют белки CD47. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки регулируемо лишены экспрессии одной или более молекул антигенов ГКГС I и II и/или Т-клеточных рецепторов и/или MICA и регулируемо сверхэкспрессируют белки CD47. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки регулируемо лишены экспрессии одной или более молекул антигенов ГКГС I и II и/или Т-клеточных рецепторов и/или MICB и регулируемо сверхэкспрессируют белки CD47. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки, такие как гипоиммуногенные Т-клетки, регулируемо лишены экспрессии одной или более молекул антигена ГКГС I и II и/или Т-клеточных рецепторов

и/или одного или более генов Y-хромосомы, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и регулируемо экспрессируют CAR.

[00341] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки, описанные в настоящем документе, не подвергаются отторжению клетками врожденного иммунитета. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки не подвержены опосредованному NK-клетками лизису. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки не подвержены поглощению макрофагами. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки применимы как источник универсально совместимых клеток или тканей (*например*, универсальных донорных клеток или тканей), которые трансплантируют субъекту-реципиенту с необходимостью в небольшом количестве иммуносупрессивного агента или без необходимости в нем. Такие гипоиммуногенные клетки сохраняют клеточно-специфические характеристики и признаки при трансплантации, включая, *например*, плюрипотентность, а также способность к приживлению и функционированию подобно соответствующей нативной клетке.

[00342] В технологии, описанной в данном документе, используется регулируемая экспрессия толерогенных факторов и регулируемая модуляция (*например*, снижение или устранение) молекул ГКГС I, молекул ГКГС II и/или экспрессии TCR в клетках человека. В некоторых вариантах осуществления технологии регулируемого редактирования генома с использованием регулируемых редкощепящих эндонуклеаз (*например*, системы CRISPR/Cas, TALEN, нуклеазы цинковых пальцев, мегануклеазы и эндонуклеазы хоуминга) также используются для снижения или устранения экспрессии генов, участвующих в врожденных и/или адаптивных иммунных ответах (*например*, путем удаления геномной ДНК генов, участвующих во врожденном и/или адаптивном иммунном ответе, или путем вставки геномной ДНК в такие гены, что влияет на экспрессию генов), в клетках. В некоторых вариантах осуществления используют технологии регулируемого редактирования генома или другие технологии модуляции генов для введения индуцирующих толерантность (толерогенных) факторов в человеческие клетки, превращая клетки и их потомство (включая любые дифференцированные клетки, полученные из них) в такие, которые способны уклоняться от иммунного распознавания после прививания субъекту-реципиенту. По существу, клетки, описанные в данном документе, демонстрируют регулируемую модулированную экспрессию одного или более генов и факторов, которые влияют на молекулы ГКГС I, молекулы ГКГС II и/или экспрессию TCR и уклоняются от иммунной системы субъекта-реципиента.

[00343] Неожиданно было обнаружено, что некоторые трансгены, сверхэкспрессирующие экзогенные полинуклеотиды, могут подавляться во время дифференциации iPSC и первичных клеток, *например*, в сконструированные гипоиммуногенные дифференцированные клетки. Соответственно, в данном изобретении предложены системы, позволяющие регулировать экспрессию экзогенных полинуклеотидов. Также было обнаружено, что сниженная экспрессия одной или более

молекул ГКГС I, молекул ГКГС II и/или TCR не требуется перед созданием дифференцированных клеток, *например*, сконструированных гипоиммуногенных дифференцированных клеток. Соответственно, данное изобретение также обеспечивает системы, обеспечивающие регулируемый нокаут или нокдаун молекул ГКГС I, молекул ГКГС II и/или TCR.

[00344] 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).

[00345] При практической реализации многочисленных вариантов осуществления можно применять, если специально не указано иное, традиционные методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, технологии рекомбинантных ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, которые находятся в компетенции специалистов в данной области техники, многие из которых описаны ниже в иллюстративных целях. Такие методы подробно описаны в литературе. Смотрите, например, Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, 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.

Определения

[00346] В контексте настоящего изобретения будут использоваться следующие термины, которые определены, как указано ниже.

[00347] Термин «антиген», используемый в данном документе, относится к молекуле, способной провоцировать иммунный ответ. Антигены включают, помимо прочего, клетки, клеточные экстракты, белки, полипептиды, пептиды, полисахариды, конъюгаты полисахаридов, пептидные и непептидные миметики полисахаридов и других

молекул, малые молекулы, липиды, гликолипиды, углеводы, вирусы и вирусные экстракты, а также многоклеточные организмы, такие как паразиты и аллергены. Термин «антиген» в широком смысле включает любой тип молекулы, которая распознается иммунной системой хозяина как чужеродная.

[00348] Термины «аутоиммунное заболевание», или «аутоиммунное расстройство», или «воспалительное заболевание», или «воспалительное расстройство» относятся к любому заболеванию или расстройству, при котором у субъекта возникает врожденный и/или адаптивный иммунный ответ против его собственных тканей и/или клеток. Аутоиммунные расстройства могут поражать практически любую систему органов у субъекта (например, человека), включая, но не ограничиваясь этим, заболевания нервной, желудочно-кишечной и эндокринной систем, а также кожи и других соединительных тканей, глаз, крови и кровеносных сосудов. Примеры аутоиммунных заболеваний включают, но не ограничиваются этим, тиреоидит Хашимото, системную красную волчанку, синдром Шегрена, болезнь Грейвса, склеродермию, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, миастению гравис и сахарный диабет.

[00349] В контексте настоящего документа термин «рак» определяется как гиперпролиферация клеток, чей уникальный признак (*например*, утрата нормального контроля) приводит к нерегулируемому росту, отсутствию дифференцировки, локальной инвазии в ткани и метастазированию. В отношении способов по изобретению рак может представлять собой любой рак, включая любое из острого лимфоцитарного рака, острого миелоидного лейкоза, альвеолярной рабдомиосаркомы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, рака анального отверстия, анального канала или аноректума, рака глаза, рака внутрипеченочного желчного протока, рака суставов, рака шеи, рака желчного пузыря или плевры, рака носа, носовой полости или среднего уха, рака ротовой полости, рака вульвы, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного рака, рака толстой кишки, рака пищевода, рака шейки матки, фибросаркомы, желудочно-кишечной карциноидной опухоли, лимфомы Ходжкина, рака гортаноглотки, рака почки, рака гортани, лейкоза, опухолей жидких тканей, рака печени, рака легкого, лимфомы, злокачественной мезотелиомы, мастоцитомы, меланомы, множественной миеломы, рака носоглотки, неходжкинской лимфомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, брюшной полости, сальника и рака брыжейки, рака глотки, рака предстательной железы, ректального рака, рака почки, рака кожи, рака тонкого кишечника, рака мягких тканей, солидных опухолей, рака желудка, рака яичка, рака щитовидной железы, рака уретры и/или рака мочевого пузыря. В контексте настоящего документа термин «опухоль» относится к аномальному росту клеток или тканей злокачественного типа, если не указано иное, и не включает в себя ткань доброкачественного типа.

[00350] Термин «хроническое инфекционное заболевание» относится к заболеванию, вызванному инфекционным агентом, при этом инфекция сохраняется. Такое заболевание может включать в себя гепатит (A, B или C), вирус герпеса (*например*, VZV,

HSV-1, HSV-6, HSV-II, CMV и EBV) и ВИЧ/СПИД. Невирусные примеры могут включать хронические грибковые заболевания, такие как аспергиллез, кандидоз, кокцидиридомикоз, и заболевания, связанные с криптококками и гистоплазмозом. Неограничивающими примерами хронических бактериальных инфекционных агентов могут быть Chlamydia pneumoniae, Listeria monocytogenes и Mycobacterium tuberculosis. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой инфекцию, вызванную вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).

[00351] [0010] В данном документе «клинически эффективное количество» относится к количеству, достаточному для обеспечения клинической пользы при лечении и/или контроле заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления клинически эффективное количество представляет собой количество, которое, как было показано, достигает по меньшей мере одной улучшенной клинической конечной точки стандарта лечения для заболевания, расстройства или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления клинически эффективное количество представляет собой количество, которое, как было продемонстрировано, например, в клиническом исследовании, является достаточным для обеспечения статистически значимой и информативной эффективности для лечения заболевания, расстройства или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления клинически эффективное количество также представляет собой терапевтически эффективное количество. В других вариантах осуществления клинически эффективное количество не представляет собой терапевтически эффективное количество.

[00352] Используемые в данном документе термины «условные промоторы» активны при определенных клеточных условиях или на определенных клеточных стадиях. В данном документе условные промоторы включают, *например*, клеточно-специфичные промоторы, тканеспецифические промоторы, специфичные для линии промоторы, специфичные для развития промоторы, специфичные для дифференциации клеток промоторы, промоторы, индуцированные дифференциацией, специфичные для клеточного цикла промоторы и специфичные для клеточной фазы промоторы. «Клеточно-специфичные промоторы», «тканеспецифические промоторы» и «специфичные для линии промоторы» представляют собой промоторы, которые вызывают экспрессию нуклеотидной последовательности в определенных клетках, тканях или типах линий, таких как респираторные, предстательные, поджелудочные, клети, клети молочной железы, почечные, кишечные, нервные, скелетные, сосудистые, печеночные, кроветворные, мышечные, эндотелиальные, эпителиальные или сердечные клетки. Промоторы, которые вызывают экспрессию нуклеотидной последовательности на определенной стадии развития или дифференциации клеток, обычно называются «специфичными для развития промоторами», «специфичными для дифференциации клеток промоторами» или «индуцируемыми дифференциацией промоторами», и включают в себя, *например*, промоторы, которые активируются или инактивируются при

переходе клетки от одного типа клеток к другому типу клеток, *например*, из недифференцированной клетки в дифференцированную клетку, *например*, из стволовой клетки в мультипотентную клетку-предшественника, из мультипотентной клетки-предшественника в коммитированную по линии клетку-предшественника, из коммитированной по линии клетки-предшественника в клетку-предшественника или из клетки-предшественника в зрелую клетку. Промоторы, которые вызывают экспрессию нуклеотидной последовательности на определенной стадии клеточного цикла, обычно называются «специфичными для клеточного цикла промоторами» или «специфичными для клеточной фазы промоторами». Специалистам в данной области техники известны многочисленные стандартные условные промоторы.

[00353] «Конститутивные промоторы» обычно активны, *т.е.* способствуют транскрипции при большинстве условий. В некоторых примерах конститутивные промоторы способны управлять транскрипцией функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты в отсутствие стимула (*например*, теплового шока, химических веществ и т. д.). В некоторых примерах конститутивные промоторы активны в большинстве типов клеток в большинстве случаев. Специалистам в данной области техники известны многочисленные стандартные условные промоторы. Конститутивные промоторы включены в данный документ как один тип «регулируемого промотора».

[00354] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе изменение или модификация (включая, например, генетические изменения или модификации) приводят к снижению экспрессии целевой или выбранной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе изменение или модификация приводят к снижению экспрессии целевой или выбранной полипептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе изменение или модификация приводят к повышению экспрессии целевой или выбранной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе изменение или модификация приводят к повышению экспрессии целевой или выбранной полипептидной последовательности. Термины «снижение», «пониженный», «понижение» и «снижение» используются в данном документе, как правило, для обозначения снижения на статистически значимую величину. Однако, во избежание сомнений, «снижение», «пониженный», «понижение», «снижение» означает уменьшение по меньшей мере на 10% по сравнению с эталонным уровнем, например, снижение на по меньшей мере около 20%, или 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. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы так, чтобы иметь

сниженную экспрессию одной или более мишеней по сравнению с неизмененной или немодифицированной клеткой дикого типа.

[00355] В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления настоящее изобретение предполагает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей любым способом, известным специалисту в данной области техники, *например*, с использованием системы TALEN или РНК-направляемых транспозаз. Следует понимать, что хотя примеры способов, в которых используют CRISPR/Cas (*например*, Cas9 и Cas12a) и TALEN, подробно описаны в настоящем документе, настоящее изобретение не ограничено применением этих способов/систем. В рамках настоящего документа можно использовать другие способы нацеливания, *например*, B2M, для снижения или устранения экспрессии в клетках-мишенях, известные специалистам в данной области техники.

[00356] «Элемент дегрон» в контексте данного документа относится к субъединице белка, которая регулирует деградацию белка. В некоторых случаях дегрон содержит последовательность аминокислот, которая обеспечивает сигнал деградации, направляющий полипептид на клеточную деградацию. Дегрон может способствовать деградации присоединенного полипептида через протеасомный или аутофагийно-лизосомный пути. В слитом белке дегрон должен быть функционально связан с представляющим интерес полипептидом, но не обязательно должен быть смежным с ним, пока дегрон все еще функционирует, направляя деградацию представляющего интерес полипептида. Предпочтительно дегрон индуцирует быструю деградацию представляющего интерес полипептида. Обсуждение дегронов и их роли в деградации белков см. *например*, в Kanemaki *et al.* (2013) Pflugers Arch. 465(3):419-425, Erales *et al.* (2014) Biochim Biophys Acta 1843(1):216-221, Schrader *et al.* (2009) Nat. Chem. Biol. 5(11):815-822, Ravid *et al.* (2008) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9(9):679-690, Tasaki *et al.* (2007) Trends Biochem Sci. 32(11):520-528, Meinnel *et al.* (2006) Biol. Chem. 387(7):839-851, Kim *et al.* (2013) Autophagy 9(7):1100-1103, Varshaysky (2012) Methods Mol. Biol. 832:1-11, и Fayadat *et al.* (2003) Mol Biol Cell. 14(3):1268-1278; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00357] В некоторых вариантах осуществления описанные сконструированные и гипоиммуногенные клетки получены из iPSC или их потомства. В контексте настоящего документа термин «полученные из iPSC или их потомства» охватывает начальные iPSC и любое последующее их потомство. В контексте настоящего документа термин «потомство» охватывает, *например*, потомство первого поколения, *т. е.* потомство, непосредственно происходящее из, полученное из, которое можно получить из или которое может происходить из начальных iPSC посредством, *например*, традиционных способов размножения. Термин «потомство» также охватывает последующие поколения, такие как второе, третье, четвертое, пятое, шестое, седьмое или более поздние поколения, *т. е.* поколения клеток, которые происходят из, получены из, которые можно получить из или которые могут происходить из предыдущих поколений посредством, *например*,

традиционных способов размножения. Термин «потомство» также охватывает модифицированные клетки, которые были получены в результате модификации или изменения начальных iPSC или их потомства.

[00358] Термин «субъект-донор» относится к животному, например, человеку, от которого можно получить клетки. Термины «отличные от человека животные» и «отличные от человека млекопитающие», взаимозаменяемо используемые в настоящем документе, включают в себя млекопитающих, таких как крысы, мыши, кролики, овцы, кошки, собаки, коровы, свиньи и отличные от человека приматы. Термин «субъект-донор» также охватывает любое позвоночное животное, включая, помимо прочего, млекопитающих, рептилий, земноводных и рыб. При этом субъект-донор преимущественно представляет собой млекопитающее, такое как человек или другие млекопитающие, такие как одомашненное млекопитающее, например собака, кошка, лошадь и т. п., или сельскохозяйственное млекопитающее, например, корова, овца, свинья и т. п. «Субъект-донор» может также относится к более чем одному донору, например, одному или большему количеству людей, или отличных от человека животных, или отличных от человека млекопитающих.

[00359] Термин «эндогенный» относится к указанным молекуле или полипептиду, которые естественным образом присутствуют в клетке. Аналогично, этот термин в отношении экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты относится к экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты, естественным образом содержащейся внутри клетки, а не внесенной экзогенно. Аналогично, этот термин в отношении промоторной последовательности относится к промоторной последовательности, естественным образом содержащейся внутри клетки, а не внесенной экзогенно.

[00360] В контексте настоящего документа термин «сконструированная клетка» относится к клетке, которая была изменена по меньшей мере некоторым способом при вмешательстве человека, включая, например, путем генетических изменений или модификаций, так что сконструированная клетка отличается от клетки дикого типа.

[00361] В контексте настоящего документа подразумевается, что термин «экзогенный» в контексте экспрессируемого полинуклеотида или полипептида 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.

[00362] «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.

[00363] 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.

[00364] 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 техники и включают в себя, помимо прочего, липид-опосредованный перенос (*т. е.* липосомы, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние клеток, бомбардировку частицами, соосаждение фосфатом кальция, перенос, опосредованный ДЭАЭ-декстраном, и перенос, опосредованный вирусным вектором.

[00365] В данном документе «фузосома» включает вектор генной терапии, содержащий ретровирусный вектор, псевдотипированный с помощью сконструированного фузогена, содержащего G-белок, модифицированный для включения нацеливающего фрагмента, и F-белок, ослепленный для того, чтобы больше не распознавать его когнатный рецептор. В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс фузогена получен из параимиксовируса, необязательно, при этом параимиксовирус представляет собой вирус Нипах. В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[00366] 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 в себя, помимо прочего, 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/или контрольные области локуса.

[00367] «Генная экспрессия» относится к преобразованию информации, содержащейся в гене, в генный продукт. Генный продукт может представлять собой продукт прямой транскрипции гена (*например*, мРНК, тРНК, рРНК, антисмысловую РНК, рибозим, структурную РНК или любой другой тип РНК) или белок, полученный посредством трансляции мРНК. Генные продукты также включают РНК, модифицированные такими процессами, как кэпирование, полиаденилирование, метилирование и редактирование, и белки, модифицированные, например, за счет метилирования, ацетилирования, фосфорилирования, убиквитинирования, АДФ-рибозилирования, миристиолирования и/или гликозилирования.

[00368] В контексте настоящего документа термин «генетическая модификация» и его грамматические эквиваленты могут относиться к одному или более изменениям нуклеиновой кислоты, *например*, нуклеиновой кислоты в геноме организма. Например, генетическая модификация может относиться к изменениям, добавлениям и/или делециям генов или частей генов или других последовательностей нуклеиновых кислот. Генетически модифицированная клетка также может относиться к клетке с добавленными, удаленными и/или измененными геном или частью гена. Генетически модифицированная клетка также может относиться к клетке с добавленной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая не является геном или частью гена. Генетические модификации включают в себя, например, как механизмы временного нокина или нокдауна, так и механизмы, которые приводят к перманентному нокину, нокдауну или нокауту целевых генов или частей генов последовательностей нуклеиновых кислот. Генетические модификации включают в себя, например, как временный нокин, так и механизмы, которые приводят к перманентному нокину последовательностей нуклеиновых кислот. Генетические модификации также включают в себя, например, пониженную или повышенную транскрипцию, пониженную или повышенную стабильность мРНК, пониженную или повышенную трансляцию и пониженную или повышенную стабильность белка.

[00369] В контексте данного документа термины «прививание», «введение», «внесение», «имплантация» и «трансплантация», а также их грамматические вариации, используются взаимозаменяемо в контексте помещения клеток (*например*, описанных в данном документе клеток) в организм субъекта методом или путем, который приводит к

локализации или по меньшей мере частичной локализации внесенных клеток в необходимом участке или системному введению (*например*, в циркуляцию). Клетки можно имплантировать непосредственно в необходимый участок или, в альтернативном варианте, вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимый участок организма субъекта, при этом по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остается жизнеспособной. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от нескольких часов, например двадцать четыре часа, до нескольких дней и даже до нескольких лет. В некоторых вариантах осуществления клетки также можно вводить (например, инъецировать) в место, отличное от необходимого участка, например, в головной мозг или подкожно, например, в капсуле, чтобы сохранить имплантированные клетки в месте имплантации и избежать миграции имплантированных клеток.

[00370] «HLA», или «человеческий лейкоцитарный антиген», или «молекулы HLA», или комплекс «молекул человеческого лейкоцитарного антигена» представляет собой генный комплекс, кодирующий белки ГКГС у человека. Эти белки клеточной поверхности, составляющие комплекс HLA, отвечают за регуляцию иммунного ответа на антигены. У человека есть два ГКГС, молекулы класса I и молекулы класса II: «HLA-I» и «HLA-II» или «молекулы HLA-I» и «молекулы 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 «ГКГС», либо «HLA» не предназначено для ограничения, поскольку это зависит от того, получены ли гены от человека (HLA) или от мыши (ГКГС). Таким образом, в отношении клеток млекопитающих эти термины можно взаимозаменяемо использовать в настоящем документе.

[00371] Используемые в данном документе для характеристики клетки термины «иммунопривилегированная» и «гипоиммуногенная» используются взаимозаменяемо и обычно означают, что такая клетка менее склонна к врожденному или адаптивному иммунному отторжению субъектом, которому трансплантированы такие клетки, *например*, клетка менее склонна к аллоотторжению субъектом, которому трансплантированы такие клетки. Например, по отношению к клетке такого же клеточного типа, которая не содержит модификации, такая гипоиммуногенная клетка может на около 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более быть менее подверженной врожденному или адаптивному иммунному отторжению субъектом, которому трансплантированы такие клетки. В некоторых вариантах осуществления технологии редактирования генома используются для модуляции экспрессии одного или более генов ГКГС I и ГКГС II и, таким образом,

способствуют образованию гипоиммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка избегает иммунного отторжения у несовместимого по ГКГС аллогенного реципиента. В некоторых случаях дифференцированные клетки, полученные из описанных в настоящем документе гипоиммуногенных стволовых клеток, избегают иммунного отторжения при введении (*например*, трансплантации или прививании) несовместимому по ГКГС аллогенному реципиенту. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка защищена от опосредованного Т-клетками адаптивного иммунного отторжения и/или врожденного иммунного отторжения. Подробные описания гипоиммуногенных клеток, способов их получения и способов их применения можно найти в WO2016183041, поданной 9 мая 2015 г.; WO2018132783, поданной 14 января 2018 г.; WO2018176390, поданной 20 марта 2018 г.; WO2020018615, поданной 17 июля 2019 г.; WO2020018620, поданной 17 июля 2019 г.; PCT/US2020/44635, поданной 31 июля 2020 г.; WO2021022223, поданной 31 июля 2020 г.; WO2021041316, поданной 24 августа 2020 г.; WO2021222285, поданной 27 апреля 2021 г.; и WO2021222285, поданной 27 апреля 2021 г., содержания которых, включая примеры, перечни последовательностей и фигуры, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

[00372] Гипоиммуногенность клетки можно определить путем оценки иммуногенности клетки, например, способности клетки вызывать адаптивный и врожденный иммунные ответы или избегать таких адаптивных и врожденных иммунных ответов. Такой иммунный ответ можно измерять с помощью анализов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления в анализе врожденного и/или адаптивного иммунного ответа определяют влияние гипоиммуногенной клетки на пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток, Т-клеточное уничтожение, генерацию донор-специфических антител, 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 врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00373] Термин процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как определено с помощью одного из

алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (*например*, BLASTP и BLASTN или другие алгоритмы, доступные специалистам), или визуального осмотра. В зависимости от применения процент «идентичности» может относиться к области сравниваемой последовательности, *например*, протяжению функционального домена, или, в альтернативном варианте, относиться ко всей длине двух сравниваемых последовательностей. При сравнении последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости указывают координаты подпоследовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемой(ых) последовательности(ей) в сравнении с эталонной последовательностью на основании указанных программных параметров.

[00374] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по 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).

[00375] Одним из примеров алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для проведения BLAST-анализа находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации.

[00376] В контексте настоящего документа «иммунный сигнальный фактор» в некоторых случаях относится к молекуле, белку, пептиду и т.п., которые активируют иммунные сигнальные пути.

[00377] В контексте настоящего документа термины «иммуносупрессивный фактор», или «иммунорегуляторный фактор», или «толерогенный фактор» включают в себя факторы гипоиммунности, ингибиторы комплемента и другие факторы, которые модулируют или влияют на возможность распознавания клетки иммунной системой субъекта-хозяина или субъекта-реципиента после введения, трансплантации или прививания. Они могут идти в комбинации с дополнительными генетическими модификациями.

[00378] Термины «увеличенный», «увеличение», «усиление» или «активирование» применяются в настоящем 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 в по меньшей мере около 2 раза, или в по меньшей мере около 3 раза, или в по меньшей мере около 4 раза, или в по меньшей мере около 5 раз или в по меньшей мере около 10 раз, или любое увеличение в 2-10 раз или более по сравнению с эталонным уровнем. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень, также называемый базальным уровнем, составляет 0.

[00379] В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой индел. В контексте настоящего документа «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 редактирования генов (*например* CRISPR/Cas) по данному изобретению можно использовать для индукции индела любой длины или точечной мутации в целевой полинуклеотидной последовательности.

[00380] «Индуцируемые промоторы» активны только при определенных условиях, например, помимо прочего, в присутствии данного молекулярного фактора (*например*, агента, биологической молекулы, химического вещества, лиганда и т.п.) или заданных условий окружающей среды (*например*, конкретная концентрация CO_2, уровень питательных веществ, свет, тепло). В отсутствие этого условия индуцируемые промоторы обычно не обеспечивают значительных или измеримых уровней транскрипционной активности. Например, индуцируемые промоторы могут индуцироваться в зависимости от температуры, pH, гормона, метаболита (*например*, лактозы, маннита, аминокислоты), света (*например*, в зависимости от длины волны), осмотического потенциала (*например*, индуцированного солью), тяжелого металла или антибиотика. Специалистам в данной области техники известны многочисленные стандартные индуцируемые промоторы. Индуцируемые промоторы включены в данный документ как один тип «регулируемого промотора».

[00381] В некоторых случаях индуцируемая система экспрессии генов может включать или выключать транскрипцию в присутствии лиганда, малой молекулы, пептида, фактора, агента и т.п. В некоторых случаях индуцируемая система экспрессии генов может активировать путь деградации белка в ответ на присутствие лиганда, малой молекулы, пептида, фактора, агента и т.п.

[00382] В контексте данного документа «нокдаун» относится к снижению экспрессии целевой мРНК или соответствующего целевого белка. Нокдаун обычно определяют относительно уровней, присутствующих после введения или экспрессии неконтрольной молекулы, которая не опосредует снижение уровней экспрессии РНК (*например*, нецелевой контрольной мшРНК, миРНК или микроРНК). В некоторых вариантах осуществления нокдаун целевого гена обеспечивают посредством условных или индуцибельных мшРНК, условных или индуцибельных миРНК, условных или индуцибельных микроРНК или условной или индуцированной CRISPR-интерференции (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления нокдаун целевого гена обеспечивают посредством белкового компонента, такого как способ условного или индуцибельного дегрона. В некоторых вариантах осуществления нокдаун целевого гена обеспечивают посредством генетической модификации, включая кшРНК, миРНК, микроРНК, или применения систем редактирования генов (*например* CRISPR/Cas).

[00383] Нокдаун обычно оценивают путем измерения уровней мРНК, используя амплификацию методом количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР), или путем измерения уровней белка методом вестерн-блоттинга или ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA). Анализ уровня белка обеспечивает оценку как расщепления мРНК, так и ингибирования трансляции. Дополнительные методики для определения нокдауна включают гибридизацию РНК в растворе, нуклеазную защиту, нозерн-гибридизацию, мониторинг генной экспрессии с помощью микроматрицы, связывание антител, радиоиммуноанализ и анализ флуоресцентно активированных клеток. Специалисты в данной области техниик легко поймут, как использовать системы редактирования генов (*например* CRISPR/Cas) по данному изобретению для нокаута целевой полинуклеотидной последовательности или ее части на основании подробной информации, описанной в данном документе.

[00384] Под «нокином» в настоящем документе подразумевается генетическая модификация в результате вставки последовательности ДНК в хромосомный локус в клетке-хозяине. Это приводит к возникновению или повышению уровней экспрессии подвергнутого нокину гена, части гена или вставленном продукте последовательности нуклеиновой кислоты, *например*, повышению уровней транскрипции РНК и/или уровней кодируемого белка. Как понятно специалистам в данной области техники, это можно осуществлять несколькими способами, включая вставку или добавление одной или более дополнительных копий гена или его части в клетку-хозяина, или изменение регуляторного компонента эндогенного гена, повышающего экспрессию белка, или вставку конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, экспрессия которой необходима. Это можно осуществлять посредством модификации промотора, добавления другого промотора, добавления энхансера, добавления других регуляторных элементов или модификации других последовательностей генной экспрессии.

[00385] В контексте настоящего документа «нокаут» включает в себя удаление всей или части целевой полинуклеотидной последовательности так, чтобы это

препятствовало трансляции или функции целевой полинуклеотидной последовательности. Например, нокаут можно обеспечить путем изменения целевой полинуклеотидной последовательности путем индукции вставки или делеции («индела») в целевой полинуклеотидной последовательности, в том числе в функциональном домене целевой полинуклеотидной последовательности (*например*, ДНК-связывающем домене). Специалисты в данной области техниик легко поймут, как использовать системы редактирования генов (*например* CRISPR/Cas) по данному изобретению для нокаута целевой полинуклеотидной последовательности или ее части на основании подробной информации, описанной в данном документе.

[00386] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация или изменение приводят к нокауту или нокдауну целевой полинуклеотидной последовательности или ее части. Нокаут целевой полинуклеотидной последовательности или ее части с помощью системы редактирования генов (*например* CRISPR/Cas) по данному изобретению может быть полезен для множества применений. Например, нокин целевой полинуклеотидной последовательности в клетке можно проводить in vitro в исследовательских целях. В ex vivo целях нокаут целевой полинуклеотидной последовательности в клетке может быть применим для лечения или предотвращения расстройства, связанного с экспрессией целевой полинуклеотидной последовательности (*например*, за счет нокаута мутантного аллеля в клетке ex vivo и введения этих клеток, содержащих нокаутированный мутантный аллель субъекту), или для изменения генотипа или фенотипа клетки.

[00387] «Модуляция» генной экспрессии относится к изменению уровня экспрессии гена. Модуляция экспрессии может включать в себя, помимо прочего, активацию генов и репрессию генов. Модуляция также может быть полной, *т. е.* при которой экспрессия гена полностью инактивирована или активирована до уровней дикого типа или ниже; или она может быть частичной, когда экспрессия гена частично снижена или частично активирована до некоторой доли уровней дикого типа. Используемый в данном документе термин «модифицировать экспрессию гена» относится к введению любой из описанных в данном документе модификаций в клетку с целью создания описанных в данном документе сконструированных клеток.

[00388] В дополнительных или альтернативных аспектах настоящее изобретение предусматривает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей любым способом, известным специалисту в данной области техники, *например*, с использованием системы на основе нуклеаз, такой как система на основе эффекторной нуклеазы TAL (TALEN) или цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN). Следует понимать, что хотя примеры способов, в которых используют CRISPR/Cas (*например*, Cas9 и Cas12a) и TALEN, подробно описаны в настоящем документе, изобретение не ограничено применением этих способов/систем. В настоящем документе можно использовать другие способы нацеливания для снижения или устранения экспрессии в целевых клетках, известные специалисту в данной области техники. Предложенные в данном документе можно

использовать для изменения целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Настоящее изобретение предусматривает 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» демонстрирует мутантный фенотип, например, когда нормально функционирующий ген изменяют с помощью систем редактирования генов (*например* CRISPR/Cas) по данному изобретению. В других случаях «мутантная клетка» демонстрирует фенотип дикого типа, например, когда система редактирования генов (*например* CRISPR/Cas) по данному изобретению используется для коррекции мутантного генотипа. В некоторых вариантах осуществления целевую полинуклеотидную последовательность в клетке изменяют для коррекции или исправления генетической мутации (например, для восстановления нормального фенотипа клетки). В некоторых вариантах осуществления целевую полинуклеотидную последовательность в клетке изменяют, чтобы индуцировать генетическую мутацию (например, чтобы нарушить функцию гена или геномного элемента).

[00389] В контексте настоящего документа термин «нативная клетка» относится к клетке, которая не является каким-либо образом модифицированной (например, сконструированной). В некоторых вариантах осуществления нативная клетка представляет собой встречающуюся в природе клетку дикого типа или контрольную клетку.

[00390] Термины «функционально связанный» или «функционально связан» используются 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, транскрипционная регуляторная последовательность, 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. Транскрипционная регуляторная последовательность обычно функционально связана в цис-положении с кодирующей последовательностью, но не обязательно должна непосредственно граничить с ней. Например, энхансер представляет собой транскрипционную регуляторную последовательность, которая функционально связана с кодирующей последовательностью, даже если они не являются смежными.

[00391] В контексте настоящего документа «плюрипотентные стволовые клетки» обладают потенциалом к дифференцировке в любой из трех зародышевых слоев:

энтодерму (*например*, слизистую оболочку желудка, желудочно-кишечный тракт, легкие и т. д.), мезодерму (*например*, мышцы, кости, кровь, ткани мочеполовой системы и т. д.) или эктодерму (*например*, эпидермальные ткани и ткани нервной системы). В контексте настоящего документа термин «плюрипотентные стволовые клетки» также охватывает «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки», или «iPSC», или тип плюрипотентных стволовых клеток, полученных из неплюрипотентных клеток. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку получают или создают из клетки, которая не является плюрипотентной клеткой. другими словами плюрипотентные стволовые клетки могут представлять собой прямое или непрямое потомство неплюрипотентной клетки. Примеры родительских клеток включают соматические клетки, которые были перепрограммированы для индукции плюрипотентного недифференцированного фенотипа различными способами. Такие «iPS»- или «iPSC»-клетки можно создавать посредством индукции экспрессии определенных регуляторных генов или посредством экзогенного применения определенных белков. Способы индукции iPS-клеток 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); каждая из которых в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки). Генерация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) описана ниже. В контексте настоящего документа «hiPSC» представляют собой человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления термин «плюрипотентные стволовые клетки», используемый в данном документе, также включает мезенхимальные стволовые клетки (MSC), гемопоэтические стволовые клетки (HSC) и/или эмбриональные стволовые клетки (ESC).

[00392] В контексте настоящего документа «промотор», «промоторная последовательность» или «промоторная область» относится к регуляторной области/последовательности ДНК, способной связывать РНК-полимеразу и участвующей в инициации транскрипции нижележащей кодирующей или некодирующей последовательности. В некоторых примерах промоторная последовательность включает в себя сайт инициации транскрипции и простирается выше для включения минимального количества оснований или элементов, необходимых для инициации транскрипции на уровнях, обнаруживаемых выше фона. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность включает в себя сайт инициации транскрипции, а также белковые связывающие домены, ответственные за связывание РНК-полимеразы. Эукариотические промоторы часто, но не всегда, будут содержать TATA-боксы и CAT-боксы.

[00393] В некоторых вариантах осуществления описанные сконструированные и гипоиммуногенные клетки размножают из первичных Т-клеток или их потомства. В контексте настоящего документа термин «размноженные из первичных Т-клеток или их

потомства» охватывает исходные первичные Т-клетки, выделенные у субъекта-донора, и любое последующее их потомство. В контексте настоящего документа термин «потомство» охватывает, *например*, потомство первого поколения, *т. е.* потомство, непосредственно происходящее из, полученное из, которое можно получить из или которое может происходить из исходных первичных Т-клеток, посредством, *например*, традиционных способов размножения. Термин «потомство» также охватывает последующие поколения, такие как второе, третье, четвертое, пятое, шестое, седьмое или более поздние поколения, *т. е.* поколения клеток, которые происходят из, получены из, которые можно получить из или которые могут происходить из предыдущих поколений посредством, *например*, традиционных способов размножения. Термин «потомство» также охватывает модифицированные клетки, которые были получены в результате модификации или изменения исходных первичных Т-клеток или их потомства.

[00394] Термин «пациент-реципиент» относится к животному, например, человеку, в отношении которого применяют лечение, включая профилактическое лечение, клетками, описанными в настоящем документе. В случае лечения тех инфекций, патологических состояний или болезненных состояний, которые являются специфическими для конкретного животного, такого как пациент-человек, термин «пациент» относится к этому конкретному животному. Термин «пациент-реципиент» также охватывает любое позвоночное животное, включая, помимо прочего, млекопитающих, рептилий, земноводных и рыб. Однако преимущественно пациент-реципиент представляет собой млекопитающее, такое как человек или другие млекопитающие, такие как одомашненное млекопитающее, *например*, собака, кошка, лошадь и т. п., или сельскохозяйственное млекопитающее, *например*, корова, овца, свинья и т. п. В некоторых вариантах осуществления пациент-реципиент имеет инфекцию, состояние, заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления у пациента-реципиента подозревают наличие инфекции, состояния, заболевания или нарушения.

[00395] «Регулируемая модификация» в контексте данного документа относится к любой модификации клетки, которая производится в определенных условиях, таких как, помимо прочего, клеточные состояния или стадии, или внешние условия. В вариантах осуществления регулируемая модификация включает регулируемый нокаут целевого гена. В вариантах осуществления регулируемая модификация включает регулируемое снижение экспрессии одного или более целевых генов. В вариантах осуществления регулируемая модификация включает регулируемое увеличение экспрессии одного или более эндогенных или экзогенных генов. В вариантах осуществления регулируемые модификации включают условные или индуцируемые компоненты на основе ДНК, условные или индуцируемые компоненты на основе РНК или условные или индуцируемые белковые компоненты для увеличения, снижения или нокаута экспрессии целевого гена.

[00396] «Регулируемые промоторы», используемые в данном документе, активны

только при определенных условиях, таких как, помимо прочего, клеточные состояния или стадии, или внешние условия. В контексте данного документа регулируемые промоторы включают условные промоторы и индуцируемые промоторы. В некоторых случаях индуцируемая регулируемая система экспрессии генов может включать или выключать транскрипцию в присутствии лиганда, малой молекулы, пептида, фактора, агента и т.п. В некоторых случаях регулируемая система экспрессии генов может активировать путь деградации белка в ответ на присутствие лиганда, малой молекулы, пептида, фактора, агента и т.п.

[00397] В контексте настоящего документа термины «регуляторные последовательности», «регуляторные элементы» и «контрольные элементы» являются взаимозаменяемыми и относятся к полинуклеотидным последовательностям, которые расположены выше (5'-некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3'-нетранслируемые последовательности) целевого полинуклеотида, предназначенного для экспрессии. Регуляторные последовательности влияют, например, помимо прочего, на время транскрипции, количество или уровень транскрипции, процессинг или стабильность РНК и/или трансляцию связанной структурной нуклеотидной последовательности. Регуляторные последовательности могут включать в себя активаторные связывающие последовательности, энхансеры, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, промоторы, репрессорные связывающие последовательности, структуры «петля-на-стебле», последовательности инициации трансляции, лидерные последовательности трансляции, последовательности терминации транскрипции, последовательности терминации трансляции, сайты связывания праймеров и т. п. Понятно, что так как в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей полностью не определены, нуклеотидные последовательности разной длины могут иметь идентичную регуляторную или промоторную активность.

[00398] В контексте настоящего документа «безопасный локус» относится к генному локусу, который может обеспечивать экспрессию трансгена или экзогенного гена таким образом, который делает возможным предсказуемое функционирование новых вставленных генетических элементов и также не приводит к изменениям хозяйского генома, которые могут представлять риск для клетки-хозяина. Типовые «безопасные» локусы включают в себя, помимо прочего, ген CCR5, ген PPP1R12C (также известный как AAVS1), ген CLYBL и/или ген Rosa (*например*, ROSA26). В контексте данного документа «целевой локус» относится к генному локусу, который обеспечивает экспрессию трансгена или экзогенного гена. Типовые «целевые локусы» включают, но не ограничиваются этим, ген CXCR4, ген альбумина, локус SHS231, ген F3 (также известный как CD142), ген MICA, ген MICB, ген LRP1 (также известный как CD91), ген HMGB1, ген ABO, ген RHD, ген FUT1 и/или ген KDM5D (также известный как HY). Экзогенный полинуклеотид, кодирующий экзогенный ген, можно вставлять в область CDS в случае B2M, CIITA, TRAC, TRBC, CCR5, F3 (*т. е.* CD142), MICA, MICB, LRP1, HMGB1, ABO,

RHD, FUT1, KDM5D (*m. e.* HY), PDGFRa, OLIG2 и/или GFAP. Экзогенный полинуклеотид, кодирующий экзогенный ген, можно вставлять в интроны 1 или 2 в случае PPP1R12C (*m. e.* AAVS1) или CCR5. Экзогенный полинуклеотид, кодирующий экзогенный ген, можно вставлять в экзоны 1, 2 или 3 в случае CCR5. Экзогенный полинуклеотид, кодирующий экзогенный ген, можно вставлять в интрон 2 в случае CLYBL. Экзогенный полинуклеотид, кодирующий экзогенный ген, можно вставлять в 500 п. о. окно в Ch-4:58,976,613 (*m. e.* SHS231). Экзогенный полинуклеотид, кодирующий экзогенный ген, можно вставлять в любую подходящую область вышеупомянутых безопасных или целевых локусов, которые обеспечивают экспрессию экзогенного гена, включая, например, область интрона, экзона или кодирующей последовательности в безопасном или целевом локусе.

[00399] В контексте настоящего документа термин «целевой» может относиться к гену, части гена, части генома или белку, которые подвергаются регулируемой сниженной экспрессии с помощью способов, описанных в настоящем документе.

[00400] В контексте настоящего документа «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, достаточному для обеспечения терапевтической пользы при лечении и/или ведении заболевания, расстройства или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для ослабления, облегчения, стабилизации, реверсии, замедления, уменьшения или задержки прогрессирования заболевания, расстройства или патологического состояния, или же симптома или побочного эффекта заболевания, расстройства или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество также представляет собой клинически эффективное количество. В других вариантах осуществления терапевтически эффективное количество не представляет собой клинически эффективное количество.

[00401] В контексте настоящего документа термин «лечение» включает в себя введение субъекту терапевтически или клинически эффективного количества описанных в настоящем документе клеток так, чтобы у субъекта наблюдалось ослабление по меньшей мере одного симптома заболевания или улучшение в заболевании, например, благоприятные или желаемые терапевтические или клинические результаты. В целях этой технологии благоприятные или желаемые терапевтические или клинические результаты включают в себя, помимо прочего, облегчение одного или более симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (*m. e.* отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, ослабление или облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), выявляемые или невыявляемые. Лечение может относиться к продлению выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения. Таким образом, специалист в данной области техники понимает, что лечение может улучшить болезненное состояние, но может не обеспечивать полное излечение заболевания. В некоторых вариантах

осуществления после лечения патологического состояния, заболевания или нарушения происходит облегчение одного или большего количества симптомов патологического состояния, заболевания или нарушения на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%.

[00402] В целях этой технологии благоприятные или желаемые терапевтические или клинические результаты лечения заболевания включают в себя, помимо прочего, облегчение одного или большего количества симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (*m. e.* отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, ослабление или облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), выявляемые или невыявляемые.

[00403] «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 внесения векторов или конструкций в клетки известны специалистам в данной области техники и включают в себя, помимо прочего, липид-опосредованный перенос (*m. e.* липосомы, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние клеток, бомбардировку частицами, соосаждение фосфатом кальция, опосредованный ДЭАЭ-декстраном перенос и/или опосредованный вирусным вектором перенос.

[00404] В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы так, чтобы иметь сниженную или повышенную экспрессию одной или большего количества мишеней по сравнению с неизмененной или немодифицированной клеткой дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы так, чтобы иметь конститутивную сниженную или повышенную экспрессию одной или большего количества мишеней по сравнению с неизмененной или немодифицированной клеткой дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы так, чтобы иметь регулируемую сниженную или повышенную экспрессию одной или большего количества мишеней по сравнению с неизмененной или немодифицированной клеткой дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клетки имеют повышенную экспрессию CD47 по сравнению с клеткой дикого типа или контрольной клеткой такого же клеточного типа. Под «диким типом», или «дт», или «контрольной» в контексте клетки подразумевается любая клетка, встречающаяся в природе. Примеры клеток дикого типа или контрольных клеток включают в себя первичные клетки и Т-клетки, встречающиеся в природе. Однако, в качестве примера, в контексте сконструированной клетки, как используется в настоящем документе, «дикого типа» или «контрольная» может также

означать сконструированную клетку, которая может содержать изменения в нуклеиновой кислоте, приводящие к снижению экспрессии одной или более молекул ГКГС класса I и/или молекул класса II, и/или Т-клеточных рецепторов, однако которая не подвергалась процедурам генного редактирования, приводящим к сверхэкспрессии белков CD47. Например, в контексте настоящего документа «дикого типа» или «контрольная» означает сконструированную клетку, которая имеет сниженную или нокаутированную экспрессию B2M, CIITA и/или TRAC. Также в контексте настоящего документа «дикого типа» или «контрольная» означает сконструированную клетку, которая имеет сниженную или нокаутированную экспрессию B2M, CIITA, TRAC и/или TRBC. В контексте настоящего документа «дикого типа» или «контрольная» также означает сконструированную клетку, которая может содержать изменения в нуклеиновой кислоте, приводящие к сверхэкспрессии белков CD47, однако которая не подвергалась процедурам генного редактирования, приводящим к снижению экспрессии одной или более молекул ГКГС класса I и/или класса II, и/или Т-клеточных рецепторов. В контексте iPSC или ее потомства «дикого типа» или «контрольная» также означает iPSC или ее потомство, которые могут содержать изменения в нуклеиновой кислоте, приводящие к плюрипотентности, однако которые не подвергались процедурам генного редактирования по настоящему изобретению для обеспечения сниженной экспрессии одной или более молекул ГКГС класса I и/или класса II, и/или Т-клеточных рецепторов и/или сверхэкспрессии белков CD47. Например, в контексте настоящего документа «дикого типа» или «контрольная» означает iPSC или ее потомство, которые имеют сниженную или нокаутированную экспрессию B2M, CIITA и/или TRAC. Также в контексте настоящего документа «дикого типа» или «контрольная» означает iPSC или ее потомство, которые имеют сниженную или нокаутированную экспрессию B2M, CIITA, TRAC и/или TRBC. В контексте первичной Т-клетки или ее потомства «дикого типа» или «контрольная» также означает первичную Т-клетку или ее потомство, которые могут содержать изменения в нуклеиновой кислоте, приводящие к снижению экспрессии одной или более молекул ГКГС класса I и/или класса II, и/или Т-клеточных рецепторов, однако которые не подвергались процедурам генного редактирования, приводящим к сверхэкспрессии белков CD47. Например, в контексте настоящего документа «дикого типа» или «контрольная» означает первичную Т-клетку или ее потомство, которые имеют сниженную или нокаутированную экспрессию B2M, CIITA и/или TRAC. Также в контексте настоящего документа «дикого типа» или «контрольная» означает первичную Т-клетку или ее потомство, которые имеют сниженную или нокаутированную экспрессию B2M, CIITA, TRAC и/или TRBC. Также в контексте первичной Т-клетки или ее потомства «дикого типа» или «контрольная» также означает первичную Т-клетку или ее потомство, которые могут содержать изменения в нуклеиновой кислоте, приводящие к сверхэкспрессии белков CD47, однако которые не подвергались процедурам генного редактирования, приводящим к снижению экспрессии одной или более молекул ГКГС класса I и/или класса II, и/или Т-клеточных рецепторов. В некоторых вариантах

осуществления клетки сконструированы так, чтобы иметь регулируемую сниженную или повышенную экспрессию одной или большего количества мишеней по сравнению с клеткой такого же клеточного типа, которая не содержит модификаций. В некоторых вариантах осуществления клетка дикого типа или контрольная клетка представляют собой исходный материал. В некоторых вариантах осуществления исходный материал является модифицированным или сконструированным таким образом, чтобы иметь измененную экспрессию одного или более генов для создания сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка получена из того же исходного материала, что и описанная в данном документе клетка. В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка получена из эталонного исходного материала. В некоторых вариантах осуществления исходный материал получен от одного донора. В некоторых вариантах осуществления исходный материал получен от пула доноров.

[00405] В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы так, чтобы они экспрессировали большее количество толерогенного фактора по сравнению с контролем. Термин «контроль», используемый в данном документе, может использоваться в контексте клетки, популяции клеток, образца или измерения. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы так, чтобы экспрессировать большее количество толерогенного фактора по сравнению с контрольной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы так, чтобы они экспрессировали большее количество толерогенного фактора по сравнению с популяцией контрольных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы так, чтобы они экспрессировали большее количество толерогенного фактора по сравнению с контрольным образцом. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы так, чтобы они экспрессировали большее количество толерогенного фактора по сравнению с контрольным измерением, включая, помимо прочего, эталон исходного уровня или контрольный сигнал в анализе или тесте. Используемый в данном документе термин «эталон исходного уровня» относится к любому подходящему эталонному значению или уровню сигнала, известному специалистам в данной области техники с учетом данного изобретения, включая те, которые используются в примерах, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эталон исходного уровня относится к контрольному уровню, а в некоторых уровнях - к нормальному уровню экспрессии, с которым можно сравнивать исследуемый уровень экспрессии. В некоторых вариантах осуществления эталон исходного уровня относится к контрольному или фоновому уровню, который подходит для конкретного используемого теста или анализа. В некоторых вариантах осуществления эталон исходного уровня относится к контрольному сигналу, включая, помимо прочего, значение изотипического контроля из любого подходящего теста или анализа, известного в данной области техники, который можно использовать для оценки уровней экспрессии. В некоторых вариантах осуществления эталон исходного уровня относится к фоновому сигналу из любого подходящего теста или анализа, известного в данной области техники, который

можно использовать для оценки уровней экспрессии. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать толерогенный фактор на пороговом или более высоком уровне. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы таким образом, чтобы они экспрессировали CD47 на пороговом или более высоком уровне. Порог можно определить с использованием любого подходящего способа, известного специалистам в данной области техники, с учетом описания, включая, например, способы, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эталон исходного уровня специфичен для сконструированной клетки или популяции клеток, содержащей сконструированную клетку.

[00406] 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 представленной технологии. Любой изложенный способ можно выполнять в порядке изложения событий или в любом другом логически возможном порядке. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, также можно использовать при практической реализации или тестировании настоящего изобретения, далее описаны репрезентативные иллюстративные способы и материалы.

[00407] 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 данное описание. В случае, когда приведен диапазон значений, следует понимать, что настоящее изобретение 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 охватываются настоящим изобретением с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. В тех случаях, когда указанный диапазон включает в себя один или оба предела, в настоящее изобретение также включаются диапазоны, исключающие один или оба таких включенных предела. Определенные диапазоны представлены в настоящем документе числовыми значениями, которым предшествует термин «около». В контексте настоящего 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. В контексте настоящего документа термин «около» означает плюс или минус десять процентов (10%) от значения. Например, «около 100» относится к любому числу в диапазоне от 90 до 110.

[00408] Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в этом описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как 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.

[00409] Перед тем как продолжить описание данной технологии, необходимо понять, что данная технология не ограничена конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Следует также понимать, что употребляемая в настоящем документе терминология применяется только для описания конкретных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего раскрытия ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Также следует понимать, что используемые в настоящем документе заголовки не являются ограничивающими и предназначены исключительно для того, чтобы читатель мог легко ориентироваться, но предмет изобретения в общем случае распространяется на описанную в настоящем документе технологию.

Подробное описание сущности изобретения

Гипоиммуногенные клетки

[00410] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к сконструированным (*например*, модифицированным и генетически модифицированным) клеткам, которые содержат регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с клеткой тот же типа клеток, которая не содержит модификаций, при этом регулируемая сниженная экспрессия осуществляется посредством компонента на основе РНК, компонента на основе ДНК или белкового компонента, и/или ii) увеличивают экспрессию первого экзогенного полинуклеотида, кодирующего один или

более толерогенных факторов, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций, при этом регулируемая сверхэкспрессия осуществляется посредством условного или индуцируемого промотора. В некоторых вариантах осуществления клетки способны избегать активации иммунных ответов, опосредованных NK-клетками и/или на основе антител.

[00411] В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, их дифференцированные клетки любого типа, первичные иммунные клетки и другие первичные клетки любой ткани. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки представляют собой сердечные клетки и их субпопуляции, нервные клетки и их субпопуляции, церебральные эндотелиальные клетки и их субпопуляции, дофаминергические нейроны и их субпопуляции, глиальные клетки-предшественники и их субпопуляции, эндотелиальные клетки и их субпопуляции, клетки щитовидной железы и их субпопуляции, гепатоциты и их субпопуляции, островковые клетки поджелудочной железы и их субпопуляции или клетки пигментированного эпителия сетчатки и их субпопуляции. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки представляют собой Т-клетки и их субпопуляции, NK-клетки и их субпопуляции. В некоторых вариантах осуществления первичными иммунными клетками являются Т-клетки и их субпопуляции и NK-клетки и их субпопуляции. В некоторых вариантах осуществления первичные тканевые клетки включают первичные эндотелиальные клетки и их субпопуляции.

[00412] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемую сниженную экспрессию одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций, при этом регулируемая сниженная экспрессия осуществляется посредством компонента на основе РНК. В некоторых вариантах осуществления компонент на основе РНК выбран из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления компонент на основе РНК находится под контролем условного промотора, при этом условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор и промотор, индуцируемый дифференциацией. В некоторых вариантах осуществления компонент на основе РНК находится под контролем индуцируемого промотора, при этом индуцируемый промотор регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[00413] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемую сниженную экспрессию одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по

сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций, при этом регулируемая сниженная экспрессия осуществляется посредством компонента на основе ДНК. В некоторых вариантах осуществления компонент на основе ДНК представляет собой нокаут или нокдаун с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления компонент на основе ДНК находится под контролем условного промотора, при этом условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор и промотор, индуцируемый дифференциацией. В некоторых вариантах осуществления компонент на основе ДНК находится под контролем индуцируемого промотора, при этом индуцируемый промотор регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[00414] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемую сниженную экспрессию одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций, при этом регулируемая сниженная экспрессия осуществляется посредством белкового компонента. В некоторых вариантах осуществления белковый компонент представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона. В некоторых вариантах осуществления способ дегрона выбран из группы, состоящей из индуцированной лигандом деградации (LID) с использованием метки SMASH, LID с использованием Shield-1, LID с использованием ауксина, LID с использованием рапамицина, условных или индуцируемых пептидных дегронов (*например*, дегронов на основе IKZF3) и условных или индуцируемых химер, нацеленных на протеолиз (PROTAC). В некоторых вариантах осуществления белковый компонент находится под контролем условного промотора, при этом условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор и промотор, индуцируемый дифференциацией. В некоторых вариантах осуществления белковый компонент находится под контролем индуцируемого промотора, при этом индуцируемый промотор регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[00415] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемую сверхэкспрессию первого экзогенного полинуклеотида, кодирующего один или более толерогенных ифакторов, при этом регулируемая сверхэкспрессия осуществляется посредством условного или индуцируемого промотора. В некоторых вариантах осуществления регулируемая

сверхэкспрессия осуществляется с помощью условного промотора, при этом условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор и промотор, индуцируемый дифференциацией. В некоторых вариантах осуществления регулируемая сверхэкспрессия осуществляется с помощью индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом или биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[00416] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к плюрипотентным стволовым клеткам (*например*, плюрипотентным стволовым клеткам и индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам (iPSC)), дифференцированным клеткам, полученным из таких плюрипотентных стволовых клеток (таких как, помимо прочего, Т-клетки, NK-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментированного эпителия сетчатки) и первичным клеткам (таким как, помимо прочего, первичные Т-клетки и первичные NK-клетки). В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, полученные из них дифференцированные клетки, такие как Т-клетки, NK-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментированного эпителия сетчатки, и первичные клетки, такие как первичные Т-клетки и первичные NK-клетки, сконструированы для регулируемой сниженной экспрессии или регулируемого отсутствия экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и в некоторых случаях для регулируемого снижения экспрессии или регулируемого отсутствия экспрессии комплекса Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и необязательно регулируемо сверхэкспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR) в дополнение к (i) регулируемому снижению экспрессии или регулируемому отсутствию экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и (ii) регулируемому снижению экспрессии или регулируемому отсутствию экспрессии комплекса Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с любым, выбранным из группы, состоящей из CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CD19-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CD22-специфический CAR. В некоторых случаях CAR представляет собой CD38-специфический CAR. В некоторых

вариантах осуществления CAR представляет собой CD123-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CD138-специфический CAR. В некоторых случаях CAR представляет собой BCMA-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой биспецифический CAR. В некоторых вариантах осуществления биспецифический CAR представляет собой CD19/CD22-биспецифический CAR. В некоторых вариантах осуществления биспецифический CAR представляет собой BCMA/CD38-биспецифический CAR. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки экспрессируют CD19-специфический CAR и другой CAR, такой как, помимо прочего, CD22-специфический CAR, CD38-специфический CAR, CD123-специфический CAR, CD138-специфический CAR и BCMA-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки экспрессируют CD22-специфический CAR и другой CAR, такой как, помимо прочего, CD19-специфический CAR, CD38-специфический CAR, CD123-специфический CAR, CD138-специфический CAR и BCMA-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки экспрессируют CD38-специфический CAR и другой CAR, такой как, помимо прочего, CD22-специфический CAR, CD18-специфический CAR, CD123-специфический CAR, CD138-специфический CAR и BCMA-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки экспрессируют CD123-специфический CAR и другой CAR, такой как, помимо прочего, CD22-специфический CAR, CD38-специфический CAR, CD19-специфический CAR, CD138-специфический CAR и BCMA-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки экспрессируют CD138-специфический CAR и другой CAR, такой как, помимо прочего, CD22-специфический CAR, CD38-специфический CAR, CD123-специфический CAR, CD19-специфический CAR и BCMA-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки экспрессируют BCMA-специфический CAR и другой CAR, такой как, помимо прочего, CD22-специфический CAR, CD38-специфический CAR, CD123-специфический CAR, CD138-специфический CAR и CD19-специфический CAR.

[00417] В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные клетки, полученные из iPSC, такие как, помимо прочего, Т-клетки, NK-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментного эпителия сетчатки, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена B2M. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные клетки, полученные из iPSC, такие как, помимо прочего, Т-клетки, NK-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментного эпителия сетчатки, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемую геномную модификацию или

регулируемый нокаут или нокдаун гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки

являются регулируемыми *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRBC*, *CD47tg*, которые также

экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*.

[00418] В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные клетки, полученные из iPSC, получают путем дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, таких как гипоиммуногенные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[00419] В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные клетки, полученные из ESC, такие как, помимо прочего, Т-клетки, NK-клетки, сердечные клетки, нервные

клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментного эпителия сетчатки, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена B2M. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные клетки, полученные из ESC, такие как, помимо прочего, Т-клетки, NK-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментированного эпителия сетчатки, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$

, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления

клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах

осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные клетки, полученные из iPSC, получают путем дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, таких как гипоиммуногенные эмбриональные стволовые клетки.

[00420] В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют один или более толерогенных факторов и химерный антигенный рецептор (CAR), и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена B2M. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют один или более толерогенных факторов и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют один или более толерогенных факторов и CAR, и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена TRAC. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют один или более толерогенных факторов и CAR, и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена TRB. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют один или более толерогенных факторов и CAR, и включают одну или более регулируемых геномных модификаций или регулируемых нокаутов или нокдаунов, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, CIITA TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют один или более толерогенных факторов и CAR, и включают регулируемые геномные модификации или регулируемые нокауты или нокдауны генов B2M, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и химерный антигенный рецептор (CAR), и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена B2M. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR, и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена TRAC. В некоторых вариантах

осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR, и включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокаут или нокдаун гена TRB. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR, и включают одну или более регулируемых геномных модификаций или регулируемых нокаутов или нокдаунов, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, CIITA TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR, и включают регулируемые геномные модификации или регулируемые нокауты или нокдауны генов B2M, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$,

TRAC$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В

некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*.

В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки получают путем дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, таких как гипоиммуногенные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[00421] В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки, полученные из iPSC и первичных Т-клеток, являются регулируемыми $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также

экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR.

[00422] В некоторых вариантах осуществления описанные сконструированные или модифицированные клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, NK-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, Т-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, или первичные Т-клетки. Неограничивающие примеры первичных Т-клеток включают в себя CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, наивные Т-клетки, регуляторные Т-клетки (Treg), нерегуляторные Т-клетки, Th1-клетки, Th2-клетки, Th9-клетки, Th17-клетки, фолликулярные Т-хелперы (Tfh), цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), эффекторные Т-клетки (Teff), центральные Т-клетки памяти (Tcm), эффекторные Т-клетки памяти (Tem), эффекторные Т-клетки памяти, которые экспрессируют CD45RA (клетки TEMRA), резидентные клетки памяти (Trm), Т-клетки виртуальной памяти, Т-клетки врожденной памяти, стволовые клетки памяти (Tsc), γδ Т-клетки и любые другие подтипы Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки выбраны из группы, которая включает цитотоксические Т-клетки, хелперные Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты и их комбинации. Неограничивающие примеры NK-клеток и первичных NK-клеток включают в себя незрелые NK-клетки и зрелые NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки являются модифицированными или сконструированными по сравнению с клетками дикого типа или контрольными клетками, включая неизмененные или немодифицированные клетки дикого типа или контрольные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка дикого типа

или контрольная клетка представляют собой исходный материал. В некоторых вариантах осуществления исходный материал является модифицированным или сконструированным таким образом, чтобы иметь измененную экспрессию одного или более генов для создания сконструированных клеток.

[00423] В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки получены из пула первичных Т-клеток от одного или более субъектов-доноров, которые отличаются от субъекта-реципиента (например, пациента, которому вводят клетки). Первичные Т-клетки могут быть получены от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100 или более субъектов-доноров и объединены вместе. Первичные Т-клетки могут быть получены от 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10, или более 20 или более, 50 или более или 100 или более субъектов-доноров и объединены вместе. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки получают от одного или нескольких индивидуумов, 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 регулируемо экзогенной экспрессии CD47 и культивируются in vitro.

[00424] Во многих вариантах осуществления первичные Т-клетки или пул первичных Т-клеток сконструированы для регулируемой экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). CAR может представлять собой любой CAR, известный специалистам в данной области техники. Применимые CAR включают в себя те, которые связывают антиген, выбранный из группы, которая включает в себя CD19, CD20, 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, те, которые использовались в тисагенлеклейселе и аксикабтаген цилолейцеле, или других, которые проходят клинические испытания.

[00425] В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки или пул первичных Т-клеток конструируют для регулируемо сниженной экспрессии эндогенного Т-клеточного рецептора по сравнению с немодифицированными первичными Т-клетками. В определенных вариантах осуществления первичные Т-клетки или пул первичных Т-клеток сконструированы так, чтобы они проявляли сниженную экспрессию CTLA-4, PD-1 или и CTLA-4, и PD-1 по сравнению с немодифицированными первичными Т-клетками. Способы генетической модификации клетки, включая Т-клетку, подробно описаны, например, в WO2020/018620 и WO2016/183041, полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки, включая таблицы, приложения, перечни последовательностей и фигуры.

[00426] В некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетки содержат CAR, выбранный из группы, включающей в себя: (a) CAR первого поколения, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен; (b) CAR второго поколения, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и

по меньшей мере два сигнальных домена; (c) CAR третьего поколения, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и (d) CAR четвертого поколения, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

[00427] В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетки содержат CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и один или большее количество сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления CAR также содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен CD28 или CD8α. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит сигнальный пептид CD8α. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит линкер Уитлоу GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:15). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR выбран из группы, включающей, но не ограничивающейся этим, (a) антигенсвязывающий домен, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки; (b) антигенсвязывающий домен, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки; (c) антигенсвязывающий домен, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства; (d) антигенсвязывающий домен, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток; (e) антигенсвязывающий домен, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и (f) антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

[00428] В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит один или более линкеров. Формат scFv в общем случае представляет собой два вариабельных домена, соединенных гибкой пептидной последовательностью или «линкером» в любой из ориентаций VH-линкер-VL или VL-линкер-VH. В CAR можно использовать любой подходящий линкер, известный специалистам в данной области техники, принимая во внимание описание. Примеры подходящих линкеров включают, но не ограничиваются этим, линкерную последовательность на основе GS и линкер Уитлоу GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:15). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер GS или gly-ser. Типовые линкеры на основе полипептида gly-ser содержат аминокислотную последовательность $Ser(Gly_4Ser)_n$, а также $(Gly_4Ser)_n$ и/или $(Gly_4Ser_3)_n$. В некоторых вариантах осуществления n=1. В некоторых вариантах осуществления n=2. В некоторых вариантах осуществления n=3, т. е. $Ser(Gly_4Ser)_3$. В некоторых вариантах осуществления n=4, т. е. $Ser(Gly_4Ser)_4$. В некоторых вариантах осуществления n=5. В некоторых вариантах осуществления n=6. В некоторых вариантах осуществления n=7. В некоторых вариантах осуществления n=8. В некоторых вариантах осуществления n=9. В некоторых вариантах осуществления n=10. Другой типовой линкер на основе полипептида gly-ser содержит аминокислотную

последовательность $Ser(Gly_4Ser)_n$. В некоторых вариантах осуществления n=1. В некоторых вариантах осуществления n=2. В некоторых вариантах осуществления n=3. В другом варианте осуществления n=4. В некоторых вариантах осуществления n=5. В некоторых вариантах осуществления n=6. Другой типовой линкер на основе полипептида gly-ser содержит (Gly4Ser)n. В некоторых вариантах осуществления n=1. В некоторых вариантах осуществления n=2. В некоторых вариантах осуществления n=3. В некоторых вариантах осуществления n=4. В некоторых вариантах осуществления n=5. В некоторых вариантах осуществления n=6. Другой типовой линкер на основе полипептида gly-ser содержит $(Gly_3Ser)_n$. В некоторых вариантах осуществления n=1. В некоторых вариантах осуществления n=2. В некоторых вариантах осуществления n=3. В некоторых вариантах осуществления n=4. В другом варианте осуществления n=5. В другом варианте осуществления n=6. Другой типовой линкер на основе полипептида gly-ser содержит $(Gly_4Ser_3)_n$. В некоторых вариантах осуществления n=1. В некоторых вариантах осуществления n=2. В некоторых вариантах осуществления n=3. В некоторых вариантах осуществления n=4. В некоторых вариантах осуществления n=5. В некоторых вариантах осуществления n=6. Другой типовой линкер на основе полипептида gly-ser содержит $(Gly_3Ser)_n$. В некоторых вариантах осуществления n=1. В некоторых вариантах осуществления n=2. В некоторых вариантах осуществления n=3. В некоторых вариантах осуществления n=4. В другом варианте осуществления n=5. В другом варианте осуществления n=6.

[00429] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, которая включает в себя антитело, его антигенсвязывающие часть или фрагмент, scFv и Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22, CD38, CD123, CD138 или BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой scFv против CD19, такой как, помимо прочего, FMC63.

[00430] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит домен, выбранный из группы, которая включает в себя трансмембранную область TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и ее функциональный вариант.

[00431] В некоторых вариантах осуществления сигнальный(е) домен(ы) CAR содержат костимулирующий(е) домен(ы). Например, сигнальный домен может содержать костимулирующий домен. Или сигнальный домен может содержать один или большее количество костимулирующих доменов. В определенных вариантах осуществления сигнальный домен содержит костимулирующий домен. В других вариантах осуществления сигнальные домены содержат костимулирующие домены. В некоторых случаях, когда CAR содержит два или большее количество костимулирующих доменов, два костимулирующих домена не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены содержат два костимулирующих домена,

которые не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен повышает выработку цитокинов, пролиферацию CAR-T-клеток и/или персистенцию CAR-T-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены повышают выработку цитокинов, пролиферацию CAR-T-клеток и/или персистенцию CAR-T-клеток во время активации Т-клеток.

[00432] Как описано в данном документе, CAR четвертого поколения может содержать антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина. В некоторых случаях ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный ген цитокина гипоиммуногенных клеток. В некоторых случаях ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин выбран из группы, которая включает в себя IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, содержит транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

[00433] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен CD3 дзета (CD3ζ), или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (immunoreceptor tyrosine-based activation motif - ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета, или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28, или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен CD134 или домен 4-1BB или их функциональный вариант. В определенных вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета, или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB, или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) scFv против CD19; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

[00434] Способы введения конструкции CAR или получения CAR-T-клеток хорошо известны специалистам в данной области техники. Подробное описание можно найти, например, в Vormittag *et al.*, Curr Opin Biotechnol, 2018, 53, 162-181; и Eyquem *et al.*, Nature, 2017, 543, 113-117.

[00435] В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора, например,

за счет разрушения эндогенного гена Т-клеточного рецептора (*например*, константной области Т-клеточного рецептора альфа (TRAC) или константной области Т-клеточного рецептора бета (TRB)). В некоторых вариантах осуществления экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный в настоящем документе полипептид (*например*, химерный антигенный рецептор, CD47 или другой толерогенный фактор, описанный в настоящем документе), вставляют в разрушенный ген Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, вставляют в локус гена TRAC или TRB.

[00436] В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA4) и/или белка запрограммированной гибели клеток (PD1). Способы снижения или устранения экспрессии CTLA4, PD1 и как CTLA4, так и PD1 могут включать в себя любые, известные специалистам в данной области техники, такие как, помимо прочего, технологии генетических модификаций, в которых используют редкощепящие эндонуклеазы и технологии сайленсинга РНК или РНК-интерференции. Неограничивающие примеры редкощепящих эндонуклеаз включают в себя любой белок Cas, TALEN, цинк-пальцевую нуклеазу, мегануклеазу и/или хоминг-эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный в настоящем документе полипептид (*например*, химерный антигенный рецептор, CD47 или другой толерогенный фактор, описанный в настоящем документе), вставляют в локус гена CTLA4 и/или PD1.

[00437] В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов с регулируемой экспрессией, вставляют в заранее выбранный локус клетки. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий CAR, вставляют в предварительно выбранный локус клетки. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов с регулируемой экспрессией, и трансген, кодирующий CAR, вставляют в заранее выбранный локус клетки. Предварительно выбранный локус может представлять собой безопасный локус или целевой локус. Неограничивающие примеры безопасных локусов включают в себя, помимо прочего, локус гена CCR5, локус гена PPP1R12C (также известный как AAVS1), локус гена CLYBL, локус гена Rosa (*например*, локус гена ROSA26). Неограничивающие примеры целевого локуса включают в себя, помимо прочего, локус гена CXCR4, локус гена альбумина, локус гена SHS231, локус гена F3 (также известный как CD142), локус гена MICA, локус гена MICB, локус гена LRP1 (также известный как локус гена CD91), локус гена HMGB1, локус гена ABO, локус гена RHD, локус гена FUT1 и локус гена KDM5D. Трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, может быть вставлен в интроны 1 или 2 в случае PPP1R12C (*то есть*, AAVS1) или CCR5. Трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, может быть вставлен в интроны 1 или 2 в случае PPP1R12C (*то есть*, AAVS1) или CCR5. Трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, может быть вставлен в

экзоны 1, 2 или 3 в случае CCR5. Трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, может быть вставлен в интрон 2 в случае CLYBL. Трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, может быть вставлен в окно размером 500 п.н. в Ch-4: 58,976,613 (*то есть*, SHS231). Трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, может быть вставлен в любую подходящую область вышеупомянутых безопасных или целевых локусов, которые обеспечивают экспрессию кодирующий один или более толерогенных факторов, включая, например, область интрона, экзона или кодирующей последовательности в безопасном или целевом локусе. В некоторых вариантах осуществления предварительно выбранный локус выбран из группы, состоящей из локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*. В некоторых вариантах осуществления предварительно выбранный локус представляет собой локус *B2M*. В некоторых вариантах осуществления предварительно выбранный локус представляет собой локус *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления предварительно выбранный локус представляет собой локус *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления предварительно выбранный локус представляет собой локус *TRB*.

[00438] В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов с регулируемой экспрессией, и трансген, кодирующий CAR, вставляют в тот же локус. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов с регулируемой экспрессией, и трансген, кодирующий CAR, вставляют в разные локусы. Во многих случаях трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставляют в безопасный локус или целевой локус. Во многих случаях трансген, кодирующий CAR, вставляют в безопасный или целевой локус. В некоторых случаях трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставляют в локус *B2M*. В некоторых случаях трансген, кодирующий CAR, вставляют в локус *B2M*. В некоторых случаях трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, встраивают в локус *CIITA*. В определенных случаях трансген, кодирующий CAR, вставляют в локус *CIITA*. В конкретных случаях трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, встраивают в локус *TRAC*. В конкретных случаях трансген, кодирующий CAR, вставляют в локус *TRAC*. Во многих других случаях трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, встраивают в локус *TRB*. Во многих других случаях трансген, кодирующий CAR, вставляют в локус *TRB*. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, вставляют в безопасный или целевой локус, *например*, локус гена CCR5, локус гена CXCR4, локус гена PPP1R12C, локус гена альбумина, локус гена SHS231, локус гена CLYBL, локус гена Rosa, локус гена F3 (CD142), локус гена MICA, локус гена MICB, локус гена LRP1 (CD91), локус гена HMGB1, локус гена ABO, локус гена RHD, локуса ген FUT1 и локус гена KDM5D.

[00439] Во многих вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов с регулируемой экспрессией, и трансген, кодирующий

CAR, вставляют в безопасный локус или целевой локус В определенных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов с регулируемой экспрессией, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением одного промотора и вставлены в безопасный или целевой локус. В определенных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов с регулируемой экспрессией, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением своих собственных промоторов и вставлены в безопасный или целевой локус. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, вставляют в локус *TRAC*. В определенных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением одного промотора и вставлены в локус *TRAC*. В определенных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением своих собственных промоторов и вставлены в локус *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, вставляют в локус *TRB*. В определенных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением одного промотора и вставлены в локус *TRB*. В определенных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением своих собственных промоторов и вставлены в локус *TRB*. В других вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, вставляют в локус *B2M*. В других вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением одного промотора и вставлены в локус *B2M*. В других вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением своих собственных промоторов и вставлены в локус *B2M*. В различных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, вставляют в локус *CIITA*. В различных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением одного промотора и вставлены в локус *CIITA*. В различных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, находятся под управлением своих собственных промоторов и вставлены в локус *CIITA*.

[00440] В некоторых случаях промотор, управляющий экспрессией любого описанного трансгена, представляет собой конститутивный промотор. В некоторых случаях промотор, контролирующий экспрессию любого описанного трансгена, представляет собой условный промотор. В некоторых случаях промотор для любого описанного трансгена представляет собой индуцибельный промотор. В некоторых

вариантах осуществления промотор представляет собой промотор EF1α. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CAG. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется конститутивным промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется условным промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется специфичным для клеточного цикла промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется тканеспецифичным промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется специфичным для линии промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется индуцируемым дифференциацией промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется индуцируемым промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется индуцируемым промотором, который регулируется малой молекулой. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется индуцируемым промотором, который регулируется лигандом. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется индуцируемым промотором, который регулируется биологическим агентом. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется индуцируемым промотором, который регулируется опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется индуцируемым промотором, который регулируется рибопереключателем, регулируемым аптамером. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR находится под управлением конститутивного промотора. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR находится под управлением условного промотора. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR контролируется специфичным для клеточного цикла промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR контролируется тканеспецифичным промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR контролируется специфичным для линии промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR контролируется индуцируемым дифференциацией промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR контролируется индуцируемым промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR контролируется индуцируемым промотором, который регулируется малой молекулой. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR контролируется индуцируемым промотором, который регулируется лигандом. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR

контролируется индуцируемым промотором, который регулируется биологическим агентом. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR контролируется индуцируемым промотором, который регулируется опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления трансген CAR контролируется индуцируемым промотором, который регулируется рибопереключателем, регулируемым аптамером. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, оба контролируются условным промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и трансген, кодирующий CAR, оба находятся под управлением индуцибельного промотора. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется конститутивным промотором, а трансген, кодирующий CAR, контролируется индуцируемым промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется конститутивным промотором, а трансген, кодирующий CAR, контролируется условным промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется условным промотором, а трансген, кодирующий CAR, контролируется индуцируемым промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется условным промотором, а трансген, кодирующий CAR, контролируется конститутивным промотором. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется индуцируемым промотором, а трансген, кодирующий CAR, контролируется условным промотором. В различных вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется промотором EF1α, а трансген, кодирующий CAR, контролируется промотором EF1α. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется промотором CAG, а трансген, кодирующий CAR, контролируется промотором CAG. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется промотором CAG, а трансген, кодирующий CAR, контролируется промотором EF1α. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, контролируется промотором EF1α, а трансген, кодирующий CAR, контролируется промотором CAG. В некоторых вариантах осуществления экспрессия как трансгена, кодирующего один или несколько толерогенных факторов, так и трансгена, кодирующего CAR, контролируется одним промотором EF1α. В некоторых вариантах осуществления экспрессия как трансгена, кодирующего один или более толерогенных факторов, так и трансгена, кодирующего CAR, контролируется одним промотором CAG.

[00441] В другом варианте осуществления данное изобретение, описанное в данном документе, относится к плюрипотентным стволовым клеткам, (*например*,

плюрипотентным стволовым клеткам и индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам (iPSCs)), дифференцированным клеткам, полученным из таких плюрипотентных стволовых клеток (*например*, гипоиммунным Т-клеткам, сердечным клеткам, нервным клеткам, церебральным эндотелиальным клеткам, дофаминергическим нейронам, глиальным клеткам-предшественникам, эндотелиальным клеткам, клеткам щитовидной железы, гепатоцитам, островковым клеткам поджелудочной железы и клеткам пигментированного эпителия сетчатки), а также первичным Т-клеткам, регулируемо экзогенно экспрессируют белки CD47 (например, регулируемая экзогенная экспрессия белков CD47), имеют регулируемую сниженную экспрессию или отсутствие экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и имеют регулируемую сниженную экспрессию или отсутствие экспрессии комплекса Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 (например, регулируемо экзогенно экспрессируют белки CD47), имеют регулируемую сниженную экспрессию или отсутствие экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и имеют регулируемую сниженную экспрессию или отсутствие экспрессии комплекса Т-клеточного рецептора (TCR).

[00442] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки (*например*, плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC)), дифференцированные клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток (*например*, гипоиммунные Т-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментированного эпителия сетчатки), и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемую геномную модификацию гена B2M. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток, и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемую геномную модификацию гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток, таких как, помимо прочего, Т-клетки, NK-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки. клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментированного эпителия сетчатки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления

клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах

осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRBC* $^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M* $^{индел/индел}$, *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRAC* $^{индел/индел}$, *TRBC* $^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M* $^{индел/индел}$, *TRAC* $^{индел/индел}$, *TRBC* $^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRAC* $^{индел/индел}$, *TRBC* $^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, Т-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток, и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемую геномную модификацию гена TRAC. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, Т-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток, и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемую геномную модификацию гена TRB. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, Т-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток, и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают одну или более регулируемых геномных модификаций, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, Т-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток, и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемые геномные модификации генов B2M, CIITA и TRAC. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, Т-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток, и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемые геномные модификации генов B2M, CIITA и TRB. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, Т-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток, и первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и включают регулируемые

геномные модификации генов B2M, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток, и первичные Т-клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются

регулируемыми *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются *B2M*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах

осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления описанные сконструированные или модифицированные клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки (*например*, эмбриональные стволовые клетки или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки), Т-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток, или первичные Т-клетки. Неограничивающие

примеры первичных Т-клеток включают в себя CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, наивные Т-клетки, регуляторные Т-клетки (Treg), нерегуляторные Т-клетки, Th1-клетки, Th2-клетки, Th9-клетки, Th17-клетки, фолликулярные Т-хелперы (Tfh), цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), эффекторные Т-клетки (Teff), центральные Т-клетки памяти (Tcm), эффекторные Т-клетки памяти (Tem), эффекторные Т-клетки памяти, которые экспрессируют CD45RA (клетки TEMRA), резидентные клетки памяти (Trm), Т-клетки виртуальной памяти, Т-клетки врожденной памяти, стволовые клетки памяти (Tsc), γδ Т-клетки и любые другие подтипы Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки являются модифицированными или сконструированными по сравнению с клетками дикого типа или контрольными клетками, включая неизмененные или немодифицированные клетки дикого типа или контрольные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка дикого типа или контрольная клетка представляют собой исходный материал. В некоторых вариантах осуществления исходный материал является модифицированным или сконструированным таким образом, чтобы иметь измененную экспрессию одного или более генов для создания сконструированных клеток.

[00443] В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов с регулируемой экспрессией, вставляют в заранее выбранный локус клетки. Предварительно выбранный локус может представлять собой безопасный или целевой локус. Неограничивающие примеры безопасного локуса включают локус гена CCR5, локус гена PPP1R12C и локус гена CLYBL, локус гена Rosa. Неограничивающие примеры целевого локуса включают локус гена CXCR4, локус гена альбумина, локус гена SHS231, локус гена F3 (CD142), локус гена MICA, локус гена MICB, локус гена LRP1 (CD91), локус гена HMGB1, локус гена ABO, локус гена RHD, локус FUT1 и локус гена KDM5D. В некоторых вариантах осуществления предварительно выбранный локус представляет собой локус *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставлен в безопасный или целевой локус, *например*, локус гена CCR5, локус гена CXCR4, локус гена PPP1R12C, локус гена альбумина, локус гена SHS231, локус гена CLYBL, локус гена Rosa, локус гена F3 (CD142), локус гена MICA, локус гена MICB, локус гена LRP1 (CD91), локус гена HMGB1, локус гена ABO, локус гена RHD, локуса ген FUT1 и локус гена KDM5D. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставляют в локус *B2M*. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставляют в локус *B2M*. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, встраивают в локус *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов, встраивают в локус *TRB*.

[00444] В некоторых случаях экспрессия трансгена, кодирующего один или более толерогенных факторов, контролируется условным промотором. В других случаях экспрессия трансгена, кодирующего один или более толерогенных факторов,

контролируется индуцируемым промотором.

[00445] В еще одном варианте осуществления данное изобретение, описанное в данном документе, направлено на плюрипотентные стволовые клетки (*например*, плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC)), Т-клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток (*например*, гипоиммунные Т-клетки), и первичные Т-клетки, которые имеют регулируемую сниженную экспрессию или регулируемое отсутствие экспрессии одной или более молекул человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и имеют регулируемую сниженную экспрессию или регулируемое отсутствие экспрессии комплекса Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления клетки имеют регулируемое снижение или регулируемое отсутствие экспрессии одной или более молекул антигена ГКГС класса I, молекул антигена ГКГС класса II и комплексов TCR.

[00446] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки (*например*, iPSC), дифференцированные клетки, полученные из них (*например*, Т-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментированного эпителия сетчатки, дифференцированные из них), и первичные Т-клетки включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокдаун гена B2M. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки (*например*, iPSC), дифференцированные клетки, полученные из них (*например*, Т-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментированного эпителия сетчатки, дифференцированные из них), и первичные Т-клетки включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокдаун гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетки, включая iPSC и дифференцированные клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток, таких как, помимо прочего, Т-клетки, NK-клетки, сердечные клетки, нервные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, гепатоциты, островковые клетки поджелудочной железы и клетки пигментного эпителия сетчатки являются регулируемыми клатками $B2M^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми

клетками с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются

регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки (*например*, ESC или iPSC), Т-клетки, дифференцированные из них, и первичные Т-клетки включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокдаун гена TRAC. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки (*например*, iPSC), Т-клетки, дифференцированные из них, и первичные Т-клетки включают регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокдаун гена TRB. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки (*например*, iPSC), Т-клетки, дифференцированные из них, и первичные Т-клетки включают одну или более регулируемых геномных модификаций или регулируемых нокдаунов, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, CIITA и TRAC. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки (*например*, iPSC), Т-клетки, дифференцированные из них, и первичные Т-клетки включают одну или более регулируемых геномных модификаций или регулируемых нокдаунов, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, CIITA и TRB. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки (*например*, iPSC), Т-клетки, дифференцированные из них, и первичные Т-клетки включают одну или более регулируемых геномных модификаций или регулируемых нокдаунов, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки, включающие iPSC, Т-клетки, дифференцированные из них, и первичные Т-клетки, являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*. В некоторых

вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CD47tg*. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*,, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $B2M^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются

регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$. В некоторых вариантах реализации клетки регулируются $B2M^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA* $^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg,*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{индел/индел}$, $TRBC^{индел/индел}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном}*TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRBC^{-/-}$, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками $B2M^{индел/индел}$,

CIITA$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg* , которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*, которые также экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{-/-}$, *TRAC*$^{-/-}$, *TRBC*$^{-/-}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *B2M*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками *CIITA*$^{индел/индел}$, *TRAC*$^{индел/индел}$, *TRBC*$^{индел/индел}$, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *B2M*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления клетки являются регулируемыми клетками с ^{нокдауном} *CIITA*, с ^{нокдауном} *TRAC*, с ^{нокдауном} *TRBC*, *CD47tg*. В некоторых вариантах осуществления описанные модифицированные клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, Т-клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, или первичные Т-клетки. Неограничивающие примеры первичных Т-клеток включают в себя CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, наивные Т-клетки, регуляторные Т-клетки (Treg), нерегуляторные Т-клетки, Th1-клетки, Th2-клетки, Th9-клетки, Th17-клетки, фолликулярные Т-хелперы (Tfh), цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), эффекторные Т-клетки (Teff), центральные Т-клетки памяти (Tcm), эффекторные Т-клетки памяти (Tem), эффекторные Т-клетки памяти, которые экспрессируют CD45RA (клетки TEMRA), резидентные клетки памяти (Trm), Т-клетки виртуальной памяти, Т-клетки врожденной памяти, стволовые клетки памяти (Tsc), γδ Т-клетки и любые другие подтипы Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки являются модифицированными или сконструированными по сравнению с клетками дикого типа или контрольными клетками, включая неизмененные или немодифицированные клетки дикого

типа или контрольные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка дикого типа или контрольная клетка представляют собой исходный материал. В некоторых вариантах осуществления исходный материал является модифицированным или сконструированным таким образом, чтобы иметь измененную экспрессию одного или более генов для создания сконструированных клеток.

[00447] Клетки по данному изобретению демонстрируют регулируемое снижение или регулируемое отсутствие экспрессии одной или более молекул антигена ГКГС класса I, молекул антигена ГКГС класса II и/или комплексов TCR. Снижение экспрессии ГКГС I и/или ГКГС II может быть достигнуто, например, одним или большим количеством из следующих способов: (1) нацеливание непосредственно на полиморфные аллели HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и гены ГКГС-II; (2) удаление B2M, что предотвратит перенос всех молекул ГКГС-I на поверхность; (3) удаление CIITA, что предотвратит перенос всех молекул ГКГС-II на поверхность; и/или (4) удаление компонентов энхансеосом ГКГС, таких как LRC5, RFX5, RFXANK, RFXAP, IRFl, NF-Y (включая NFY-A, NFY-B, NFY-C) и CIITA, которые имеют решающее значение для экспрессии HLA.

[00448] В некоторых вариантах осуществления на экспрессию HLA влияют путем нацеливания на отдельные HLA (*например*, нокаутирования, нокдауна или снижение экспрессии HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и/или HLA-DR), нацеливания на регуляторы транскрипции экспрессии HLA (*например*, нокаутирования или снижения экспрессии NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C и/или IRF-1), блокирования переноса молекул ГКГС класса I на поверхность (*например*, нокаутирования или снижения экспрессии B2M и/или TAP1) и/или нацеливания с помощью «бритвы» HLA (см., *например*, WO2016183041).

[00449] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в настоящем документе, включая, помимо прочего, плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из таких стволовых клеток, и первичные Т-клетки регулируемо не экспрессируют один или большее количество человеческих лейкоцитарных антигенов молекул (*например*, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и/или HLA-DR), соответствующих ГКГС-I и/или ГКГС-II, и поэтому характеризуются как гипоиммуногенные. Например, в определенных вариантах осуществления описанные плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки были модифицированы таким образом, что стволовая клетка или полученная из нее дифференцированная стволовая клетка регулируемо не экспрессирует или регулируемо не проявляет сниженную экспрессию одной или большего количества из следующих молекул ГКГС-I: HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых вариантах осуществления один или более HLA-A, HLA-B и HLA-C могут быть регулируемо «нокаутированы» из клетки. Клетка, которая имеет регулируемо нокаутированный ген HLA-A, ген HLA-B и/или ген HLA-C, может регулируемо демонстрировать сниженную экспрессию или ее отсутствие каждого нокаутированного гена. В некоторых вариантах осуществления один или более из HLA-A,

HLA-B и HLA-C могут быть регулируемо нокаутированы или подвержены нокдауну в клетке. Клетка, которая имеет нокаутированный ген HLA-A, ген HLA-B и/или ген HLA-C, может регулируемо демонстрировать сниженную экспрессию или ее отсутствие каждого нокаутированного гена.

[00450] В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК, кшРНК, миРНК или микроРНК, которые позволяют одновременно удалять все аллели ГКГС класса I путем нацеливания на консервативную область в генах HLA, идентифицируют как «бритвы» HLA. В некоторых вариантах осуществления нРНК являются частью системы CRISPR, такой как регулируемая система CRISPR, такая как условная или индуцируемая система CRISPR. В альтернативных вариантах осуществления нРНК являются частью системы TALEN, такой как регулируемая система TALEN, такая как условная или индуцируемая система TALEN. В некоторых вариантах осуществления кшРНК, миРНК или мРНК являются частью регулируемой системы РНКи, такой как условная или индуцируемая система РНКи. В некоторых вариантах осуществления «бритва» HLA, нацеленная на идентифицированную консервативную область в HLA, описана в WO2016183041. В некоторых вариантах осуществления используют несколько «бритв» HLA, нацеленных на идентифицированные консервативные области. Общеизвестно, что любая молекула гидовой РНК, кшРНК, миРНК или микроРНК, нацеленная на консервативную область в HLA, может действовать как «бритва» HLA.

[00451] Предложенные в настоящем документе способы применимы для регулируемой инактивации или абляции экспрессии ГКГС класса I и/или экспрессии ГКГС класса II в клетках, таких как, помимо прочего, плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки и первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления технологии редактирования генома с использованием регулируемых редкощепящих эндонуклеаз (*например*, системы CRISPR/Cas, TALEN, нуклеазы цинковых пальцев, мегануклеазы и эндонуклеазы хоуминга) также используются для снижения или устранения экспрессии генов, участвующих в врожденных и/или адаптивных иммунных ответах (*например*, путем удаления геномной ДНК генов, участвующих во врожденном и/или адаптивном иммунном ответе, или путем вставки геномной ДНК в такие гены, что влияет на экспрессию генов), в клетках. В определенных вариантах осуществления используют технологии регулируемого редактирования генома или другие технологии модуляции генов для введения факторов, индуцирующих толерантность, в человеческие клетки, превращая их и полученные из них дифференцированные клетки в гипоиммуногенные клетки. Таким образом, гипоиммуногенные клетки снижают или устраняют экспрессию одного или более из ГКГС I и ГКГС II. В некоторых вариантах осуществления клетки являются неиммуногенными (*например*, не индуцируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ) у субъекта-реципиента.

[00452] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит модификацию для регулируемого повышения экспрессии CD47 и одного или большего количества факторов, выбранных из группы, состоящей из DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59,

CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9.

[00453] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую геномную модификацию или регулируемый нокдаун одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию либо молекул ГКГС класса I, молекул ГКГС класса II, либо молекул ГКГС класса I и ГКГС класса II. В некоторых вариантах осуществления регулируемую систему редактирования генов используют для модификации одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления регулируемую систему РНКи используют для снижения экспрессии одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой одну или большее количество последовательностей, выбранных из группы, включающей в себя B2M, CIITA и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую модификацию типа генетического редактирования гена B2M. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую модификацию типа генетического редактирования гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую модификацию типа генетического редактирования гена NLRC5. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемые модификации типа генетического редактирования генов B2M и CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемые модификации типа генетического редактирования генов B2M и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемые модификации типа генетического редактирования генов CIITA и NLRC5. Во многих вариантах осуществления клетка содержит регулируемые модификации типа генетического редактирования генов B2M, CIITA и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую систему РНКи, нацеленную на ген B2M. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую систему РНКи, нацеленную на ген CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую систему РНКи, нацеленную на ген NLRC5. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую систему РНКи, нацеленную на гены B2M и CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую систему РНКи, нацеленную на гены B2M и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую систему РНКи, нацеленную на гены CIITA и NLRC5. Во многих вариантах осуществления клетка содержит регулируемую систему РНКи, нацеленную на гены B2M, CIITA и NLRC5. В определенных вариантах осуществления геном клетки был изменен для уменьшения количества или устранения критических компонентов экспрессии HLA. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемую систему РНКи, нацеленную на критические компоненты экспрессии HLA. В некоторых вариантах осуществления клетки являются модифицированными или сконструированными по

сравнению с клетками дикого типа или контрольными клетками, включая неизмененные или немодифицированные клетки дикого типа или контрольные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка дикого типа или контрольная клетка представляют собой исходный материал. В некоторых вариантах осуществления исходный материал является модифицированным или сконструированным таким образом, чтобы иметь измененную экспрессию одного или более генов для создания сконструированных клеток.

[00454] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к клетке (*например*, стволовой клетке, индуцированной плюрипотентной стволовой клетке, дифференцированной клетке, такой как сердечная клетка, нервная клетка, церебральная эндотелиальная клетка, дофаминергический нейрон, глиальная клетка-предшественник, эндотелиальная клетка, клетка щитовидной железы, гепатоцит, островковая клетка поджелудочной железы или клетка пигментного эпителия сетчатки, гемопоэтическая стволовая клетка, первичная NK-клетка, CAR-NK-клетка, первичная T-клетка или CAR-T-клетка) или их популяции, содержащей геном, в котором ген был регулируемо отредактирован для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I в клетке или ее популяции. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, стволовая клетка, индуцированная плюрипотентная стволовая клетка, дифференцированная клетка, такая как сердечная клетка, нервная клетка, церебральная эндотелиальная клетка, дофаминергический нейрон, глиальная клетка-предшественник, эндотелиальная клетка, клетка щитовидной железы, гепатоцит, островковая клетка поджелудочной железы или клетка пигментного эпителия сетчатки, гемопоэтическая стволовая клетка, первичная NK-клетка, CAR-NK-клетка, первичная T-клетка или CAR-T-клетка) или популяция клеток, содержащих геном, в котором был отредактирован ген для удаления непрерывного участка геномной ДНК с целью снижения или устранения поверхностной экспрессии одной или более молекул ГКГС класса II в клетке или популяции клеток. Во многочисленных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, стволовая клетка, индуцированная плюрипотентная стволовая клетка, дифференцированная клетка, такае как сердечная клетка, нервная клетка, церебральная эндотелиальная клетка, дофаминергический нейрон, глиальная клетка-предшественник, эндотелиальная клетка, клетка щитовидной железы, гепатоцит, островковая клетка поджелудочной железы или клетка пигментного эпителия сетчатки, гемопоэтическая стволовая клетка, первичная NK-клетка, CAR-NK-клетка, первичная T-клетка или CAR-T-клетка) или популяция клеток, содержащих геном, в котором были имеют регулируемый нокдаун отредактированы один или большее количество генов для удаления непрерывного участка геномной ДНК с целью снижения или устранения поверхностной экспрессии одной или более молекул ГКГС класса I и II в клетке или популяции клеток.

[00455] Во многих вариантах осуществления экспрессия одной или более молекул ГКГС I и/или молекул ГКГС II регулируется путем нацеливания и удаления непрерывного

участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию целевого гена, выбранного из группы, состоящей из B2M, CIITA и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны генетически отредактированные клетки (*например*, модифицированные клетки человека), содержащие регулируемые экзогенные белки CD47 и регулируемо инактивированные или модифицированные последовательности гена CIITA, а в некоторых случаях дополнительные генные модификации, которые регулируемо инактивируют или модифицируют последовательности гена B2M. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны генетически отредактированные клетки, содержащие регулируемые экзогенные белки CD47 и регулируемо инактивированные или модифицированные последовательности гена CIITA, а в некоторых случаях дополнительные генные модификации, которые регулируемо инактивируют или модифицируют последовательности гена NLRC5. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны генетически отредактированные клетки, содержащие регулируемые экзогенные белки CD47 и регулируемо инактивированные или модифицированные последовательности гена B2M и, в некоторых случаях, дополнительные генные модификации, которые регулируемо инактивируют или модифицируют последовательности гена NLRC5. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны генетически отредактированные клетки, содержащие регулируемые экзогенные белки CD47 и регулируемо инактивированные или модифицированные последовательности гена B2M, а в некоторых случаях дополнительные генные модификации, которые регулируемо инактивируют или модифицируют последовательности гена CIITA и последовательности гена NLRC5.

[00456] В данном документе предложены клетки, демонстрирующие модификацию одной или более нацеленных полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию любого из следующих: (a) молекул антигена ГКГС I, (b) молекул антигена ГКГС II, (c) комплексов TCR, (d) молекул антигена ГКГС I и II, и (e) молекул антигена ГКГС I и II, и комплексов TCR. В некоторых вариантах осуществления модификация включает регулируемое увеличение экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления клетки включают в себя экзогенный или рекомбинантный полипептид CD47. В некоторых вариантах осуществления модификация включает регулируемую экспрессию химерного антигенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат экзогенный или рекомбинантный полипептид химерного антигенного рецептора.

[00457] В некоторых вариантах осуществления клетка включает геномную модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию одной или более молекул антигена ГКГС I, молекул антигена ГКГС II и/или комплексов TCR. В некоторых вариантах осуществления систему генетического редактирования используют для регулируемой модификации одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах

осуществления полинуклеотидная последовательность нацелена на один или большее количество генов, выбранных из группы, состоящей из B2M, CIITA, TRAC и TRB. В определенных вариантах осуществления геном Т-клетки (*например*, Т-клетки, дифференцированной из гипоиммуногенной iPSC, и первичной Т-клетки) был изменен для регулируемого уменьшения количества или устранения критических компонентов экспрессии HLA и TCR, *например*, антигена HLA-A, антигена HLA-B, антигена HLA-C, антигена HLA-DP, антигена HLA-DQ, антигенов HLA-DR, TCR-альфа и TCR-бета.

[00458] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка или ее популяция, содержащая геном, в котором ген был регулируемо отредактирован для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I в клетке или ее популяции. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка или ее популяция, содержащая геном, в котором ген был регулируемо отредактирован для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию одной или более молекул ГКГС класса II в клетке или ее популяции. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка или ее популяция, содержащая геном, в котором ген был регулируемо отредактирован для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул TCR в клетке или ее популяции. Во многочисленных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка или ее популяция, содержащая геном, в котором один или более генов были регулируемо отредактированы для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и II, и молекул комплексов TCR в клетке или ее популяции.

[00459] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе клетки и способы включают в себя регулируемое геномное редактирование человеческих клеток для расщепления последовательностей гена CIITA, а также регулируемое редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, помимо прочего, B2M, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки и способы, описанные в настоящем документе, включают в себя регулируемое геномное редактирование клеток человека для расщепления последовательностей гена B2M, а также регулируемое редактирование генома таких клеток для изменения одной или большего количества дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, помимо прочего, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки и способы, описанные в настоящем документе, включают в себя регулируемое геномное редактирование клеток человека для расщепления последовательностей гена TRAC, а также регулируемое редактирование генома таких клеток для изменения одной или большего количества дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, помимо прочего, B2M, CIITA и TRB. В некоторых вариантах осуществления

клетки и способы, описанные в настоящем документе, включают в себя регулируемое геномное редактирование клеток человека для расщепления последовательностей гена TRB, а также регулируемое редактирование генома таких клеток для изменения одной или большего количества дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, помимо прочего, B2M, CIITA и TRAC.

[00460] В данном документе предложены гипоиммуногенные стволовые клетки, содержащие i) регулируемую сниженную экспрессию HLA-A, HLA-B, HLA-C, CIITA, TCR-альфа и TCR-бета по сравнению со стволовыми клетками дикого типа, при этом регулируемая сниженная экспрессия осуществляется посредством компонента на основе РНК, компонента на основе ДНК или белкового компонента, и ii) набор экзогенных генов, включающий первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), при этом первый и/или второй регулируемые гены вставлены в специфический локус по меньшей мере одного аллеля клетки. В данном документе также предложены гипоиммуногенные первичные Т-клетки, включая любой подтип первичных Т-клеток, включающий i) регулируемое снижение экспрессии HLA-A, HLA-B, HLA-C, CIITA, TCR-альфа и TCR-бета по сравнению с первичной Т-клеткой дикого типа, при этом регулируемая сниженная экспрессия осуществляется посредством компонента на основе РНК, компонента на основе ДНК или белкового компонента, и ii) набор экзогенных генов, включающий первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), при этом первый и/или второй регулируемые гены вставлены в специфический локус по меньшей мере одного аллеля клетки. Кроме того, в данном документе предложены гипоиммуногенные Т-клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, содержащие i) регулируемое снижение экспрессии HLA-A, HLA-B, HLA-C, CIITA, TCR-альфа и TCR-бета по сравнению с первичными Т-клетками дикого типа, при этом регулируемая сниженная экспрессия осуществляется посредством компонента на основе РНК, компонента на основе ДНК или белкового компонента, и ii) набор экзогенных генов, включающий первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), при этом первый и/или второй регулируемые гены вставлены в специфический локус по меньшей мере одного аллеля клетки.

[00461] В некоторых вариантах осуществления описанная популяция сконструированных клеток избегает цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных клеток избегает цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, с помощью одной или большего количества субпопуляций NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных клеток защищена от лизиса клеток NK-клетками, включая незрелые и/или зрелые NK-клетки, при введении пациенту-

реципиенту. В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных клеток избегает поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных клеток не индуцирует врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных клеток избегает цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, с помощью одной или большего количества субпопуляций NK-клеток, как определено анализом in vitro или анализом in vivo. В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных клеток защищена от лизиса клеток NK-клетками, включая незрелые и/или зрелые NK-клетки, при введении пациенту-реципиенту, как определено с помощью анализа in vitro или анализа in vivo. В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных клеток избегает поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту, что определяется анализом in vitro или анализом in vivo. В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных клеток не индуцирует врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту, как определено с помощью анализа in vitro или анализа in vivo.

[00462] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в настоящем документе, содержат защитный переключатель. В контексте настоящего документа термин «защитный переключатель» относится к системе управления экспрессией представляющего интерес гена или белка, которая при понижающей или повышающей регуляции приводит к клиренсу или гибели клетки, *например*, посредством распознавания иммунной системой хозяина. Защитный переключатель может быть сконструирован таким образом, чтобы он инициировался экзогенной молекулой в случае нежелательного клинического явления. Защитный переключатель можно сконструировать, регулируя экспрессию на уровне ДНК, РНК и белка. Защитный переключатель включает белок или молекулу, которая позволяет контролировать клеточную активность в ответ на нежелательное явление. В одном варианте осуществления защитный переключатель представляет собой «аварийный переключатель», который экспрессируется в неактивном состоянии и является летальным для клетки, экспрессирующей защитный переключатель, после активации переключателя селективным агентом извне. В одном варианте осуществления ген защитного переключения является цис-действующим по отношению к представляющему интерес гену в конструкции. Активация защитного переключения приводит к тому, что клетка убивает только себя или себя и соседние клетки посредством апоптоза или некроза. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, *например*, стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, первичные клетки, или дифференцированные клетки, включая, но не ограничиваясь этим, кардиальные клетки, кардиальные клетки-предшественники, нейральные клетки, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, Т-клетки, В-клетки, островковые клетки поджелудочной железы, клетки пигментного эпителия сетчатки, гепатоциты, клетки щитовидной железы, клетки

кожи, клетки крови, плазматические клетки, тромбоциты, клетки почек, эпителиальные клетки, CAR-T-клетки, NK-клетки и/или CAR-NK-клетки, содержат защитный переключатель.

[00463] В некоторых вариантах осуществления защитный переключатель содержит терапевтический агент, который ингибирует или блокирует взаимодействие CD47 и SIRPα. 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. 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.

[00464] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат «суицидальный ген» (или «суицидальный переключатель»). Суицидальный ген может вызвать гибель гипоиммуногенных клеток, если они будут расти и делиться нежелательным образом. Подход абляции суицидального гена включает суицидальный ген в векторе для переноса генов, кодирующем белок, который приводит к гибели клеток только при активации определенным соединением. Суицидальный ген может кодировать фермент, селективно преобразующий нетоксичное соединение в высокотоксичные метаболиты. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, например, стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, первичные клетки, или дифференцированные клетки, включая, но не ограничиваясь этим, кардиальные клетки, кардиальные клетки-предшественники, нейральные клетки, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, Т-клетки, В-клетки, островковые клетки поджелудочной железы, клетки пигментного эпителия сетчатки, гепатоциты, клетки щитовидной железы, клетки кожи, клетки крови, плазматические клетки, тромбоциты, клетки почек, эпителиальные клетки, CAR-T-клетки, NK-клетки и/или CAR-NK-клетки, содержат суицидальный ген.

[00465] В некоторых вариантах осуществления популяция описанных сконструированных клеток вызывает снижение уровня иммунной активации или отсутствие иммунной активации после введения субъекту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления клетки вызывают снижение уровня системной активации TH1 или отсутствие системной активации TH1 у субъекта-реципиента. В некоторых вариантах

осуществления клетки вызывают снижение уровня иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или отсутствие иммунной активации МКПК у субъекта-реципиента. В некоторых вариантах осуществления клетки вызывают снижение уровня донор-специфических антител IgG или отсутствие донор-специфических антител IgG против клеток после введения субъекту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления клетки вызывают снижение уровня выработки антител IgM и IgG или отсутствие выработки антител IgM и IgG против клеток у субъекта-реципиента. В некоторых вариантах осуществления клетки вызывают снижение уровня уничтожения цитотоксическими Т-клетками клеток после введения субъекту-реципиенту.

Условные клетки HIP и способы условного подавления целевых генов

[00466] Введение регулируемого снижения экспрессии целевых генов повышает безопасность клеточной терапии, разработанной с использованием гипоиммуногенных клеток (клеток HIP). В некоторых вариантах осуществления регулируемое снижение экспрессии целевых генов позволяет избежать потенциальных трудностей при дифференциации клеток из плюрипотентных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления регулируемая сниженная экспрессия целевого гена включает регулируемую сниженную экспрессию, такую как регулируемый нокаут или нокдаун, B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD. Регулируемая сниженная экспрессия одного или более целевых генов контролирует врожденный и/или адаптивный иммунный ответ реципиента, подвергнутого трансплантации гипоиммуногенной клетки.

[00467] В данном документе описаны способы снижения экспрессии целевого гена, которые включают механизм контролируемого «выключения» экспрессии целевого гена. Также описаны клетки HIP, обладающие регулируемой сниженной экспрессией одного или более целевых генов. В некоторых случаях в клетках можно вызвать нокаут или нокдаун экспрессии одного или более целевых генов.

[00468] В некоторых вариантах осуществления гипоиммунность клеток, которые вводят субъекту-реципиенту, достигается за счет сверхэкспрессии иммуносупрессивной молекулы, включая гипоиммунные факторы 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 сохраняться аллогенным клеткам в организме. Уровень экспрессии любой из описанных иммуносупрессивных молекул можно контролировать на уровне белка, мРНК или ДНК в клетках. Точно так же уровень экспрессии любой из описанных иммунных сигнальных молекул можно контролировать на уровне белка, мРНК или ДНК в клетках.

[00469] В некоторых вариантах осуществления любой из описанных способов регулируемой сниженной экспрессии (*например*, способы определения уровня РНК,

уровня ДНК и уровня белка) используется для снижения уровня целевого белка в клетках таким образом, чтобы нижний уровень целевого белка был ниже порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления уровень целевого белка в клетках снижается примерно в 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза, 1 раз или 0,5 раз ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления уровень целевого белка в клетках снижается примерно в 10-5 раз, 10-3 раз, 9-1 раз, 8-1 раз, 7-0,5 раз, 6-1 раз, 5-0,5 раз, 4-0,5 раз, 3-0,5 раз, 2-0,5 раз или в 1-0,5 раз ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень экспрессии целевого белка устанавливается на основе экспрессии такого фактора в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень экспрессии целевого белка устанавливается на основе целевого белка в соответствующей гипоиммунной клетке, такой как нокаутная по ГКГС I и ГКГС II клетка или нокаутная по ГКГС I/ГКГС II/TCRклетка.

1. Компоненты на основе РНК

[00470] На целевые гены могут воздействовать кшРНК, миРНК или микроРНК, что приводит к деградации транскрипта, кодирующего факторы. КшРНК, миРНК или микроРНК может быть экзогенно предоставлена или генетически закодирована для обеспечения контроля над транскрипцией ингибирующей РНК. КшРНК, миРНК или микроРНК могут отжигаться с транскриптом целевого гена, что приводит к деградации комплексом RISC.

[00471] В некоторых вариантах осуществления способы индуцируемой регуляции РНК для подавления экспрессии целевого гена включают, помимо прочего, условные или индуцируемые кшРНК, условные или индуцируемые миРНК, условные или индуцируемые микроРНК, условную или индуцируемую интерференцию CRISPR (CRISPRi) и условные или индуцибельные нуклеазы, нацеленные на РНК.

[00472] В некоторых вариантах осуществления способ включает кшРНК, миРНК или миРНК, нацеленную на РНК целевого гена. В некоторых случаях экспрессия кшРНК, миРНК или микроРНК индуцируется малой молекулой или биологическим агентом. В некоторых случаях экспрессия кшРНК, миРНК или микроРНК индуцируется клеточным условием.

[00473] В некоторых вариантах осуществления предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (*например*, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения конструкции, содержащей условный или индуцируемый промотор РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью кшРНК, миРНК или микроРНК, нацеленной на целевой ген, который функционально связан с конститутивным промотором, который функционально связан с элементом трансактиватора, который может контролировать индуцируемый промотор РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления конструкция включает промотор U6Tet, кшРНК, миРНК или микроРНК, нацеленную на целевой ген, конститутивный промотор и репрессорный элемент Tet, который реагирует на тетрациклин или его

производное (*например*, доксициклин). В других случаях кшРНК, миРНК или микроРНК устраняют экспрессию целевого гена. В других случаях кшРНК, миРНК или микроРНК снижают экспрессию целевого гена примерно на 99% или менее, *например*, на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 90%, 85% или менее. К данному способу применимы любые из конститутивных промоторов, условных промоторов, индуцируемых промоторов, целевых генов и клеток, описанных в данном документе.

[00474] Во многих вариантах осуществления сконструированная клетка экспрессирует индуцированную кшРНК, миРНК или микроРНК, которая нацелена на целевой ген. В некоторых вариантах осуществления экспрессия РНК-полимеразы, кшРНК, миРНК или микроРНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером. В некоторых вариантах осуществления клетка контактирует с фактором, таким как, помимо прочего, лиганд, молекула, пептид, малая молекула или биологический агент, который активирует экспрессию кшРНК, миРНК или микроРНК для деградации целевого гена. В некоторых вариантах осуществления экспрессия РНК-полимеразы, кшРНК, миРНК или микроРНК находится под контролем опосредованного аптамером модулятора полиаденилирования или рибопереключателя, регулируемого аптамером. В некоторых вариантах осуществления экспрессия РНК-полимеразы, кшРНК, миРНК или микроРНК находится под контролем условного промотора, такого как, *например*, специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор, или промотор, индуцируемый дифференциацией.

[00475] В некоторых вариантах осуществления предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (*например*, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения в клетку (i) первой конструкции, содержащей условный или индуцируемый промотор РНК-полимеразы, функционально связанный с кшРНК, миРНК или микроРНК, нацеленной на целевой ген, так что кшРНК, миРНК или микроРНК функционально связаны с трансактивирующим элементом, который соответствует условному или индуцируемому промотору РНК-полимеразы.

[00476] В некоторых вариантах осуществления способ включает систему интерференции CRISPR (CRISPRi) для нацеливания на промотор целевого гена с целью подавления его транскрипции. В некоторых случаях экспрессия CRISPRi и/или нРНК, нацеленной на целевой ген, индуцируется малой молекулой или биологическим агентом. В некоторых случаях экспрессия CRISPRi и/или нРНК индуцируется клеточным условием. Подробное описание способов CRISPRi можно найти, например, в публикации Engreitz et al., Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления в системе CRISPRi используется слитый белок dCas9-репрессор, который контролируется конститутивным промотором, и нРНК, специфичная к целевому гену, под контролем условного или индуцируемого промотора.

[00477] В некоторых вариантах осуществления экспрессия слитого белка dCas9-репрессор и/или нРНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером. В некоторых вариантах осуществления клетка контактирует с фактором, таким как, помимо прочего, лиганд, молекула, пептид, малая молекула или биологический агент, который активирует экспрессию слитого белка dCas9-репрессор и/или нРНК для деградации целевой ген. В некоторых вариантах осуществления экспрессия слитого белка dCas9-репрессор и/или нРНК находится под контролем опосредованного аптамером модулятора полиаденилирования или рибопереключателя, регулируемого аптамером. В некоторых вариантах осуществления экспрессия слитого белка dCas9-репрессор и/или нРНК находится под контролем условного промотора, такого как, *например*, специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией.

[00478] В некоторых вариантах осуществления способ, основанный на CRISPR, включает нуклеазу для нацеливания на последовательность мРНК, соответствующую целевому гену, такую как, помимо прочего, Cas13, Cas7 или Csx1. В некоторых случаях экспрессия нуклеазы и/или нРНК, нацеленной на целевой ген, индуцируется малой молекулой или биологическим агентом. В некоторых случаях экспрессия нуклеазы и/или нРНК индуцируется клеточным условием.

[00479] В некоторых вариантах осуществления экспрессия нуклеазы и/или нРНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером. В некоторых вариантах осуществления клетка контактирует с таким фактором, как, помимо прочего, лиганд, молекула, пептид, малая молекула или биологический агент, который активирует экспрессию нуклеазы и/или нРНК для деградации целевого гена. В некоторых вариантах осуществления экспрессия нуклеазы и/или нРНК находится под контролем опосредованного аптамером модулятора полиаденилирования или рибопереключателя, регулируемого аптамером. В некоторых вариантах осуществления экспрессия нуклеазы и/или нРНК находится под контролем условного промотора, такого как, *например*, специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией.

[00480] В некоторых вариантах осуществления предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (*например*, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения в клетку (i) первой конструкции, содержащей конститутивный промотор, функционально связанный с геном, кодирующим нуклеазу Cas13a, ее вариант или ее слитый белок; и (iii) второй конструкции, содержащей условный или индуцируемый промотор РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью нРНК, нацеленной на целевой ген, так что последовательность

нРНК функционально связана с элементом трансактиватора, который соответствует условному или индуцируемому промотору РНК-полимеразы.

[00481] В некоторых вариантах осуществления индуцируемые системы экспрессии, которые можно использовать для контроля уровня РНК целевого гена, включают, помимо прочего, системы индуцируемых лигандом транскрипционных факторов, индуцируемые малыми молекулами системы, индуцируемые биологическими агентами системы, рецептор-опосредованные системы контроля экспрессии, опосредованные аптамером модуляторы полиаденилирования (*см.*, *например*, WO 2017/083747 и WO 2021/041924, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки) и регулируемые лигандами рибопереключатели. В некоторых вариантах осуществления индуцируемая система экспрессии включает операторную систему, контролируемую тетрациклином, синтетическую систему на основе Notch (SynNotch) (*см.*, *например*, Morsut *et al.*, Cell, 2016, 164:780-791 and Yang *et al.*, Commun Biol, 2020, 3:116) и рибопереключатель, который регулирует экспрессию целевого гена с помощью лиганда (*например*, аптамера, пептида или малой молекулы), посредством опосредованного лигандом альтернативного сплайсинга полученной пре-мРНК. Полезные рибопереключатели содержат сенсорную область и эффекторную область, которые способны распознавать присутствие лиганда и изменяют сплайсинг целевого гена. Подробные описания и примеры нРНК рибопереключателя можно найти, например, US 9228207; US 9993491; и US 10421989; и Seeliger *et al.*, PLoS One, 2012, 7(1):e29266; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00482] В некоторых вариантах осуществления системы условной экспрессии, которые можно использовать для контроля уровня РНК целевого гена, включают, помимо прочего, способы под контролем условных промоторов, включая, помимо прочего, специфичные для клеточного цикла промоторы, тканеспецифичные промоторы, специфичные для линии промоторы и промоторы, индуцированные дифференциацией.

[00483] В некоторых вариантах осуществления уровень целевого гена, такого как B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD, в сконструированных клетках снижается за счет компонента на основе РНК примерно в 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза, 1 раз или 0,5 раза ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 в сконструированных клетках снижается примерно в 10-5 раз, 10-3 раз, 9-1 раз, 8-1 раз, 7-0,5 раз, 6-1 раз, 5-0,5 раз, 4-0,5 раз, 3-0,5 раз, 2-0,5 раз или в 1-0,5 раз ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых случаях пороговый уровень экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD устанавливается на основе эндогенной экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке. В некоторых случаях пороговый уровень экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD устанавливается на основе эндогенной экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD в клетке дикого типа или немодифицированной клетке.

2. Компоненты на основе ДНК

[00484] Регуляция транскрипции целевых генов посредством использования условных или индуцируемых промоторов обеспечивает возможность включать или выключать экспрессию гена посредством добавления или удаления биологических агентов или малых молекул, таких как, помимо прочего, доксициклин, или посредством изменения клеточного условия. Генетическое нарушение посредством направленой активности нуклеазы может устранить экспрессию целевых генов.

[00485] В некоторых вариантах осуществления способы условной или индуцируемой регуляции ДНК включают, помимо прочего, использование специфичных для клеточного цикла промоторов, тканеспецифичных промоторов, специфичных для линии промоторов, промоторов, индуцируемых дифференциацией, индуцируемых промоторов, контролируемых рибопереключателей, и нокаут с использованием условной или индуцируемой нуклеазы (*например*, условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых эндонуклеаз хоминга, условных или индуцируемых мегануклеаз и т.п.) для нацеливания на последовательность ДНК одного или более целевых генов. В некоторых вариантах осуществления условная или индуцируемая нуклеаза включает нуклеазу, экспрессия которой контролируется присутствием малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления условная или индуцируемая нуклеаза включает нуклеазу, так что доставка нуклеазной РНК или белка в клетки контролируется присутствием малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления экспрессия нуклеазы индуцируется малой молекулой или биологическим агентом. В некоторых вариантах осуществления экспрессия нуклеазы Cas и/или направляющей РНК (нРНК) индуцируется малой молекулой или биологическим агентом. В некоторых случаях экспрессия нуклеазы Cas и/или нРНК индуцируется клеточным условием.

[00486] В некоторых вариантах осуществления способы индуцируемой экспрессии включают, но не ограничиваются ими, системы индуцируемых лигандом факторов транскрипции (*например*, контролируемую тетрациклином операторную систему), рецептор-опосредованную систему контроля экспрессии (*например*, систему SynNotch) и регулируемую лигандом систему на основе рибопереключателя для контроля активности мРНК или нРНК. Подробное описание способов индуцируемой экспрессии можно найти, например, в Kallunki *et al.*, Cells, 2019, 796 (doi:10,3390/cells8080796), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00487] К данному способу применимы любые из конститутивных промоторов, условных промоторов, индуцируемых промоторов, целевых генов и клеток, описанных в данном документе.

[00488] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ получения стволовой клетки (*например*, гипоиммуногенной плюрипотентной стволовой клетки или гипоиммуногенной индуцированной плюрипотентной стволовой клетки) или ее дифференцированной клетки, которая была модифицирована для

условного нокаута или нокдауна любого из целевых генов, выбранных из группы, состоящей из B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и RHD.

[00489] В некоторых вариантах осуществления индуцируемые системы экспрессии, которые можно использовать для контроля уровня ДНК целевого гена, включают, помимо прочего, системы индуцируемых лигандом транскрипционных факторов, индуцируемые малыми молекулами системы, индуцируемые биологическими агентами системы, рецептор-опосредованные системы контроля экспрессии, опосредованные аптамером модуляторы полиаденилирования (см., *например*, WO 2017/083747 и WO 2021/041924, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки) и регулируемые лигандами рибопереключатели. В некоторых вариантах осуществления индуцируемая система экспрессии включает операторную систему, контролируемую тетрациклином, синтетическую систему на основе Notch (SynNotch) (см., *например*, Morsut *et al.*, Cell, 2016, 164:780-791 and Yang *et al.*, Commun Biol, 2020, 3:116) и рибопереключатель, который регулирует экспрессию целевого гена с помощью лиганда (*например*, аптамера, пептида или малой молекулы), посредством опосредованного лигандом альтернативного сплайсинга полученной пре-мРНК. Полезные рибопереключатели содержат сенсорную область и эффекторную область, которые способны распознавать присутствие лиганда и изменяют сплайсинг целевого гена. Подробные описания и примеры нРНК рибопереключателя можно найти, например, US 9228207; US 9993491; и US 10421989; и Seeliger *et al.*, PLoS One, 2012, 7(1):e29266; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00490] В некоторых вариантах осуществления системы условной экспрессии, которые можно использовать для контроля уровня ДНК целевого гена, включают, помимо прочего, способы под контролем условных промоторов, включая, помимо прочего, специфичные для клеточного цикла промоторы, тканеспецифичные промоторы, специфичные для линии промоторы и промоторы, индуцированные дифференциацией.

[00491] В некоторых вариантах осуществления уровень целевого гена, такого как B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD, в сконструированных клетках снижается за счет компонента на основе ДНК примерно в 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза, 1 раз или 0,5 раза ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 в сконструированных клетках снижается примерно в 10-5 раз, 10-3 раз, 9-1 раз, 8-1 раз, 7-0,5 раз, 6-1 раз, 5-0,5 раз, 4-0,5 раз, 3-0,5 раз, 2-0,5 раз или в 1-0,5 раз ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых случаях пороговый уровень экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD устанавливается на основе эндогенной экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке. В некоторых случаях пороговый уровень экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD устанавливается на основе эндогенной экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD в клетке дикого типа или немодифицированной клетке.

3. Белковые компоненты

[00492] В некоторых вариантах осуществления регулируемую деградацию целевого белка устанавливают с помощью способа на основе дегрона, который позволяет вовлекать целевой белок в механизм эндогенного метаболизма белка. Механизмы целенаправленной деградации белка включают, но не ограничиваются ими, рекрутирование к лигазе E3 для убиквитинирования и последующей протеасомной деградации, прямое рекрутирования к протеасоме и рекрутирования к лизосоме.

[00493] В некоторых вариантах осуществления способы индуцируемой деградации белка с помощью включают, но не ограничиваются ими, индуцируемую лигандом деградацию (LID) с использованием метки SMASH, индуцируемую лигандом деградацию с использованием Shield-1, индуцируемую лигандом деградацию с использованием ауксина, индуцируемую лигандом деградацию с использованием рапамицина, пептидные дегроны (*например*, дегроны на основе IKZF3) и протеолиз-таргетированную химеру (PROTAC). В некоторых вариантах осуществления способа деградации, индуцированной лигандом, метка дегрона, которая удерживается в неактивной конформации, но индуцируется к переходу в конформацию, способную распознаваться протеасомой при связывании специфической молекулы, такой как, помимо прочего, молекула Shield-1. См., например, Roth et al., Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76(14), 2761-2777, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. Подробное описание технологии на основе дегрона SMASH можно найти в Hannah and Zhou, Nat Chem Biol, 2015, 11:637-638 and Chung *et al.*, Nat Chem Biol, 2015, 11:713-720, которые включены в данный документ посредством ссылки в их целостности. Подробное описание технологий LID-дегрона можно найти в Bonger *et al.,* Nat Chem Biol, 2011, 7(8):531-7, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00494] В некоторых вариантах осуществления предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (*например*, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения конструкции, содержащей условный или индуцируемый промотор, функционально связанный с элементом пептидной химеры, нацеленной на протеолиз (PROTAC), направленной на целевой белок, *например*, B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD.

[00495] В некоторых вариантах осуществления пептидного дегрона используется пептидная метка, которая обеспечивает опосредованное малыми молекулами рекрутирование к лигазе E3. В некоторых вариантах осуществления пептидная метка содержит лимфоид-рестриктированный фактор транскрипции IKZF3, который рекрутируется к рецептору лигазы E3 (CRBN) в зависимости от иммуномодулирующего лекарственного средства (IMiD), как описано в Koduri et al., Proc Natl Acad Sci, 2019, 116(7), 2539-2544, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления дегрон способен направляет целевой белок на деградацию (например, посредством пути убиквитинирования), индуцируя деградацию белка или разрушая белки.

[00496] В некоторых вариантах осуществления PROTAC, бифункциональная молекула используется для привлечения целевого белка в механизм деградации белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления бифункциональная молекула связывается с нативной последовательностью целевого белка или последовательностью дикого типа с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления бифункциональная молекула содержит малую молекулу или биологический агент (например, антитело или его фрагмент). См., *например*, Burslem *et al.*, Cell Chemical Biology, 2018, 25, 67-77 and Roth *et al.*, Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76(14), 2761-2777, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00497] В некоторых вариантах осуществления бифункционального антитела антитело нацелено на целевой белок и второй эндогенный рецептор, что приводит к интернализации и деградации. Контролируемая экспрессия одного или более целевого белка может быть обеспечена посредством бифункционального антитела (например, химически перепрограммированного бифункционального антитела), способа индуцируемой деградации белка с помощью дегрона, индуцируемой регуляции РНК, индуцируемой регуляции ДНК и способа индуцируемой экспрессии. См., например, Natsume and Kanemaki, Annu Rev Genet, 2017, 51, 82-102; Burslem and Crews, Chem Rev, 2017, 117, 11269-11301; Banik et al., ChemRxiv, 2019; которые полностью включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую целевой белок, приводят в контакт с антителом, которое связывает клетку для деградации.

[00498] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый элемент дегрон выбран из группы, состоящей из элемента дегрон, индуцируемого лигандом, такого как элемент дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), чувствительный к Shield-1 элемент дегрон, чувствительный к ауксину элемент дегрон, и чувствительный к рапамицину элемент дегрон; пептидный элемент дегрон; и элемент протеолиз-таргетированная химера (PROTAC). В полезных вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон представляет собой элемент дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), а экзогенный фактор для контроля иммуногенности представляет собой асунапревир. В некоторых вариантах осуществления целевой ген выбран из группы, состоящей из B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и RHD.

[00499] В некоторых вариантах осуществления способы условной или индуцируемой регуляции белка находятся под контролем специфичных для клеточного цикла промоторов, тканеспецифичных промоторов, специфичных для линии промоторов, промоторов, индуцируемых дифференциацией, индуцируемых промоторов или управляемых рибопереключателей. В некоторых вариантах осуществления экспрессия условного или индуцируемого дегрона контролируется присутствием малой молекулы или биологического агента. В некоторых случаях экспрессия условного или индуцируемого дегрона контролируется клеточным условием.

[00500] В некоторых вариантах осуществления способы индуцируемой экспрессии

включают, но не ограничиваются ими, системы индуцируемых лигандом факторов транскрипции (*например*, контролируемую тетрациклином операторную систему), рецептор-опосредованную систему контроля экспрессии (*например*, систему SynNotch) и регулируемую лигандом систему на основе рибопереключателя для контроля активности мРНК или нРНК. Подробное описание способов индуцируемой экспрессии можно найти, например, в Kallunki *et al.*, Cells, 2019, 796 (doi:10,3390/cells8080796), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00501] К данному способу применимы любые из конститутивных промоторов, условных промоторов, индуцируемых промоторов, целевых генов и клеток, описанных в данном документе.

[00502] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ получения стволовой клетки (*например*, гипоиммуногенной плюрипотентной стволовой клетки или гипоиммуногенной индуцированной плюрипотентной стволовой клетки) или ее дифференцированной клетки, которая была модифицирована для условной деградации любого из целевых белков, выбранных из группы, состоящей из B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и RHD.

[00503] В некоторых вариантах осуществления индуцируемые системы экспрессии, которые можно использовать для контроля уровня белка целевого гена, включают, помимо прочего, системы индуцируемых лигандом транскрипционных факторов, индуцируемые малыми молекулами системы, индуцируемые биологическими агентами системы, рецептор-опосредованные системы контроля экспрессии, опосредованные аптамером модуляторы полиаденилирования (см., *например*, WO 2017/083747 и WO 2021/041924, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки) и регулируемые лигандами рибопереключатели. В некоторых вариантах осуществления индуцируемая система экспрессии включает операторную систему, контролируемую тетрациклином, синтетическую систему на основе Notch (SynNotch) (см., *например*, Morsut *et al.*, Cell, 2016, 164:780-791 and Yang *et al.*, Commun Biol, 2020, 3:116) и рибопереключатель, который регулирует экспрессию целевого гена с помощью лиганда (*например*, аптамера, пептида или малой молекулы), посредством опосредованного лигандом альтернативного сплайсинга полученной пре-мРНК. Полезные рибопереключатели содержат сенсорную область и эффекторную область, которые способны распознавать присутствие лиганда и изменяют сплайсинг целевого гена. Подробные описания и примеры нРНК рибопереключателя можно найти, например, US 9228207; US 9993491; и US 10421989; и Seeliger *et al.*, PLoS One, 2012, 7(1):e29266; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00504] В некоторых вариантах осуществления системы условной экспрессии, которые можно использовать для контроля уровня белка целевого гена, включают, помимо прочего, способы под контролем условных промоторов, включая, помимо прочего, специфичные для клеточного цикла промоторы, тканеспецифичные промоторы,

специфичные для линии промоторы и промоторы, индуцированные дифференциацией.

[00505] В некоторых вариантах осуществления уровень целевого белка, такого как B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD, в сконструированных клетках снижается за счет белкового компонента примерно в 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза, 1 раз или 0,5 раза ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 в сконструированных клетках снижается примерно в 10-5 раз, 10-3 раз, 9-1 раз, 8-1 раз, 7-0,5 раз, 6-1 раз, 5-0,5 раз, 4-0,5 раз, 3-0,5 раз, 2-0,5 раз или в 1-0,5 раз ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых случаях пороговый уровень экспрессии белка B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD устанавливается на основе эндогенной экспрессии белка B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке. В некоторых случаях пороговый уровень экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD устанавливается на основе эндогенной экспрессии B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD в клетке дикого типа или немодифицированной клетке.

Условные клетки HIP и способы условной активации трансгенов

[00506] Введение регулируемой сверхэкспрессии трансгенов повышает безопасность клеточной терапии, разработанной с использованием гипоиммуногенных клеток (клеток HIP). Особенностью описанных в данном документе клеток HIP является регулируемая экспрессия одного или более иммунорегуляторных (иммуносупрессивных) факторов. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор (также называемый в данном документе «фактором гипоиммунитета») включает, но не ограничивается ими, CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелую цепь HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21 и Mfge8. В определенных вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор представляет собой CD47. Регулируемая или индуцируемая экспрессия иммуносупрессивного фактора функционирует для контроля врожденного и/или адаптивного иммунного ответа реципиента, подвергнутого трансплантации гипоиммуногенной клетки.

[00507] В данном документе описаны способы контролируемой экспрессии иммунного сигнального фактора для увеличения экспрессии фактора для изменения гипоиммуногенности клетки.

[00508] Контролируемая экспрессия одного или более иммуносупрессивных факторов может быть обеспечена посредством индуцированной системы стабилизации лиганда с использованием дегрона, индуцибельной системы активации РНК (*например*, индуцибельной активации CRISPR) и индуцибельной системы активации ДНК. В некоторых вариантах осуществления система индуцированной активации ДНК включает индуцированную активацию CRISPR (CRISPRa), тканеспецифические промоторы, индуцибельные промоторы и рибопереключатели.

[00509] Подробное описание способов CRISPRa можно найти, например, в публикации Engreitz et al., Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Подробные описания и

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

[00510] К данному способу применимы любые из конститутивных промоторов, условных промоторов, индуцируемых промоторов, целевых генов и клеток, описанных в данном документе.

[00511] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит экзогенный полинуклеотид, содержащий условный или индуцируемый трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CD47 находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером. В некоторых вариантах осуществления клетка контактирует с таким фактором, как, помимо прочего, лиганд, молекула, пептид, малая молекула или биологический агент, который активирует экспрессию CD47. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CD47 находится под контролем опосредованного аптамером модулятора полиаденилирования или рибопереключателя, регулируемого аптамером. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CD47 находится под контролем условного промотора, такого как, *например*, специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией.

[00512] В некоторых вариантах осуществления предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (*например*, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения в клетку (i) первой конструкции, содержащей условный или индуцируемый трансген, кодирующий один или более толерогенных факторов.

Регуляторные элементы

[00513] Промоторы могут представлять собой производные или модифицированные варианты любых нативных или известных промоторов, включая вставки и делеции нативных или известных промоторов, а также их комбинации или перестановки. Также можно использовать химерные промоторы, содержащие элементы последовательности двух или более различных промоторов, описанных в данных документе. В любом случае любой промотор можно легко протестировать на его эффективность в описанных в данных документе клетках.

[00514] 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, сайты

полиаденилирования, консенсусные последовательности Kozak и энхансерные или активаторные последовательности.

1. Конститутивные промоторы

[00515] В данном изобретении можно использовать любой конститутивный или универсальный промотор, известный в данной области техники. Примеры конститутивных или универсальных промоторов включают, *например*, промотор актина (*например*, промотор ACTB), промотор альбумина, промотор IE1 бакуловируса, промотор бета-актина, промотор бета-актина, связанный с энхансером, полученным из немедленного раннего (IE) промотора цитомегаловируса (ЦМВ) (промотор CAG), промотор CaM-киназы, промотор тимидинкиназы ЦМВ-HSV, промотор коллагена 1A1 (Sokolov *et al.* 1995; Breault *et al.* 1997), промотор коллагена 1A2 (Akai *et al.* 1999; Antoniv *et al.* 2001), промотор дигидрофолатредуктазы, промотор фактора элонгации 1α (EF1α), промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner *et al.*, 1981), промотор HPRT, область длинных концевых повторов вируса мышиного лейкоза Молони (MMLV LTR), промотор фосфоглицераткиназы 1 (PGK), промоторы генов E1A или главного позднего промотора (MLP) аденовирусов (Ad), промоторы РНК-полимераз pol I, pol II, pol III, U6 или HI, промотор тубулина, промотор убиквитина (UbC), промотор виментина, вирусные промоторы (*например*, вирус саркомы птиц, вирус папилломы крупного рогатого скота, цитомегаловирус (ЦМВ), (Boshart *et al.,* Cell, 41:521-530 (1985), минимальный промотор ЦМВ (Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 5547-5551), промотор вируса оспы птиц, вируса гепатита B, вируса полиомы, ретровируса, промотор LTR ретровирусного вируса саркомы Рауса (RSV), вируса обезьян 40 (SV40)).

2. Индуцированные промоторы и элементы

[00516] В данном изобретении можно использовать любой индуцируемый промотор, известный в данной области техники. Термин «индуцируемый промотор» относится к промотору, который избирательно экспрессирует кодирующую последовательность или функциональную РНК в ответ на присутствие эндогенного или экзогенного стимула, например, с помощью химических соединений (химических индукторов) или в ответ на воздействие окружающей среды, гормональные, химические сигналы и/или сигналы развития. Индуцируемые или регулируемые промоторы включают, например, промоторы, индуцируемые или регулируемые гормонами, стероидами, факторами роста, цитокинами, цитостатиками, облучением, малыми молекулами, металлами, тепловым шоком, светом, тетрациклином, интерфероном, пролекарствами, аптамерами и т.д. Примеры регулируемых промоторов описаны в Goverdhana et ak, Mol Ther, 12: 189-211, 2005; Agha- Mohammadi and Lotze, J Clin Invest, 105: 1177-1183; Mullick et ak, BMC Biotech, 6:43, 2006; и US20210155667, каждый из которых включен в данный документ в полном объеме.

[00517] Примеры индуцируемых промоторов включают, *например*, *малые молекулы или чувствительные к лигандам промоторы*, включая, *например*, система абсцизовой кислоты (АБК) (Liang *et al.*, Sci Signal. 2011 Mar 15;4(164):rs2), промоторы,

чувствительные к кумермицину (Zhao *et al.*, Hum Gene Ther. 2003 Nov 20;14(17):1619-29), кумат-регулируемые промоторы, промоторы вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), индуцируемые дексаметазоном (Dex), промоторы, индуцируемые доксициклином (*например*, tre) (Bohl *et al.*, (1998) Blood 92(5), 1512-7), промоторы экдизона насекомых (No *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), промотор GAL1-GAL10, промотор, регулируемый изопропил-бета-D-тиогалактопиранозидом (IPTG), промотор, индуцируемый лактозой, промоторы, чувствительные к мифепристону (*например*, промотор GAL4-Elb), промотор вируса лейкоза молочной железы мышей, промотор пируваткиназы, промоторы, индуцируемые рапамицином (Magari *et al.,* J Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)), RU486-индуцируемая система (Wang *et al.,* Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) и Wang *et al.,* Gene Ther., 4:432-441 (1997)), промоторы, регулируемые тетрациклином, *например*, тетрациклин-репрессируемая система (Gossen *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)) или система, индуцируемая тетрациклином [Gossen *et al.,* Science, 268:1766-1769 (1995); см. также Harvey *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol, 2:512-518 (1998); см. также US20210155667, все включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме]; *промоторы, регулируемые алкоголем; промоторы, вызванные окружающей средой/стрессом,* включая, *например*, промоторы реакции теплового шока (*например*, промотор теплового шока 70), промоторы, управляемые гипоксией, промоторы IL-8, интерферон-чувствительные промоторы, NF-Kb-чувствительный промотор, pH-регулируемые промоторы; *светочувствительные промоторы*, включая, *например*, система vivid (VVD), фотоактивируемая система (PA)-Tet-OFF/ON; *чувствительные к металлам промоторы*, включая, *например*, индуцируемый металлотионеином промотор (*например*, индуцируемые медью промоторы ACEl, индуцируемые цинком металлотиониновые (MT) промоторы овцы); *промоторы, регулируемые патогенезом*, включая, *например*, промоторы, индуцируемые салициловой кислотой, этиленом или бензотиадиазолом (BTH)); *промоторы, индуцируемые РНК-полимеразой,* включая, *например*, промотор РНК-полимеразы T3, система промотора полимеразы T7 (*см.*, *например*, WO 98/10088, включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме); и *промоторы, индуцируемые стероидными гормонами*, включая, *например*, промоторы, содержащие элемент ответа на гормон, который делает промотор чувствительным к лиганду рецептора гормона, причем рецепторы гормона включают, *например*, рецепторы эстрогена, прогестерона и глюкокортикоидов, причем лиганды включают физиологические лиганды, *например*, эстроген, прогестерон или кортизол и нефизиологические лиганды, *например*, тамоксифен, дексаметазон.

[00518] В некоторых вариантах осуществления индуцированная регуляция целевого гена осуществляется посредством индуцируемой активации CRISPR (CRISPRa), включая, *например*, dCas9, слитый с каркасом, который рекрутирует пептиды-активаторы (*например*, SunTag), dCas9, слитый с рядом доменов активации (*например*, dCas9-VPR), dCas9, слитый с активатором, а меченая нРНК рекрутирует другие активаторы (*например*, SAM). Подробное описание методов CRISPRa можно найти, *например*, в Engreitz *et al.*,

Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386.

[00519] В некоторых вариантах осуществления индуцированная регуляция целевого гена осуществляется посредством индуцируемых рибопереключателей/аптамеров. Термин «аптамер», используемый в данном документе, относится к полинуклеотиду РНК, который специфически связывается с лигандом. Термин «лиганд» относится к молекуле, которая специфически связывается аптамером. Кассета регуляции гена относится к конструкции рекомбинантной ДНК, которая при включении в ДНК целевого гена обеспечивает способность регулировать экспрессию целевого гена посредством альтернативного сплайсинга, опосредованного аптамером/лигандом полученной пре-мРНК. Рибопереключатель содержит сенсорную область (*например*, аптамер) и эффекторную область, которые вместе отвечают за распознавание присутствия малой молекулы-лиганда и изменение сплайсинга с альтернативным экзоном. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена увеличивается, когда лиганд аптамера присутствует, и снижается, когда лиганд отсутствует. Подробные описания и примеры индуцируемых рибопереключателей можно найти, *например*, в US 9228207; US 9993491 и US 10421989; и Seeliger *et al.*, PLoS One, 2012, 7(1):e29266.

[00520] В некоторых вариантах осуществления индуцированная регуляция целевого гена осуществляется посредством регуляторных слитых белков. Экспрессию генов в эукариотических клетках можно жестко регулировать с помощью сильного промотора, который контролируется оператором, который, в свою очередь, регулируется регуляторным слитым белком (RFP). RFP состоит по существу из домена, блокирующего транскрипцию, и лиганд-связывающего домена, который регулирует его активность. В присутствии родственного лиганда лиганд-связывающего домена RFP связывает оператор, тем самым предотвращая транскрипцию GOI. Когда родственный лиганд удаляется, RFP дестабилизируется и продолжается транскрипция интересующей нуклеотидной последовательности.

[00521] В некоторых вариантах осуществления индуцированная регуляция целевого гена осуществляется посредством дегронов. В некоторых вариантах осуществления элемент дегрона выбран из группы, состоящей из индуцируемого лигандом элемента дегрона, пептидного элемента дегрона и элемента пептидной химеры, нацеленного на протеолиз (PROTAC). В некоторых вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон выбран из элемента дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), чувствительного к Shield-1 элемента дегрон, чувствительного к ауксину элемента дегрон, и чувствительного к рапамицину элемента дегрон. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон представляет собой элемент дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), а экзогенный фактор представляет собой асунапревир. В случае регулируемой положительной регуляции целевого гена, элемент дегрона может представлять собой систему дегрона, как описано в Tan *et al.*, Gene Regulation: Methods, vol. 9, suppl. 1, S123,

May 01, 2004, в котором дегрон, содержащий ZFP TF, может быть объединен с регулируемым переключателем, таким как лиганд-связывающий домен рецептора прогестерона, что приводит к мифпристон-зависимой положительной регуляции целевого гена.

3. Специфичные для клеточного цикла промоторы

[00522] В некоторых вариантах осуществления условная регуляция целевого гена осуществляется посредством специфичного для клеточного цикла промотора. Элемент контроля экспрессии, специфичный для фазы клеточного цикла, может быть выбран из специфичных для клеточного цикла промоторов и других элементов, которые влияют на контроль транскрипции или трансляции специфичным для клеточного цикла образом. Если элементом контроля экспрессии является промотор, выбор промотора будет зависеть от фазы клеточного цикла, выбранной для исследования.

[00523] В данном изобретении можно использовать любой специфичный для клеточного цикла промотор, известный в данной области техники. Примеры промоторов, специфичных для клеточного цикла, включают, *например*, промотор циклина B1 (Cogswell *et al.,* Mol. Cell Biol., (1995), 15(5), 2782-90, Hwang *et al.,* J. Biol. Chem., (1995), 270(47), 2841 9-24, Piaggio *et al.,* Exp. Cell Res., (1995), 21 6(2), 396-402), промотор Cdc25B (Korner *et al.,* J. Biol. Chem., (2001), 276(1 3), 9662-9); промотор циклина A2 (Henglein *et al.,* Proc.Nat.Acad.Sci.USA, (1994), 91 (12), 5490-4, Zwicker *et al.,* Embo J., (1995), 14(1 8), 451 4-22), промотор Cdc2 (Tommasi and Pfeifer, Mol. Cell Biol., (1995), 15(12), 6901 -1 3, Zwicker *et al.,* Embo J (1995), 14(1 8), 4514-22), промотор Cdc25C (Korner and Muller, J. Biol. Chem., (2000), 275(25), 1 8676-81 , Korner *et al.,* Nucl. Acids Res., (1997), 25(24), 4933-9), промотор циклина E (Botz *et al.,* Mol. Cell Biol., (1996), 1 6(7), 3401 -9, Korner and Muller, J. Biol. Chem., (2000), 275(25), 1 8676-81), промотор Cdc6 (Hateboer *et al.,* Mol. Cell Biol., (1998), 1 8(11), 6679-97, Yan *et al.,* Proc.Nat.Acad.Sci.USA, (1998), 95(7), 3603-8), промотор DHFR (Shimada *et al.,* J. Biol. Chem., (1986), 261 (3), 1 445-52, Shimada and Nienhuis, J. Biol. Chem., (1985), 260(4), 2468-74), гистоновые промоторы (van Wijnen *et al.,* Proc.Nat.Acad.Sci.USA, (1994), 91, 1 2882- 1 2886)

[00524] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении также используются элементы IRES, специфичные для клеточного цикла. Примеры элементов IRES, специфичных для клеточного цикла, включают, *например*, G2-IRES (Cornelis *et al.,* Mol. Cell, (2000), 5(4), 597-605); HCV IRES (Honda *et al.*, Gastroenterology, (2000), 1 1 8, 1 52-1 62); ODC IRES (Pyronet *et al.,* Mol. Cell, (2000), 5, 607-61 6); c-myc IRES (Pyronnet *et al.,* Mol. Cell, (2000), 5(4), 607-1 6) и p58 PITSLRE IRES (Cornelis *et al.*, Mol. Cell, (2000), 5(4), 597-605).

4. Тканеспецифичные промоторы и специфичные для линии промоторы

[00525] В некоторых вариантах осуществления промотор является пространственно ограниченным промотором (*m.e.* специфичным в отношении клеточного типа промотором, тканеспецифичным промотором, специфичным для линии промотором и т. д.) так, что в многоклеточном организме промотор является активным (*m. E.* «ВКЛ») в

подгруппе конкретных клеток. Пространственно ограниченные промоторы также могут называться энхансерами, транскрипционными регуляторными элементами, регуляторными последовательностями и т. д. Можно использовать любой удобный пространственно ограниченный промотор, и выбор подходящего промотора будет зависеть от организма. Например, для растений, мух, червей, млекопитающих, мышей и т.д. известны различные пространственно ограниченные промоторы. Таким образом, пространственно ограниченный промотор можно использовать для регуляции экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей рассматриваемый сайт-направленный модифицирующий полипептид, в самых разных тканях и типах клеток, в зависимости от организма. Некоторые пространственно ограниченные промоторы также ограничены во времени, так что промотор находится в состоянии «ВКЛ» или «ВЫКЛ» на определенных стадиях эмбрионального развития или на определенных стадиях биологического процесса (*например*, цикла волосяного фолликула у мышей).

[00526] В некоторых вариантах осуществления экспрессия трансгена может находиться под контролем промотора, который преимущественно инициирует транскрипцию в определенных линиях, таких как респираторный, предстательный, поджелудочный, молочный, почечный, кишечный, нервный, скелетный, сосудистый, печеночный, кроветворный, мышечный или линии сердечных клеток. Примеры специфического для линии промотора включают, помимо прочего, промотор Sox-2 (специфичный для нейрональных клеток-предшественников, см. патент США № 7781214), промотор 2 легкой цепи миозина (специфичный для сердца, см. Huber I *et al.,* FASEB J 2007, 21:2551-63), промотор аГКГС (кардиоспецифичный, см. Kita-Matsuo H, PLoS One 2009, 4:e5046; Ritner C *et al.,* PLoS One 2011, 6:el6004), промотор Hb9 (специфичный для мотонейронов, см. Singh *et al.*, Exp Neurol 2005, 196:224-34), промотор Dazl (специфичный для зародышевых клеток, см. Nicholas CR *et al.*, Genesis 2009, 47:74- 84), промотор альбумина (специфичный для гепатоцитов, см. Lavon N *et al.*, Differentiation 2004, 72:230-238), и промотор Pdxl (специфичный для предшественника поджелудочной железы, *см.*, Lavon N *et al.*, Stem Cells 2006, 24: 1923-1930).

[00527] В некоторых вариантах осуществления экспрессия трансгена может находиться под контролем тканеспецифичного промотора, такого как промотор, специфичный для: печени, поджелудочной железы (экзокринной или эндокринной части), селезенки, пищевода, желудка, толстой или тонкой кишки, толстой кишки, ЖКТ, сердца, легких, почек, тимуса, паращитовидной железы, шишковидной железы, гипофиза, молочной железы, слюнной железы, яичника, матки, шейки матки (*например*, шейной части), предстательной железы, яичка, половых клеток, уха, глаза, головного мозга, сетчатки, мозжечка, головного мозга, PNS или ЦНС, плаценты, коры или мозгового слоя надпочечников, кожи, лимфатических узлов, мышц, жира, костей, хрящей, синовиальной оболочки, костного мозга, эпителиальных, эндотелиальных, сосудистых, нервных тканей и т.д. Тканеспецифичный промотор также может быть специфичным для некоторых тканей заболевания, таких как рак. *См.*, Fukazawa *et al.*, Cancer Research 64: 363-369, 2004

(включенный в данный документ посредством ссылки).

[00528] В данном изобретении можно использовать любые тканеспецифические промоторы, известные в данной области техники. Просто для иллюстрации Chen *et al.* (Nucleic Acid Research, Vol. 34, database issue, pages D104-D107, 2006) описан TiProD, база данных тканеспецифичных промоторов (включенный в данный документ посредством ссылки). В частности, TiProD представляет собой базу данных последовательностей промоторов человека, для которых известны некоторые функциональные особенности. Это позволяет пользователю запрашивать отдельные промоторы и характер экспрессии, опосредуемый ими, характеристики экспрессии генов в отдельных тканях, а также получать наборы промоторов в соответствии с их тканеспецифичной активностью или в соответствии с отдельными условиями онтологии генов, которым присвоены соответствующие гены. В базе данных определена мера тканеспецифичности, которая позволяет пользователю различать универсальные и специфически экспрессируемые гены. База данных доступна по адресу tiprod.cbi.pku dot edu.cn:8080/index.html. Она охватывает большинство (если не все) тканей, описанных выше. Другие промоторы, которые можно использовать, включают промоторы, описанные в Интернете по адресу <biobase/de/pages/products/transpor html>, который представляет собой базу данных, содержащую более 15 000 различных последовательностей промоторов, классифицированных по генам/активности.

[00529] Примеры специфичных для сердечных клеток промоторов включают, *например*, промотор тяжелой цепи α-миозина, промотор AE3, промотор Aplnr, промотор сердечного актина, промотор сердечного тропонина C, промотор десмина (DES), промотор мышечной креатинкиназы (MCK), необязательно с энхансером MCK или сердечного тропонина-T, промотор 2 легкой цепи миозина, промотор Nfatc1 и промотор Npr3 (Franz *et al.* (1997) Cardiovasc. Res. 35:560-566; Robbins *et al.* (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 752:492-505; Linn *et al.* (1995) Circ. Res. 76:584-591; Parmacek *et al.* (1994) Mol. Cell. Biol. 14:1870-1885; Hunter *et al.* (1993) Hypertension 22:608-617; и Sartorelli *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4047-4051).

[00530] Примеры промоторов, специфичных для мышечных клеток, включают, *например*, промотор гладкомышечного α-актина (SMA), промотор тяжелой цепи SM-миозина, промотор кальпонина-h1, промотор SM22α, промотор сосудистого альфа-актина, промотор энтерального гамма-актина, промотор скелетного альфа-актина (SkA), промотор креатинкиназы мышц млекопитающих (MCK), промотор десмина млекопитающих (DES), промотор тропонина I (TNNI2) млекопитающих и промотор скелетного альфа-актина млекопитающих (ASKA).

[00531] Примеры промоторов, специфичных для нервных клеток, включают, *например*, *астроциты*: промотор глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) (Smith-Arica *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008); *ГАМКергический нейрон*: промотор декарбоксилазы глутаминовой кислоты (GAD) (Rasmussen *et al.*, 2007); *глутаматергический нейрон*: промотор фосфат-активируемой глутаминазы (PAG) или

везикулярного переносчика глутамата (vGLUT) (Rasmussen *et al.*, 2007); *микроглиальные клетки*: промотор F4/80, промотор CD68 (Rosario *et al.*, 2016); *нейроны*: промотор синапсин-1 (Syn1) и нейрон-специфической енолазы (NSE) (Peel *et al.*, 1997; Kugler *et al.*, 2001; Kugler *et al.*, 2003; McLean *et al.*, 2014); *олигодендроциты*: промотор миелинового основного белка (MBP) (von Jonquieres *et al.*, 2013) или промотор человеческого миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG), последний как в полноразмерной, так и в усеченной версии (von Jonquieres *et al.*, 2016). Другие примеры промоторов, специфичных для нервных клеток, включают, *например*, промотор декарбоксилазы ароматических аминокислот (AADC), промотор Ca2+-кальмодулин-зависимой протеинкиназы II-альфа (CamKIIα) (*см.*, *например*, Mayford *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13250; и Casanova *et al.* (2001) Genesis 31:37), энхансер ЦМВ/промотор тромбоцитарного фактора роста-β (см. *например*, Liu *et al.* (2004) Gene Therapy 11:52-60), промотор DAT, промотор DNMT (см., *например*, Bartge *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3648-3652), энкефалиновый промотор (см., *например*, Comb *et al.* (1988) EMBO J. 17:3793-3805), промотор ENO2, промотор GnRH (см., *например*, Radovick *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3402-3406), промотор L7 (см., *например*, Oberdick *et al.* (1990) Science 248:223-226), промотор MAP2, промотор гена легкой цепи нейрофиламента (Piccioli *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)), промотор нейрофиламента, промотор NURR1, промотор PITX3, промотор S100, промотор рецептора серотонина (см., *e.g.*, GenBank S62283), промотор синапсина, промотор Tau, промотор thy-1 (*см.*, *например*, Chen *et al.* (1987) Cell 51:7-19; и Llewellyn, *et al.* (2010) Nat. Med. 16(10):1161-1166), промотор TUBA1A, промотор TUJ1, промотор тирозингидроксилазы (TH) (см., *например*, Oh *et al.* (2009) Gene Ther 16:437; Sasaoka *et al.* (1992) Mol. Brain Res. 16:274; Boundy *et al.* (1998) J. Neurosci. 18:9989; и Kaneda *et al.* (1991) Neuron 6:583-594), промотор VGF (Piccioli *et al.*, Neuron 15:373-84 (1995) и промотор VMAT2.

[00532] Примеры специфичных для глиальных клеток-предшественников промоторов включают, *например*, промотор A2B5, промотор BLBP, промотор нейротрофического фактора головного мозга BDNF, промотор CD105, промотор CD11b, промотор CD11c, промотор CD133, промотор CD140a, промотор CD45, промотор CD9, промотор цилиарного нейротрофического фактора CNTF, промотор коннексина 43, промотор CX3CR1, промотор EGFR, промотор эпидермального фактора роста EGF, промотор FGF8, промотор FOXG1, промотор GalC, промотор GAP-43, промотор GD3, GLAST, промотор глутаминсинтетазы, промотор IBA-1, промотор LNGFR, промотор MBP, промотор Musashi, промотор фактора роста нервов NGF, промотор нестина, нейтротрофин-3, промотор NT-3, промотор NG2, промотор NKX2.2, промотор NT-4, промотор O4, промотор OLIG1, промотор OLIG2, промотор P2RY12, промотор PAX6, промотор PDGFαR, промотор S100β, промотор SOX10, промотор TMEM119 и промотор виментина.

[00533] Другие примеры нейрон-специфичных промоторов включают, *например*, промотор CNP 2',3'-циклического нуклеотида 3'-фосфодиэстеразы, промотор Ach,

промотор ASCL1, промотор бета-тубулина, промотор кальбиндина, промотор c-fos, промотор ChAT, промотор корина, промотор CRF, промотор CTIP2, промотор диаминобензидина (DAB), промотор DLX1, промотор DLX2, промотор DLX5, промотор DLX6, промотор транспортера дофамина (DAT), промотор даблкортина, промотор EMX2p75, промотор FOXA2 белка A2 Forkhead Box, промотор FOXO1 белка O1 Forkhead Box, промотор FOXO4 белка O4 Forkhead Box, промотор FOX3, промотор FOXG1, промотор активируемого G-белком внутреннего выпрямляющего калиевого канала 2 (GIRK2), промотор гамма-аминомасляной кислоты GABA, промотор GAD1 глутаматдекарбоксилазы 1, промотор GRIN1 субъединицы 1 типа ионотропного рецептора глутамата NMDA, промотор гипокретина, промотор белка-энхансера гена инсулина (Isl1), промотор LHX6, промотор LHX8, промотор LMX1A транскрипционного фактора гомеобокса LIM 1-альфа, промотор транскрипционного фактора гомеобокса LIM 1-бета (LMX1B), промотор AFB, промотор MAP2, промотор ассоциированного с микротрубочками белка 2 (MAP-2), промотор миелинового основного белка MBP, промотор NADPH, промотор нестина, промотор NGF, промотор NGFI-B, промотор NKX2.1, промотор NKX2.2, промотор NKX6.2, промотор NPAS1, промотор Nurr1, промотор NURR1, промотор OLIG2, промотор спареного белка-бокса (Pax6), промотор PAX6, промотор POMC, промотор PV, промотор RAX, промотор SATB2, промотор SIX6, промотор SLC1A6 члена 6 семейства 1 растворенных носителей, промотор SOX6, промотор SST, промотор TBR1, промотор TH, промотор NEUN бета-цепи 3 тубулина, промотор TUB3 бета-цепи 3 тубулина, промотор TuJ1, промотор VAChT и промотор VGLUT1.

[00534] Примеры промоторов, специфичных для эндотелиальных клеток, включают, *например*, *ангиогенно-специфичные*: Esm1, Apelin; *артериоспецифичные*: промотор Sox17, промотор Bmx. Другие примеры промоторов, специфичных для эндотелиальных клеток, включают, *например*, промотор кадгерина 5 (Cdh5, также известный как сосудистый эндотелиальный кадгерин), промотор белка, связывающего белок C эндотелиальных клеток (EPCR), промотор Fabp4, промотор Kdr (Flk1/VEGFR2), промотор тромбоцитарного фактора роста B (PDGFB), промотор Tek/Tie2, промотор кератина в случае кератиноцитов, промотор пробазина в случае эпителия предстательной железы и промотор кадгерина VE.

[00535] Примеры специфичных для церебральных эндотелиальных клеток промоторов включают, *например*, промотор AGER рецептора, специфичного для конечных продуктов гликирования, и белок 5 ABCC5, связанный с множественной лекарственной устойчивостью, промотор АТФ-ABCC2-связывающего кассетного переносчика ABCG2, промотор АТФ-зависимой транслоказы ABCB1, промотор молекулы базальноклеточной адгезии BCAM, промотор каналикулярного мультиспецифического переносчика 1 органических анионов ABCC2, промотор CD117 (c-kit), промотор CD146, промотор CD31, промотор CD34, промотор CD45, промотор клаудина-5, промотор CXCR4, промотор eNOS, промотор транспортера 3 возбуждающих аминокислот SLC1A1,

промотор GLUT-1, промотор инсулинового рецептора INSR, промотор малой субъединицы 1 переносчика больших нейтральных аминокислот SLC7A5, промотор рецептора лептина LEPR, промотор рецептора липопротеинов низкой плотности LDLR, промотор LRP1 белка 1, родственного рецептору липопротеинов низкой плотности, промотор ABCC1 белка 1, связанного с множественной лекарственной устойчивостью, промотор ABCC4 белка 4, связанного с множественной лекарственной устойчивостью, промотор окклюдина, промотор PDGF, промотор PECAM-1, промотор р-гликопротеина, промотор рецептора захвата ретинола STRA6, промотор SDF-1, промотор натрий-связанного переносчика 5 нейтральных аминокислот SLC38A5, промотор SLC16A1 члена 1 семейства 16 растворенных переносчиков, промотор рецептора трансферрина TFRC, промотор VE-кадгерина, промотор VE-кадгерина, промотор VEGF, промотор фактора фон Виллебранда и промотор ZO-1

[00536] Примеры промоторов, специфичных для островковых клеток поджелудочной железы, включают, *например*, промотор RIP, *островковые предшественники*: промотор Pdx1 (NT-009799), промотор нейрогенина 3 (NT-008583), промотор NeuroD1 (NT-005265), промотор нестина (NT-004858) и промотор Ptf1a-p48 (NT-008705), промоторы Pax6, Insm1, Nkx2-2; *зрелые островковые клетки*: промотор инсулина (номер доступа GenBank № NT-009308), промотор глюкагона (NT-022154), промотор соматостатина (NT-005962) и промотор полипептида поджелудочной железы (NT-010755), промоторы MafB, MafA, Pcsk1, Iapp, G6pc2 и Ins1.

[00537] Примеры промоторов, специфичных для клеток пигментного эпителия сетчатки, включают, *например*, промотор гена бета-фосфодиэстеразы (Nicoud *et al.*, (2007) J. Gene Med. 9:1015), промотор конус-опсина (COP), энхансер гена межфоторецепторного ретиноид-связывающего белка (IRBP) (Nicoud *et al.* (2007)), промотор гена IRBP (Yokoyama *et al.* (1992) Exp Eye Res. 55:225), промотор красного/зеленого опсина (COP), промотор гена пигментного ретинита (Nicoud *et al.*, (2007) supra), промотор родопсинкиназы (Young *et al.* (2003) Ophthalmol. Vis. Sci. 44:4076), промотор родопсина (ROD), промотор тимоцитарного антигена (Thy1.2, 6500 п.н.) и промотор вителлиформной макулярной дистрофии (VMD2).

[00538] Примеры специфичных для гепатоцитов промоторов включают, *например*, альбумин, Miyatake *et al.* J Virol, 71:5124-32 (1997), альфа-фетопротеин (AFP), Arbuthnot *et al.,* Hum. Gene Ther, 7:1503-14 (1996), основной промотор вируса гепатита B, Sandig *et al.*, Gene Ther., 3:1002-9 (1996), промотор альфа-1-антитрипсина человека (hAAT), промотор кишечного белка, связывающего жирные кислоты, промотор тироксинсвязывающего глобулина (TBG), промоторы Apo AI и Apo AII, промотор альфа-1-антитрипсина и промотор транстиретина (Quian *et al.*, (1995) Mol Cell Biol 15, 1364-1376; Bristol J A, Gallo-Penn A, Andrews J, Idamakanti N, Kaleko M, Connelly S. (2001) Hum Gene Ther vol 12(13):1651-61).

[00539] Примеры промоторов, специфичных для клеток щитовидной железы, включают, *например*, промотор тиреоглобулина (Tg), промотор тиреопероксидазы (TPO) и

промотор рецептора TSH (TSHr).

[00540] Примеры специфичных для Т-клеток промоторов включают, *например*, промотор CD2 (Hansal *et al.*, J Immunol, 161:1063-8 (1998), промотор тяжелой цепи иммуноглобулина и промотор цепи Т-клеточного рецептора.

[00541] Примеры промоторов, специфичных для раковых клеток, включают, *например*, промотор тирозиназы или промотор TRP2 в случае клеток меланомы и меланоцитов, промотор MMTV или WAP в случае клеток молочной железы и/или рака, промотор виллина или FABP в случае кишечных клеток и/или рака, промотор нестина или GFAP в случае клеток ЦНС и/или рака и промотор секреторного белка клеток Clara в случае рака легких.

5. Промоторы, специфичные для дифференциации

[00542] В данном изобретении можно использовать любой специфичный для дифференциации промотор, известный в данной области техники. Примеры промоторов, специфичных для дифференциации, включают описанные выше. Другой способ тканеспецифичной экспрессии включает способ «BAC TG-EMBED» для зависимой от количества копий и независимой от положения экспрессии трансгена даже после индуцированного покоя и/или дифференциации клеток на несколько типов клеток, *например*, с использованием GAPDH BAC, содержащего ~200 т.п.н. локуса гена GAPDH человека и промотор UBC человека размером 1,2 т.п.н. (Chaturvedi, *et al.*, Gene Ther 25, 376-391 (2018)).

6. Домены регуляции транскрипции:

[00543] В данном изобретении можно использовать любые домены регуляции транскрипции, известные в данной области техники. Обычные домены включают, например, домены транскрипционных факторов (активаторы, репрессоры, коактиваторы, корепрессоры), сайленсеры, онкогены (например, члены семейств myc, jun, fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, mos и т. д.); ферменты репарации ДНК и связанные с ними факторы и модификаторы; ферменты перестройки ДНК и связанные с ними факторы и модификаторы; связанные с хроматином белки и их модификаторы (например киназы, ацетилазы и деацетилазы); и ДНК-модифицирующие ферменты (например, метилтрансферазы, такие как члены семейства DNMT (например, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L и т. д., топоизомеразы, геликазы, лигазы, киназы, фосфатазы, полимеразы, эндонуклеазы) и связанные с ними факторы и модификаторы. Смотрите, например, публикацию США № 2013/0253040, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки.

[00544] В данном изобретении можно использовать любой активатор транскрипции, известный в данной области техники. *Примеры активаторов транскрипции включают, например,* домен активации HSV VP 16 (*см.*, *например*, Hagmann *et al.,* J. Virol. 71, 5952-5962 (1 97)), ядерные гормональные рецепторы (см., *например*, Torchia *et al.*, Curr. Opin. Cell. Biol. 10:373-383 (1998)); субъединицу p65 ядерного фактора каппа B (Bitko & Bank, J. Virol. 72:5610-5618 (1998) и Doyle & Hunt,

Neuroreport 8:2937-2942 (1997)); Liu *et al.,* Cancer Gene Ther. 5:3-28 (1998)) или искусственные химерные функциональные домены, такие как VP64 (Beerli *et al.,* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14623-33), и дегрон (Molinari *et al.,* (1999) EMBO J. 18, 6439-6447). Дополнительные типовые домены активации включают Oct 1, Oct-2A, Spl, AP-2 и CTF1 (Seipel et al, EMBOJ. 11, 4961-4968 (1992), а также p300, CBP, PCAF, SRC1 PvALF, AtHD2A и ERF-2. Смотрите, например, Robyr *et al.* (2000) Mol. Endocrinol. 14:329-347; Collingwood *et al.* (1999) J. Mol. Endocrinol 23:255-275; Leo *et al.* (2000) Gene 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) Acta Biochim. Pol. 46:77-89; McKenna et al, (1999) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69:3-12; Malik et al, (2000) Trends Biochem. Sci. 25:277-283; и Lemon et al, (1999) Curr. Opin. Genet. Dev. 9:499-504. Дополнительные типовые домены активации включают, но не ограничиваются этим, OsGAI, HALF-1, Cl, AP1, ARF-5, -6, -1 и -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP и TRAB1. Смотрите, например, Ogawa *et al.,* (2000) Gene 245:21-29; Okanami *et al.,* (1996) Genes Cells 1:87-99; Goff *et al.,* (1991) Genes Dev. 5:298-309; Cho *et al.,* (1999) Plant Mol Biol 40:419-429; Ulmason *et al.,* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5844-5849; Sprenger-Haussels *et al.,* (2000) Plant J. 22:1-8; Gong *et al.,* (1999) Plant Mol. Biol. 41:33-44; и Hobo *et al.* , (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15,348-15,353.

[00545] В данном изобретении можно использовать любой энхансер, известный в данной области техники. Примеры энхансеров включают, *например*, энхансер ЦМВ (eCMV), энхансер RSV и энхансер SV40.

[00546] В данном изобретении может быть использован любой инсуляторный элемент, известный в данной области техники. Примеры инсуляторный элементов включают, *например*, cHS4 (Chung *et al.*, 1993), и универсальный элемент открытия хроматина (UCOE), полученный из локуса HNRPA2B1-CBX3 человека (A2UCOE).

[00547] В данном изобретении может быть использована любая гистонацетилтрансфераза (HAT), известная в данной области техники. Примеры HAT включают, *например*, типа A, локализованные в ядре, такие как члены семейства MYST MOZ, Ybf2/Sas3, MOF и Tip60, члены семейства GNAT Gcn5 или pCAF, члены семейства p300 CBP, p300 и Rttl09 (Bemdsen and Denu (2008) Curr Opin Struct Biol l8(6):682-689).

[00548] В данном изобретении можно использовать любую гистондеацетилазу (HDAC), известную в данной области техники. Примеры HDAC включают, *например*, класс I (HDAC-1, 2, 3 и 8), класс II (HDAC IIA (HDAC-4, 5, 7 и 9), HD AC IIB (HDAC 6 и 10)), класс IV (HDAC-1 1) и класс III (также известный как сиртуины (SIRT); SIRT1-7) (см. Mottamal *et al.*, (2015) Molecules 20(3):3898-394l).

[00549] В данном изобретении можно использовать любую гистоновую фосфорилазу или киназу, известные в данной области техники. Примеры гистонфосфорилаз или киназ включают, *например*, MSK1, MSK2, ATR, ATM, DNA-PK, Bubl, VprBP, IKK-a, PKCpi, Dik/Zip, JAK2, PKC5, WSTF и CK2.

[00550] В данном изобретении можно использовать любой домен метилирования, известный в данной области техники. Примеры доменов метилирования включают, *например*, Ezh2, PRMT1/6, PRMT5/7, PRMT 2/6, CARM1, set7/9, MLL, ALL-1, Suv 39h,

G9a, SETDB1, Ezh2, Set2, Dotl, PRMT 1/6, PRMT 5/7, PR-Set7 и Suv4-20h.

[00551] В данном изобретении можно использовать любые домены, участвующие в сумоилировании или биотинилировании, известные в данной области техники. Примеры доменов, участвующих в сумоилировании или биотинилировании, включают, *например*, Lys9, 13, 4, 18 и 12 (для обзора см. Kousarides (2007) Cell 128:693-705).

[00552] В данном изобретении можно использовать любой посттранскрипционный регуляторный элемент, известный в данной области техники. Примеры посттранскрипционных регуляторных элементов включают, *например*, посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE) вируса гепатита B (HBV) (HPRE) (Huang, Z. M. and Yen, T. S. (1995) Mol. Cell. Biol. 15: 3864-3869) и PRE вируса гепатита сурка (WHV) (WPRE) (патенты США №№ 6136597 и 6287814).

7. Другие способы обратного сайленсинга трансгенов

[00553] Для регулируемой сверхэкспрессии трансгенов, *например*, CD47, можно использовать любой способ, известный в данной области техники. Примеры способов, которые можно использовать для обратного сайленсинга трансгенов и регулируемой сверхэкспрессии трансгенов, включают, *например*, использование только цитоплазматических (неядерных) векторов (невирусные векторы мРНК или вирусные векторы на основе РНК с положительной цепью, такие как векторы на основе вируса Сендай); абляцию CpG, истощение CpG и минимизацию векторов ДНК; множественные вставки трансгена в случайные хромосомные участки; сайт-специфическую хромосомную интеграцию; эписомальную локализацию трансгена (компактные эписомальные репликоны вирусов SV40, полиомы, папилломы; сегмент ДНК EBNA1-oriP вируса Эпштейна-Барра (EBV) можно использовать для поддержки поддержания плазмидных генных векторов в нуклеоплазме делящихся лабораторных клеток); использование областей локус-контроля в векторах генной терапии (инсуляторы хроматина или другие цис-действующие области локус-контроля (LCR)); повторное введение вектора для компенсации сайленсинга трансгенов; низкомолекулярные энхансеры экспрессии трансгена (*например*, вещества, которые, как известно, влияют на состояние хроматина, такие как ингибиторы гистондеацетилазы трихостатин A, 4-фенилмасляная кислота, масляная кислота, валериановая кислота, капроновая кислота, вальпроевая кислота и ретиноевая кислота; низкомолекулярные энхансеры, специфичные для конкретных векторов для переноса генов, *например*, известно, что гидроксимочевина усиливает экспрессию трансгена после доставки векторами AAV); и посттрансляционные регуляторные элементы. См., *например*, Tolmachov *et al.* (2013). Silencing of Transgene Expression: A Gene Therapy Perspective. 10.5772/53379.

8. Время регулируемого снижения или сверхэкспрессии

[00554] В некоторых вариантах осуществления регулируемая сниженная экспрессия целевого гена включает регулируемую сниженную экспрессию, такую как регулируемый нокаут или нокдаун, B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB и/или RHD. Регулируемая сниженная экспрессия может быть инициирована в любой момент во время

конструирования и дифференциации клетки. Например, регулируемая сниженная экспрессия может быть инициирована, введена или индуцирована в любой момент между днем 1, *например*, днем выделения первичной клетки или днем, когда клетка становится клеткой iPSC, и днем, когда клетка окончательно дифференцируется.

[00555] В некоторых вариантах осуществления регулируемая сверхэкспрессия трансгена включает регулируемую сверхэкспрессию экзогенного полинуклеотида, такую как регулируемая сверхэкспрессия экзогенного трансгена, кодирующего один или более толерогенных факторов. Регулируемая сверхэкспрессия может быть инициирована в любой момент во время конструирования и дифференциации клетки. Например, регулируемая сверхэкспрессия может быть инициирована, введена или индуцирована в любой момент между днем 1, *например*, днем выделения первичной клетки или днем, когда клетка становится клеткой iPSC, и днем, когда клетка окончательно дифференцируется.

CIITA

[00556] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение регулируемо модулирует (*например*, снижает или устраняет) экспрессию одного или более генов ГКГС II путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии трансактиватора класса II (CIITA). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00557] CIITA является членом семейства белков богатых лейцином повторов (БЛП) ДП или нуклеотидсвязывающего домена (НСД) и регулирует транскрипцию ГКГС II путем связывания с энхансеосомой ГКГС.

[00558] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант CIITA. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог CIITA. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог CIITA.

[00559] В некоторых вариантах осуществления сниженная или устраненная

экспрессия CIITA снижает или устраняет экспрессию одного или более из следующих ГКГС класса II: HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR.

[00560] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемые модификации гена в локусе гена, кодирующем белок CIITA. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе CIITA. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок CIITA, приведена в RefSeq. № NM_000246.4 и NCBI Genbank № U18259. В некоторых случаях локус гена CIITA описан в NCBI Gene ID № 4261. В определенных случаях аминокислотная последовательность CIITA изображается как NCBI GenBank № AAA88861.1. Дополнительные описания белка CIITA и локуса гена можно найти в Uniprot № P33076, HGNC Ref. № 7067 и OMIM Ref. № 600005.

[00561] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген CIITA. В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацелена на ген CIITA с помощью регулируемой редкощепящей эндонуклеазы, содержащей регулируемый белок Cas или регулируемый полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген CIITA. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген CIITA выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:5184-36352 из таблицы 12 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента. В некоторых вариантах осуществления экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный в настоящем документе полипептид (*например*, химерный антигенный рецептор, CD47 или другой толерогенный фактор, описанный в настоящем документе), вставляют в ген CIITA.

[00562] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокаут экспрессии CIITA так, что клетки являются регулируемым образом $CIITA^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки регулируемым образом вносят индел (indel) в локус гена CIITA так, что клетки являются регулируемым образом $CIITA^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокдаун (knock down) экспрессии CIITA так, что клетки являются регулируемым образом $CIITA^{нокдаун}$.

[00563] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген CIITA, известны и описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена CIITA с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-II можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CIITA проводят методом вестерн-блоттинга клеточных

лизатов, зондированных антителами к белку CIITA. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

B2M

[00564] В некоторых вариантах осуществления технология, описанная в данном документе, регулируемо модулирует (*например*, снижает или устраняет) экспрессию одного или более генов ГКГС-I путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии вспомогательной цепи B2M. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00565] За счет модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии B2M блокируется направленная миграция молекул ГКГС-I и клетка становится гипоиммуногенной. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00566] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант B2M. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является гомологом B2M. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является ортологом B2M.

[00567] В некоторых вариантах осуществления снижение или устранение экспрессии B2M снижает или устраняет экспрессию одной или большего количества из следующих молекул ГКГС I: HLA-A, HLA-B и HLA-C.

[00568] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемые модификации гена в локусе гена, кодирующем белок B2M. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе B2M. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок B2M, приведена в RefSeq. № NM_004048.4 и Genbank № AB021288.1. В некоторых случаях локус гена B2M описан в NCBI Gene ID № 567. В определенных случаях

аминокислотная последовательность B2M изображается как NCBI GenBank № BAA35182.1. Дополнительные описания белка B2M и локуса гена можно найти в Uniprot № P61769, HGNC Ref. № 914 и OMIM Ref. № 109700.

[00569] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген B2M. В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацелена на ген B2M с помощью регулируемой редкощепящей эндонуклеазы, содержащей регулируемый белок Cas или регулируемый полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген B2M. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген B2M выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:81240-85644 из таблицы 15 WO2016183041, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный в настоящем документе полипептид (*например*, химерный антигенный рецептор, CD47 или другой толерогенный фактор, описанный в настоящем документе), вставляют в ген B2M.

[00570] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген B2M, известны и описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена B2M с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-I можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка B2M проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку B2M. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

[00571] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокаут экспрессии B2M так, что клетки являются регулируемыми $B2M^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки регулируемым образом вносят индел в локус гена B2M так, что клетки являются регулируемыми $B2M^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокдаун (knock down) экспрессии B2M так, что клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *B2M*.

NLRC5

[00572] В некоторых вариантах осуществления технология, описанная в данном документе, регулируемо модулирует (*например*, снижает или устраняет) экспрессию одного или более генов ГКГС-I путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии семейства NLR, домена CARD, содержащего 5/ NOD27/CLR16.1 (NLRC5). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*,

CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00573] NLRC5 является важным регулятором иммунных ответов, опосредованных ГКГС I, и, подобно CIITA, NLRC5 в высокой степени индуцируется IFN-γ и может транслоцироваться в ядро. NLRC5 активирует промоторы генов ГКГС I и индуцирует транскрипцию ГКГС I, а также родственных генов, участвующих в презентации антигена ГКГС I.

[00574] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой вариант NLRC5. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог NLRC5. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог NLRC5.

[00575] В некоторых вариантах осуществления снижение или устранение экспрессии NLRC5 снижает или устраняет экспрессию одной или более из следующих молекул ГКГС I: HLA-A, HLA-B и HLA-C.

[00576] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген NLRC5. В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацелена на ген NLRC5 с помощью регулируемой редкощепящей эндонуклеазы, содержащей регулируемый белок Cas или регулируемый полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген NLRC5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген NLRC5 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:36353-81239 из приложения 3 или таблицы 14 WO2016183041, описание которой в полном объеме включено посредством ссылки.

[00577] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген NLRC5, известны и описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена NLRC5 с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-I можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте

осуществления выявление экспрессии белка NLRC5 проводят методом 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).

[00578] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокаут экспрессии NLRC5 так, что клетки являются регулируемыми *NLRC5*$^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки регулируемым образом вносят индел в локус гена NLRC5 так, что клетки являются регулируемыми *NLRC5*$^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокдаун (knock down) экспрессии NLRC5 так, что клетки являются регулируемыми с ^{нокдауном} *NLRC5*.

TRAC

[00579] В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе технологии позволяют регулируемо модулировать (например, снижать или устранять) экспрессию генов TCR, включая ген TRAC, путем регулируемого нацеливания и модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00580] За счет модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии TRAC блокируется перенос молекул TCR на поверхность. В некоторых вариантах осуществления клетка также обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00581] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант TRAC. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог TRAC. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог TRAC.

[00582] В некоторых вариантах осуществления сниженная или устраненная экспрессия TRAC снижает или устраняет поверхностную экспрессию TCR.

[00583] В некоторых вариантах осуществления клетки, такие как, но не ограничиваясь этим, плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, Т-клетки, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, первичные Т-клетки и клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат регулируемые модификации генов в локусе гена, кодирующего белок TRAC. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе TRAC. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок TRAC, приведена 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 и локуса гена TRAC можно найти в Uniprot № P01848, HGNC Ref. № 12029, и OMIM Ref. № 186880.

[00584] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген TRAC. В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацелена на ген TRAC с помощью регулируемой редкощепящей эндонуклеазы, содержащей регулируемый белок Cas или регулируемый полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRAC. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRAC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:532-609 и 9102-9797 из US20160348073, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[00585] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген TRAC, известны и описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена TRAC с помощью ПЦР и снижение экспрессии TCR можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка TRAC проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку TRAC. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

[00586] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокаут экспрессии TRAC так, что клетки являются регулируемым образом $TRAC^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки регулируемым образом вносят индел (indel) в локус гена TRAC так, что клетки являются регулируемым образом $TRAC^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокдаун (knock down) экспрессии TRAC

так, что клетки являются регулируемым образом $TRAC^{knock\ down}$.

TRB

[00587] Во многих вариантах осуществления описанные в данном документе технологии позволяют регулируемо модулировать (например, снижать или устранять) экспрессию генов TCR, включая ген кодирующий бета-цепь Т-клеточного антигенного рецептора (например, ген TRB, TRBC или TCRB), путем регулируемого нацеливания и модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии константной области бета-цепи Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00588] За счет модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии TRB блокируется перенос молекул TCR на поверхность. В некоторых вариантах осуществления клетка также обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00589] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант TRB. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог TRB. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог TRB.

[00590] В некоторых вариантах осуществления сниженная или устраненная экспрессия TRB снижает или устраняет поверхностную экспрессию TCR.

[00591] В некоторых вариантах осуществления клетки, такие как, но не ограничиваясь этим, плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, Т-клетки, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, первичные Т-клетки и клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат регулируемые модификации генов в локусе гена, кодирующего белок TRB. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе гена TRB. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок TRB, приведена 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 локуса гена TRB можно найти в GenBank № L36092.2, Uniprot № P0DSE2 и HGNC Ref. № 12155.

[00592] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген TRB. В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацелена на ген TRB с помощью регулируемой редкощепящей эндонуклеазы, содержащей регулируемый белок Cas или регулируемый полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRB. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRB выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:610-765 и 9798-10532 из US20160348073, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[00593] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген TRB, известны и описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена TRB с помощью ПЦР и снижение экспрессии TCR можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка TRB проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку TRB. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

[00594] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокаут экспрессии TRB так, что клетки являются регулируемым образом $TRB^{-/-}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки регулируемым образом вносят индел в локус гена TRB так, что клетки являются регулируемым образом $TRB^{индел/индел}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки имеют регулируемый нокдаун (knock down) экспрессии TRB так, что клетки являются регулируемым образом $TRB^{knock\ down}$.

CD142

[00595] В определенных вариантах осуществления описанная в данном документе технология позволяет модулировать (например, снижать или устранять) экспрессию CD142, который также известен как тканевый фактор, фактор III и F3. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas).

[00596] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой CD142 или вариант CD142. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет

собой гомолог CD142. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог CD142.

[00597] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген CD142. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеливающая на ген CD142 редкощепящую эндонуклеазу, включает в себя белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического нацеливания на ген CD142. Применимые способы идентификации последовательностей нРНК для нацеливания на CD142 описаны ниже.

[00598] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген CD142, известны и описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена CD142 с помощью ПЦР и снижение экспрессии CD142 можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CD142 проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку CD142. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

[00599] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом CD142 приведена, например, в GeneCard Identifier GC01M094530, HGNC № 3541, NCBI Gene ID 2152, эталонных последовательностях NCBI №№ NM_001178096.1, NM_001993.4, NP_001171567.1 и NP_001984.1, UniProt № P13726 и т. п.

RHD

[00600] В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, регулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию антигена RhD путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии гена RHD. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00601] В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00602] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант гена RHD. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог гена RHD. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог гена RHD.

[00603] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемые генами модификации генного локуса, кодирующего антигенный белок RhD. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе RHD. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенный белок RhD, представлена в эталонных последовательностях №№ NM_001127691.2, NM_001282868.1, NM_001282869.1, NM_001282871.1 или NM_016124.4, или в Genbank № L08429. В некоторых случаях локус гена RHD описан в NCBI Gene ID № 6007. В некоторых случаях аминокислотная последовательность антигенного белка RhD обозначена как NCBI GenBank № AAA02679.1. Дополнительные описания белка RhD и локуса гена можно найти в Uniprot № Q02161, HGNC Ref. № 10009, и OMIM Ref. № 111680.

[00604] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген RHD. В некоторых вариантах осуществления регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген RHD, создают путем регулируемого редактирования гена RHD с использованием регулируемых инструментов редактирования генов, таких как, помимо прочего, регулируемые CRISPR/Cas, регулируемые нуклеазы TALE, регулируемые нуклеазы с цинковыми пальцами, другие регулируемые вирусные система редактирования генов, или регулируемая РНК-интерференция. В некоторых вариантах осуществления редактирование гена нацелено на кодирующую последовательность гена RHD. В некоторых случаях клетки не генерируют функциональный продукт гена RHD. В отсутствие продукта гена RHD в клетках полностью отсутствует антиген группы крови Rh.

[00605] В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацеленная на ген RHD с помощью редкощепящей эндонуклеазы, включает регулируемый белок Cas или полинуклеотид, кодирующий регулируемый белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического воздействия на ген RHD. Применимые способы идентификации последовательностей нРНК для нацеливания на RHD описаны ниже.

[00606] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген RHD, известны и описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена RHD с помощью ПЦР и снижение экспрессии RHD

можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка RhD проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку RhD. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

Y-сцепленный протокадгерин-11

[00607] В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, регулируемо модулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию одного или более генов Y-хромосомы путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии гена Y-хромосомы. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00608] В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00609] В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, регулируемо модулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию Y-сцепленного протокадгерина-11 путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии Y-сцепленного протокадгерина-11, *например*, PCDH11Y. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, регулируемо модулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию одного или более генов Y-хромосомы путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии гена Y-хромосомы. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с помощью системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или

индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00610] В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00611] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант гена PCDH11Y. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог гена PCDH11Y. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог гена PCDH11Y.

[00612] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемые модификации гена в генном локусе, кодирующем антигенный белок Y-сцепленного протокадгерина-11. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе PCDH11Y. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенный белок Y-сцепленного протокадгерина-11, представлена в эталонных последовательностях №№ NM_001278619.1, NM_032971.2, NM_032972.2, NM_032973.2 или XM_017030082.1, или в Genbank №№ AJ276803, AF277053, AF332216, AF332217, AJ564958, AJ564959, AJ564960, AJ564961, AJ564962, AJ564963, AJ564966 или AJ56496. В некоторых случаях локус гена PCDH11Y описан в NCBI Gene ID № 83259. В некоторых случаях аминокислотная последовательность антигена Y-сцепленного протокадгерина-11 обозначена как NCBI GenBank №№ CAC13122.1, AAL55729.1, AAK13468.1, AAK13469.1, CAD92429.1, CAD92430.1, CAD92431.1, CAD92432.1, CAD92433.1, CAD92434.1, CAD92437.1 или CAD92440.1. Дополнительные описания антигенного белка Y-сцепленного протокадгерина-11 и локуса гена можно найти в Uniprot № Q9BZA8, HGNC Ref. № 15813, и OMIM Ref. № 400022.

[00613] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген PCDH11Y. В некоторых вариантах осуществления регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген PCDH11Y, создают путем регулируемого редактирования гена PCDH11Y с использованием регулируемых инструментов редактирования генов, таких как, помимо прочего, регулируемые CRISPR/Cas,

регулируемые нуклеазы TALE, регулируемые нуклеазы с цинковыми пальцами, другие регулируемые вирусные система редактирования генов, или регулируемая РНК-интерференция. В некоторых вариантах осуществления редактирование гена нацелено на кодирующую последовательность гена PCDH11Y. В некоторых случаях клетки не генерируют функциональный продукт гена PCDH11Y. В отсутствие продукта гена PCDH11Y в клетках полностью отсутствует антиген Y-сцепленного протокадгерина-11.

[00614] В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацеленная на ген PCDH11Y с помощью редкощепящей эндонуклеазы, включает регулируемый белок Cas или полинуклеотид, кодирующий регулируемый белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического воздействия на ген PCDH11Y. Применимые способы идентификации последовательностей нРНК для нацеливания на PCDH11Y описаны ниже.

[00615] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген PCDH11Y, известны и описаны в настоящем документе. В одном варианте осуществления полученную генетическую модификацию гена PCDH11Y с помощью ПЦР и снижение экспрессии антигенного белка Y-сцепленного протокадгерина-11 можно оценить с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления экспрессию антигенного белка Y-сцепленного протокадгерина-11, определяют с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к антигенному белку Y-сцепленного протокадгерина-11. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

Y-сцепленный нейролигин-4

[00616] В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, регулируемо модулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию Y-сцепленного нейролигина-4 путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии Y-сцепленного нейролигина-4, *например*, NLGN4Y. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного

или индуцируемого дегрона.

[00617] В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00618] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант гена NLGN4Y. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог гена NLGN4Y. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог гена NLGN4Y.

[00619] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемые модификации гена в генном локусе, кодирующем антигенный белок Y-сцепленного нейролигина-4. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе NLGN4Y. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенный белок Y-сцепленного нейролигина-4, представлена в эталонных последовательностях №№ NM_001164238.1, NM_001206850.1, NM_014893.4, XM_017030034.1, XM_017030035.1, XM_017030036.1, XM_017030037.1, XM_017030038.1, XM_017030040.1 или XM_017030041.1, или в Genbank №№ AF376804, AB023168, BX537428, AC010726, AC010879, AC010979, AC011903, BC032567, BC113525 или BC113551. В некоторых случаях локус гена NLGN4Y описан в NCBI Gene ID № 22829. В некоторых случаях аминокислотная последовательность антигена Y-сцепленного нейролигина-4 обозначена как NCBI GenBank №№ AAM46113.1, BAA76795.2, CAD97670.1, AAH32567.1, AAI13526.1 или AAI13552.1. Дополнительные описания антигенного белка Y-сцепленного нейролигина-4 и локуса гена можно найти в Uniprot № Q8NFZ3, HGNC Ref. № 15529, и OMIM Ref. № 400028.

[00620] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген NLGN4Y. В некоторых вариантах осуществления регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген NLGN4Y, создают путем редактирования гена NLGN4Y с использованием регулируемых инструментов редактирования генов, таких как, помимо прочего, регулируемые CRISPR/Cas, регулируемые нуклеазы TALE, регулируемые нуклеазы с цинковыми пальцами, другие регулируемые вирусные система редактирования генов, или регулируемая РНК-интерференция. В некоторых вариантах осуществления редактирование гена нацелено на кодирующую последовательность гена NLGN4Y. В некоторых случаях клетки не генерируют функциональный продукт гена NLGN4Y. В отсутствие продукта гена NLGN4Y в клетках полностью отсутствует антиген Y-сцепленного нейролигина-4.

[00621] В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацеленная на ген NLGN4Y с помощью редкощепящей эндонуклеазы,

включает регулируемый белок Cas или полинуклеотид, кодирующий регулируемый белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического воздействия на ген NLGN4Y. Применимые способы идентификации последовательностей нРНК для нацеливания на NLGN4Y описаны ниже.

[00622] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген NLGN4Y, известны и описаны в настоящем документе. В одном варианте осуществления полученную генетическую модификацию гена NLGN4Y с помощью ПЦР и снижение экспрессии антигенного белка Y-сцепленного нейролигина-4 можно оценить с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления экспрессию антигенного белка Y-сцепленного нейролигина-4, определяют с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к антигенному белку Y-сцепленного нейролигина-4. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

RHD

[00623] В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, регулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию антигена RhD путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии гена RHD. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с помощью системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00624] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант гена RHD. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог гена RHD. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог гена RHD.

[00625] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в настоящем документе, содержат регулируемые модификации гена в локусе гена, кодирующем антигенный белок RhD. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе RHD. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность,

кодирующая антигенный белок RhD, представлена в эталонных последовательностях №№ NM_001127691.2, NM_001282868.1, NM_001282869.1, NM_001282871.1 или NM_016124.4, или в Genbank № L08429. В некоторых случаях локус гена RHD описан в NCBI Gene ID № 6007. В некоторых случаях аминокислотная последовательность антигенного белка RhD обозначена как NCBI GenBank № AAA02679.1. Дополнительные описания белка RhD и локуса гена можно найти в Uniprot № Q02161, HGNC Ref. № 10009, и OMIM Ref. № 111680.

[00626] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген RHD. В некоторых вариантах осуществления генетическую модификацию, нацеленную на ген RHD, создают путем регулируемого редактирования гена RHD с использованием инструментов редактирования генов, таких как, помимо прочего, регулируемые CRISPR/Cas, регулируемые нуклеазы TALE, регулируемые нуклеазы с цинковыми пальцами, другие регулируемые вирусные система редактирования генов, или регулируемая РНК-интерференция. В некоторых вариантах осуществления редактирование гена нацелено на кодирующую последовательность гена RHD. В некоторых случаях клетки не генерируют функциональный продукт гена RHD. В отсутствие продукта гена RHD в клетках полностью отсутствует антиген группы крови Rh.

[00627] В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацеленная на ген RHD с помощью редкощепящей эндонуклеазы, включает регулируемый белок Cas или полинуклеотид, кодирующий регулируемый белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического воздействия на ген RHD. Применимые способы идентификации последовательностей нРНК для нацеливания на RHD описаны ниже.

[00628] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген RHD, известны и описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена RHD с помощью ПЦР и снижение экспрессии RHD можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка RhD проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку RhD. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

ABO

[00629] В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, регулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию трансферазы системы гистогруппы крови ABO (ABO) путем регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии гена ABO. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с

использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00630] В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00631] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант гена ABO. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог гена ABO. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог гена ABO.

[00632] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемые модификации гена в локусе гена, кодирующем белок ABO. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе ABO. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок ABO, приведена в RefSeq. № NM_020469.2 или в Genbank № AF134412. В некоторых случаях локус гена ABO описан в NCBI Gene ID № 28. В определенных случаях аминокислотная последовательность ABO изображается как NCBI GenBank № AAD26572.1. Дополнительные описания белка ABO и локуса гена можно найти в Uniprot № P16442, HGNC Ref. № 79, и OMIM Ref. № 110300.

[00633] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген ABO. В некоторых вариантах осуществления регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген ABO, создают путем редактирования гена ABO с использованием регулируемых инструментов редактирования генов, таких как, помимо прочего, регулируемые CRISPR/Cas, регулируемые нуклеазы TALE, регулируемые нуклеазы с цинковыми пальцами, другие регулируемые вирусные система редактирования генов, или регулируемая РНК-интерференция. В некоторых вариантах осуществления редактирование гена нацелено на кодирующую последовательность гена ABO. В некоторых случаях клетки не генерируют функциональный продукт гена ABO. В отсутствие продукта гена ABO в клетках полностью отсутствует белок ABO.

[00634] В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая

модификация, нацеленная на ген ABO с помощью редкощепящей эндонуклеазы, включает регулируемый белок Cas или полинуклеотид, кодирующий регулируемый белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического воздействия на ген ABO. Применимые способы идентификации последовательностей нРНК для нацеливания на ABO описаны ниже.

[00635] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген ABO, известны и описаны в данном документе. В одном варианте осуществления полученную генетическую модификацию гена ABO с помощью ПЦР и снижение экспрессии белка ABO можно оценить с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления экспрессию белка ABO определяют с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку ABO. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

MIC-A

[00636] В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, регулируемо модулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию одной или более последовательностей A, связанных с полипептидом ГКГС класса I (MIC-A), посредством регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии гена MIC-A. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00637] В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00638] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант гена MIC-A. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог гена MIC-A. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог гена MIC-A.

[00639] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемые модификации гена в локусе гена, кодирующем белок MIC-A. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе MIC-A. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок MIC-A, приведена в RefSeq. № NM_000247.2 или в Genbank № BC016929. В некоторых случаях локус гена MIC-A описан в NCBI Gene ID № 100507436. В определенных случаях аминокислотная последовательность MIC-A изображается как NCBI GenBank № AAH16929.1. Дополнительные - описания белка MIC-A и локуса гена можно найти в Uniprot № Q29983, HGNC Ref. № 7090, и OMIM Ref. № 600169.

[00640] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген MIC-A. В некоторых вариантах осуществления регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген MIC-A, создают путем редактирования гена MIC-A с использованием регулируемых инструментов редактирования генов, таких как, помимо прочего, регулируемые CRISPR/Cas, регулируемые нуклеазы TALE, регулируемые нуклеазы с цинковыми пальцами, другие регулируемые вирусные система редактирования генов, или регулируемая РНК-интерференция. В некоторых вариантах осуществления редактирование гена нацелено на кодирующую последовательность гена MIC-A. В некоторых случаях клетки не генерируют функциональный продукт гена MIC-A. В отсутствие продукта гена MIC-A в клетках полностью отсутствует белок MIC-A.

[00641] В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацеленная на ген MIC-A с помощью редкощепящей эндонуклеазы, включает регулируемый белок Cas или полинуклеотид, кодирующий регулируемый белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического воздействия на ген MIC-A. Применимые способы идентификации последовательностей нРНК для нацеливания на MIC-A описаны ниже.

[00642] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген MIC-A, известны и описаны в настоящем документе. В одном варианте осуществления полученную генетическую - модификацию гена MIC-A с помощью ПЦР и снижение - экспрессии белка MIC-A можно оценить с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка MIC-A проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку MIC-A. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

MIC-B

[00643] В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, регулируемо модулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию одной или более последовательностей B, связанных с полипептидом ГКГС класса I (MIC-B), посредством регулируемого нацеливания и модуляции (*например*, снижения или устранения) экспрессии гена MIC-B. В некоторых вариантах осуществления модуляция

происходит с использованием системы редактирования генов (*например*, CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе РНК, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием компонента на основе ДНК, выбранного из группы, состоящей из нокаута или нокдауна с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с использованием белкового компонента, который представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[00644] В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00645] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящему изобретению представляет собой вариант гена MIC-B. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог гена MIC-B. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог гена MIC-B.

[00646] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат регулируемые модификации гена в локусе гена, кодирующем белок MIC-B. Другими словами, клетки содержат регулируемую генетическую модификацию в локусе MIC-B. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок MIC-B, приведена в RefSeq. № NM_001289160.1 или в Genbank № AK314228. В некоторых случаях локус гена MIC-B описан в NCBI Gene ID № 4277. В определенных случаях аминокислотная последовательность MIC-B изображается как NCBI GenBank № BAG36899.1. Дополнительные описания белка MIC-B и локуса гена можно найти в Uniprot № Q29980, HGNC Ref. № 7091, и OMIM Ref. № 602436.

[00647] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген MIC-B. В некоторых вариантах осуществления регулируемую генетическую модификацию, нацеленную на ген MIC-B, создают путем редактирования гена MIC-B с использованием регулируемых инструментов редактирования генов, таких как, помимо прочего, регулируемые CRISPR/Cas, регулируемые нуклеазы TALE, регулируемые нуклеазы с цинковыми пальцами, другие регулируемые вирусные система редактирования генов, или регулируемая РНК-интерференция. В некоторых вариантах осуществления редактирование гена нацелено на кодирующую последовательность гена MIC-B. В некоторых случаях клетки не генерируют функциональный продукт гена MIC-

B. В отсутствие продукта гена MIC-B в клетках полностью отсутствует белок MIC-B.

[00648] В некоторых вариантах осуществления регулируемая генетическая модификация, нацеленная на ген MIC-B с помощью редкощепящей эндонуклеазы, включает регулируемый белок Cas или полинуклеотид, кодирующий регулируемый белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического воздействия на ген MIC-B. Ниже описаны применимые способы идентификации последовательностей нРНК, нацеленных на MIC-B.

[00649] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген MIC-B, известны и описаны в настоящем документе. В одном варианте осуществления полученную генетическую модификацию гена MIC-B с помощью ПЦР и снижение экспрессии белка MIC-B можно оценить с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка MIC-B проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку MIC-B. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

CTLA-4

[00650] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой CTLA-4 или вариант CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог CTLA-4.

[00651] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген CTLA-4. В определенных вариантах осуществления первичные Т-клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген CTLA-4. Генетическая модификация может снижать экспрессию полинуклеотидов CTLA-4 и полипептидов CTLA-4 в Т-клетках, включая первичные Т-клетки и CAR-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеливающая на ген CTLA-4 редкощепящую эндонуклеазу, включает в себя белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического нацеливания на ген CTLA-4. Применимые способы идентификации последовательностей нРНК для нацеливания на CTLA-4 описаны ниже.

[00652] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген CTLA-4, известны и описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена CTLA-4 с помощью ПЦР и снижение экспрессии CTLA-4 можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CTLA-4 проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку CTLA-4. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

[00653] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом CTLA-4 приведена, например, в GeneCard Identifier GC02P203867, HGNC № 2505, NCBI Gene ID 1493, эталонных последовательностях NCBI №№ NM_005214.4, NM_001037631.2, NP_001032720.1 и NP_005205.2, UniProt № P16410 и т. п.

PD-1

[00654] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой PD-1 или вариант PD-1. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог PD-1. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог PD-1.

[00655] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген, кодирующий белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), или ген PDCD1. В определенных вариантах осуществления первичные Т-клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген PDCD1. Генетическая модификация может снижать экспрессию полинуклеотидов PD-1 и полипептидов PD-1 в Т-клетках, включая первичные Т-клетки и CAR-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеливающая на ген PDCD1 редкощепящую эндонуклеазу, включает в себя белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты (нРНК) для специфического нацеливания на ген PDCD1. Применимые способы идентификации последовательностей нРНК для нацеливания на PD-1 описаны ниже.

[00656] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген PDCD1, известны и описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления результирующую генетическую модификацию гена PDCD1 с помощью ПЦР и снижение экспрессии PD-1 можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка PD-1 проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку PD-1. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

[00657] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом PD-1, включая ген PDCD1, приведена, например, в GeneCard Identifier GC02M241849, HGNC № 8760, NCBI Gene ID 5133, Uniprot № Q15116 и эталонных последовательностях NCBI №№ NM_005018.2 и NP_005009.2.

CD47

[00658] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к клетке или ее популяции, которые были модифицированы для регулируемой сверхэкспрессии толерантнного фактора (*например*, иммуномодулирующего полипептида) CD47. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает способ изменения клеточного генома для регулируемой сверхэкспрессии

CD47. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка регулируемо сверхэкспрессирует экзогенный CD47. В некоторых случаях клетка регулируемо экспрессирует вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD47. В некоторых вариантах осуществления клетку генетически модифицируют так, чтобы она содержала интегрированный экзогенный полинуклеотид, кодирующий регулируемый CD47, используя направляемую гомологией репарацию. В некоторых случаях клетка регулируемо экспрессирует нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD47, так что нуклеотидная последовательность вставлена в по меньшей мере один аллель безопасного или целевого локуса. В некоторых случаях клетка регулируемо экспрессирует нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD47, причем нуклеотидная последовательность вставлена в по меньшей мере один аллель локуса *AAVS1*. В некоторых случаях клетка регулируемо экспрессирует нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47 человека, причем нуклеотидная последовательность вставлена по меньшей мере в один аллель локуса *CCR5*. В некоторых случаях клетка регулируемо экспрессирует нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD47, причем нуклеотидная последовательность вставлена в по меньшей мере один аллель безопасного или целевого локуса, такого как, помимо прочего, локус гена CCR5, локус гена CXCR4, локус гена PPP1R12C, локус гена альбумина, локус гена SHS231, локус гена CLYBL, локус гена Rosa, локус гена F3 (CD142), локус гена MICA, локус гена MICB, локус гена LRP1 (CD91), локус гена HMGB1, локус гена ABO, локус гена RHD, локус гена FUT1 и локус гена KDM5D. В некоторых случаях клетка регулируемо экспрессирует нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD47, причем нуклеотидная последовательность вставлена в по меньшей мере один аллель локуса *TRAC*.

[00659] CD47 представляет собой лейкоцитарный поверхностный антиген и играет роль в клеточной адгезии и модуляции интегринов. Он экспрессируется на поверхности клетки и подает сигнал циркулирующим макрофагам «не есть» эту клетку.

[00660] В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1. В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящем документе клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность для CD47, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности (*например*, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с последовательностью, приведенной в

эталонных последовательностях NCBI №№ NM_001777.3 и NM_198793.2. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность для CD47, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_001777.3 и NM_198793.2. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая полинуклеотид CD47, представляет собой кодон-оптимизированную последовательность. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая полинуклеотид CD47, представляет собой человеческую кодон-оптимизированную последовательность.

[00661] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка содержит полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1.

[00662] Типовые аминокислотные последовательности человеческого CD47 с сигнальной последовательностью и без сигнальной последовательности приведены в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности человеческого CD47

Белок	SEQ ID NO:	Последовательность	Аминокислотные остатки
Человеческий CD47 (без сигнальной последовательности)	129	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE	ак 19-323
Человеческий CD47 (с сигнальной последовательностью)	130	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQF	ак 1-323

		GIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVG AILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYY VFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE	

[00663] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (*например*, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129, при этом полипептид CD47 имеет по существу ту же биологическую функцию и активность, что и полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (*например*, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14, при этом полипептид CD47 имеет по существу ту же биологическую функцию и активность, что и полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:130. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

[00664] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности (*например*, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:129. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности (*например*, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:130. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:130. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии в конкретной клетке.

[00665] В некоторых вариантах осуществления используют подходящую систему редактирования генов (например, систему CRISPR/Cas или любую из систем редактирования генов, описанных в данном документе) для облегчения вставки регулируемого полинуклеотида, кодирующего CD47, в геномный локус гипоиммуногенной клетки. В некоторых случаях регулируемый полинуклеотид,

кодирующий CD47, вставлен в безопасный или целевой локус, такой как, помимо прочего, локус гена AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3 (CD142), MICA, MICB, LRP1 (CD91), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 или KDM5D. В некоторых вариантах осуществления регулиремый полинуклеотид, кодирующий CD47, вставлен в локус гена B2M, локус гена CIITA, локус гена TRAC или локус гена TRB. В некоторых вариантах осуществления регулируемый полинуклеотид, кодирующий CD47, вставлен в любой из генных локусов, приведенных в таблице 16 в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления регулируемый полинуклеотид, кодирующий CD47, функционально связан с промотором.

[00666] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный или конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой условный или индуцируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[00667] В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы таким образом, чтобы они экспрессировали увеличенное количество CD47 по сравнению с клетками того же типа клеток, которые не содержат модификаций.

[00668] Уровень увеличенной экспрессии CD47 можно измерить, например, как увеличение, кратность или процент экспрессии относительно неизмененной или немодифицированной клетки дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют по меньшей мере примерно 1x, по меньшей мере примерно 1,1x, по меньшей мере примерно 1,2x, по меньшей мере примерно 1,3x, по меньшей мере примерно 1,4x, по меньшей мере примерно 1,5x, по меньшей мере примерно 1,6x, по меньшей мере примерно 1,7x, по меньшей мере примерно 1,8x, по меньшей мере примерно 1,9x, по меньшей мере примерно 2x, по меньшей мере примерно 2,1x, по меньшей мере примерно 2,2x, по меньшей мере примерно 2,3x, по меньшей мере примерно 2,4x, по меньшей мере примерно 2,5x, по меньшей мере примерно 2,6x, по меньшей мере примерно 2,7x, по меньшей мере примерно 2,8x, по меньшей мере примерно 2,9x, по меньшей мере примерно 3x, по меньшей мере примерно 3,1x, по меньшей мере примерно 3,2x, по меньшей мере примерно 3,3x, по меньшей мере примерно 3,4x, по меньшей мере примерно 3,5x, по меньшей мере примерно 3,6x, по меньшей мере примерно 3,7x, по меньшей мере примерно 3,8x, по меньшей мере примерно 3,9x, по меньшей мере примерно 4x, по меньшей мере примерно 4,1x, по меньшей мере примерно 4,2x, по меньшей мере примерно 4,3x, по меньшей мере примерно 4,4x, по меньшей мере примерно 4,5x, по меньшей мере примерно 4,6x, по меньшей мере примерно 4,7x, по

меньшей мере примерно 4,8x, по меньшей мере примерно 4,9x, по меньшей мере примерно 5x, по меньшей мере примерно 5,1x, по меньшей мере примерно 5,2x, по меньшей мере примерно 5,3x, по меньшей мере примерно 5,4x, по меньшей мере примерно 5,5x, по меньшей мере примерно 5,6x, по меньшей мере примерно 5,7x, по меньшей мере примерно 5,8x, по меньшей мере примерно 5,9x, по меньшей мере примерно 6x, по меньшей мере примерно 6,1x, по меньшей мере примерно 6,2x, по меньшей мере примерно 6,3x, по меньшей мере примерно 6,4x, по меньшей мере примерно 6,5x, по меньшей мере примерно 6,6x, по меньшей мере примерно 6,7x, по меньшей мере примерно 6,8x, по меньшей мере примерно 6,9x, по меньшей мере примерно 7x, по меньшей мере примерно 7,1x, по меньшей мере примерно 7,2x, по меньшей мере примерно 7,3x, по меньшей мере примерно 7,4x, по меньшей мере примерно 7,5x, по меньшей мере примерно 7,6x, по меньшей мере примерно 7,7x, по меньшей мере примерно 7,8x, по меньшей мере примерно 7,9x, по меньшей мере примерно 8x, по меньшей мере примерно 8,1x, по меньшей мере примерно 8,2x, по меньшей мере примерно 8,3x, по меньшей мере примерно 8,4x, по меньшей мере примерно 8,5x, по меньшей мере примерно 8,6x, по меньшей мере примерно 8,7x, по меньшей мере примерно 8,8x, по меньшей мере примерно 8,9x, по меньшей мере примерно 9x, по меньшей мере примерно 9,1x, по меньшей мере примерно 9,2x, по меньшей мере примерно 9,3x, по меньшей мере примерно 9,4x, по меньшей мере примерно 9,5x, по меньшей мере примерно 9,6x, по меньшей мере примерно 9,7x, по меньшей мере примерно 9,8x, по меньшей мере примерно 9,9x, по меньшей мере примерно 10x или более от уровня CD47, экспрессируемого в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того же типа клеток.

[00669] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 1 раз, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, по меньшей мере примерно в 1,3 раза, по меньшей мере примерно в 1,4 раза, по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 1,6 раза, по меньшей мере примерно в 1,7 раза, по меньшей мере примерно в 1,8 раза, по меньшей мере примерно в 1,9 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,1 раза, по меньшей мере примерно в 2,2 раза, по меньшей мере примерно в 2,3 раза, по меньшей мере примерно в 2,4 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 2,6 раза, по меньшей мере примерно в 2,7 раза, по меньшей мере примерно в 2,8 раза, по меньшей мере примерно в 2,9 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 3,1 раза, по меньшей мере примерно в 3,2 раза, по меньшей мере примерно в 3,3 раза, по меньшей мере примерно в 3,4 раза, по меньшей мере примерно в 3,5 раза, по меньшей мере примерно в 3,6 раза, по меньшей мере примерно в 3,7 раза, по меньшей мере примерно в 3,8 раза, по меньшей мере примерно в 3,9 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 4,1 раза, по меньшей мере примерно в 4,2 раза, по меньшей мере примерно в 4,3 раза, по меньшей мере примерно в 4,4 раза, по меньшей

мере примерно в 4,5 раза, по меньшей мере примерно в 4,6 раза, по меньшей мере примерно в 4,7 раза, по меньшей мере примерно в 4,8 раза, по меньшей мере примерно в 4,9 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 5,1 раза, по меньшей мере примерно в 5,2 раза, по меньшей мере примерно в 5,3 раза, по меньшей мере примерно в 5,4 раза, по меньшей мере примерно в 5,5 раза, по меньшей мере примерно в 5,6 раза, по меньшей мере примерно в 5,7 раза, по меньшей мере примерно в 5,8 раза, по меньшей мере примерно в 5,9 раза, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 6,1 раза, по меньшей мере примерно в 6,2 раза, по меньшей мере примерно в 6,3 раза, по меньшей мере примерно в 6,4 раза, по меньшей мере примерно в 6,5 раза, по меньшей мере примерно в 6,6 раза, по меньшей мере примерно в 6,7 раза, по меньшей мере примерно в 6,8 раза, по меньшей мере примерно в 6,9 раза, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 7,1 раза, по меньшей мере примерно в 7,2 раза, по меньшей мере примерно в 7,3 раза, по меньшей мере примерно в 7,4 раза, по меньшей мере примерно в 7,5 раза, по меньшей мере примерно в 7,6 раза, по меньшей мере примерно в 7,7 раза, по меньшей мере примерно в 7,8 раза, по меньшей мере примерно в 7,9 раза, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 8,1 раза, по меньшей мере примерно в 8,2 раза, по меньшей мере примерно в 8,3 раза, по меньшей мере примерно в 8,4 раза, по меньшей мере примерно в 8,5 раза, по меньшей мере примерно в 8,6 раза, по меньшей мере примерно в 8,7 раза, по меньшей мере примерно в 8,8 раза, по меньшей мере примерно в 8,9 раза, по меньшей мере примерно в 9 раз, по меньшей мере примерно в 9,1 раза, по меньшей мере примерно в 9,2 раза, по меньшей мере примерно в 9,3 раза, по меньшей мере примерно в 9,4 раза, по меньшей мере примерно в 9,5 раза, по меньшей мере примерно в 9,6 раза, по меньшей мере примерно в 9,7 раза, по меньшей мере примерно в 9,8 раза, по меньшей мере примерно в 9,9 раза, по меньшей мере примерно в 10 раз или более превышающий уровень CD47, экспрессируемый в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того же типа клеток.

[00670] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют по меньшей мере примерно 110%, по меньшей мере примерно 120%, по меньшей мере примерно 130%, по меньшей мере примерно 140%, по меньшей мере примерно 150%, по меньшей мере примерно 160%, по меньшей мере примерно 170%, по меньшей мере примерно 180%, по меньшей мере примерно 190%, по меньшей мере примерно 200%, по меньшей мере примерно 250%, по меньшей мере примерно 300%, по меньшей мере примерно 350%, по меньшей мере примерно 400%, по меньшей мере примерно 450%, по меньшей мере примерно 500%, по меньшей мере примерно 550%, по меньшей мере примерно 600%, по меньшей мере примерно 650%, по меньшей мере примерно 700%, по меньшей мере примерно 750%, по меньшей мере примерно 800%, по меньшей мере примерно 850%, по меньшей мере примерно 900%, по меньшей мере примерно 950%, по меньшей мере примерно 1000%, по меньшей мере примерно 1500%, по меньшей мере примерно 2000%, по меньшей мере примерно 2500%, по

меньшей мере примерно 3000%, по меньшей мере примерно 3500%, по меньшей мере примерно 4000%, по меньшей мере примерно 4500%, по меньшей мере примерно 5000%, по меньшей мере примерно 5500%, по меньшей мере примерно 6000%, по меньшей мере примерно 6500%, по меньшей мере примерно 7000%, по меньшей мере примерно 7500%, по меньшей мере примерно 8000%, по меньшей мере примерно 8500%, по меньшей мере примерно 9000%, по меньшей мере примерно 10000% или более уровня CD47, экспрессируемого в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того же типа клеток.

[00671] Уровень увеличенной экспрессии CD47 также можно измерить, например, как кратное или процентное увеличение экспрессии по сравнению с неизмененной или немодифицированной клеткой дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют уровень экспрессии CD47 по меньшей мере примерно в 0,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 2 раза выше, по меньшей мере примерно в 1 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 1,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 1,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 1,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 2 раза выше, по меньшей мере примерно в 2,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 2,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 2,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 2,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 3 раза выше, по меньшей мере примерно в 3,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 3,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 3,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 3,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 4 раза выше, по меньшей мере примерно в 4,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 4,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 4,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 4,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 5 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 5,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 5,4 раза

выше, по меньшей мере примерно в 5,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 6 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 6,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 6,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 6,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 7 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 7,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 7,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 7,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 8 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 8,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 8,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 8,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 9 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 9,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 9,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 9,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 10 раз выше или более уровня экспрессии CD47 по сравнению с уровнем CD47, экспрессируемым в неизмененной или немодифицированной клетке дикого типа того же типа клеток.

[00672] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют по меньшей мере примерно в 0,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,9 раз выше, по меньшей мере примерно 1 раз выше, по меньшей мере примерно 1,1 раз выше, по меньшей мере примерно 1,2 раза выше, по меньшей мере примерно 1,3 раза выше, по меньшей мере примерно 1,4 раза выше, по меньшей мере примерно 1,5 раз выше, по меньшей мере примерно 1,6 раз выше, по меньшей мере примерно 1,7 раз выше, по меньшей мере примерно 1,8 раз выше, по меньшей мере примерно 1,9 раз выше, по меньшей мере примерно 2 раза выше, по меньшей мере примерно 2,1 раз выше, по меньшей мере примерно 2,2 раза выше, по меньшей мере примерно 2,3 раза выше, по меньшей мере примерно 2,4 раза выше, по меньшей мере примерно 2,5 раз выше, по меньшей мере

примерно 2,6 раз выше, по меньшей мере примерно 2,7 раз выше, по меньшей мере примерно 2,8 раз выше, по меньшей мере примерно 2,9 раз выше, по меньшей мере примерно 3 раз выше, по меньшей мере примерно 3,1 раз выше, по меньшей мере примерно 3,2 раза выше, по меньшей мере примерно 3,3 раза выше, по меньшей мере примерно 3,4 раза выше, по меньшей мере примерно 3,5 раз выше, по меньшей мере примерно 3,6 раз выше, по меньшей мере примерно 3,7 раз выше, по меньшей мере примерно 3,8 раз выше, по меньшей мере примерно 3,9 раз выше, по меньшей мере примерно 4 раз выше, по меньшей мере примерно 4,1 раз выше, по меньшей мере примерно 4,2 раза выше, по меньшей мере примерно 4,3 раза выше, по меньшей мере примерно 4,4 раза выше, по меньшей мере примерно 4,5 раз выше, по меньшей мере примерно 4,6 раз выше, по меньшей мере примерно 4,7 раз выше, по меньшей мере примерно 4,8 раз выше, по меньшей мере примерно 4,9 раз выше, по меньшей мере примерно 5 раз выше, по меньшей мере примерно 5,1 раз выше, по меньшей мере примерно 5,2 раза выше, по меньшей мере примерно 5,3 раза выше, по меньшей мере примерно 5,4 раза выше, по меньшей мере примерно 5,5 раз выше, по меньшей мере примерно 5,6 раз выше, по меньшей мере примерно 5,7 раз выше, по меньшей мере примерно 5,8 раз выше, по меньшей мере примерно 5,9 раз выше, по меньшей мере примерно 6 раз выше, по меньшей мере примерно 6,1 раз выше, по меньшей мере примерно 6,2 раза выше, по меньшей мере примерно 6,3 раза выше, по меньшей мере примерно 6,4 раза выше, по меньшей мере примерно 6,5 раз выше, по меньшей мере примерно 6,6 раз выше, по меньшей мере примерно 6,7 раз выше, по меньшей мере примерно 6,8 раз выше, по меньшей мере примерно 6,9 раз выше, по меньшей мере примерно 7 раз выше, по меньшей мере примерно 7,1 раз выше, по меньшей мере примерно 7,2 раза выше, по меньшей мере примерно 7,3 раза выше, по меньшей мере примерно 7,4 раза выше, по меньшей мере примерно 7,5 раз выше, по меньшей мере примерно 7,6 раз выше, по меньшей мере примерно 7,7 раз выше, по меньшей мере примерно 7,8 раз выше, по меньшей мере примерно 7,9 раз выше, по меньшей мере примерно 8 раз выше, по меньшей мере примерно 8,1 раз выше, по меньшей мере примерно 8,2 раза выше, по меньшей мере примерно 8,3 раза выше, по меньшей мере примерно 8,4 раза выше, по меньшей мере примерно 8,5 раз выше, по меньшей мере примерно 8,6 раз выше, по меньшей мере примерно 8,7 раз выше, по меньшей мере примерно 8,8 раз выше, по меньшей мере примерно 8,9 раз выше, по меньшей мере примерно 9 раз выше, по меньшей мере примерно 9,1 раз выше, по меньшей мере примерно 9,2 раза выше, по меньшей мере примерно 9,3 раза выше, по меньшей мере примерно 9,4 раза выше, по меньшей мере примерно 9,5 раз выше, по меньшей мере примерно 9,6 раз выше, по меньшей мере примерно 9,7 раз выше, по меньшей мере примерно 9,8 раз выше, по меньшей мере примерно 9,9 раз выше, по меньшей мере примерно 10 раз выше или более уровня экспрессии CD47 по сравнению с уровнем CD47, экспрессируемым в неизмененной или немодифицированной клетке дикого типа того же типа клеток.

[00673] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют уровень экспрессии CD47 по меньшей мере примерно на 10% выше, по меньшей мере примерно на 20% выше, по меньшей мере примерно на 30% выше, по меньшей мере примерно на 40% выше, по меньшей мере примерно на 50% выше, по меньшей мере примерно на 60% выше, по меньшей мере примерно на 70% выше, по меньшей мере примерно на 80% выше, по меньшей мере примерно на 90% выше, по меньшей мере примерно на 100% выше, по меньшей мере примерно на 125% выше, по меньшей мере примерно на 150% выше, по меньшей мере примерно на 200% выше, по меньшей мере примерно на 250% выше, по меньшей мере примерно на 300% выше, по меньшей мере примерно на 350% выше, по меньшей мере примерно на 400% выше, по меньшей мере примерно на 450% выше, по меньшей мере примерно на 500% выше, по меньшей мере примерно на 550% выше, по меньшей мере примерно на 600% выше, по меньшей мере примерно на 650% выше, по меньшей мере примерно на 700% выше, по меньшей мере примерно на 750% выше, по меньшей мере примерно на 800% выше, по меньшей мере примерно на 850% выше, по меньшей мере примерно на 900% выше, по меньшей мере примерно на 950% выше, по меньшей мере примерно на 1000% выше, по меньшей мере примерно на 1500% выше, по меньшей мере примерно на 2000% выше, по меньшей мере примерно на 2500% выше, по меньшей мере примерно на 3000% выше, по меньшей мере примерно на 3500% выше, по меньшей мере примерно на 4000% выше, по меньшей мере примерно на 4500% выше, по меньшей мере примерно на 5000% выше, по меньшей мере примерно на 5500% выше, по меньшей мере примерно на 6000% выше, по меньшей мере примерно на 6500% выше, по меньшей мере примерно на 7000% выше, по меньшей мере примерно на 7500% выше, по меньшей мере примерно на 8000% выше, по меньшей мере примерно на 8500% выше, по меньшей мере примерно на 9000% выше, по меньшей мере примерно на 10000% выше или более по сравнению с уровнем CD47, экспрессируемым в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того же типа клеток.

[00674] Уровень экспрессии CD47 также можно измерить, например, как количество молекул CD47 в клетке. Например, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки экспрессируют от около 150 000 до около 1 000 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 150 000 до около 200 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 200 000 до около 250 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 250 000 до около 300 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 300 000 до около 350 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 350 000 до около 400 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в

данном документе, экспрессируют от около 400 000 до около 450 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 450 000 до около 500 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 500 000 до около 550 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 550 000 до около 600 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 600 000 до около 650 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 650 000 до около 700 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 700 000 до около 750 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 750 000 до около 800 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 800 000 до около 850 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 850 000 до около 900 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 900 000 до около 950 000 молекул CD47 на клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют от около 950 000 до около 1 000 000 молекул CD47 на клетку.

[00675] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют по меньшей мере примерно 180 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 190 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 200 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 210 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 220 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 230 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 240 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 250 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 260 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 270 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 280 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 290 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 300 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 210 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 220 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 230 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 240 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 250 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 260 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 270 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 280 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 290 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 300 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 210 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 220 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 230 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 240 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 250 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 260 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 270 000 CD47 молекул, по меньшей

мере примерно 280 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 290 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 300 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 310 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 320 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 330 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 340 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 350 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 360 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 370 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 380 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 390 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 400 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 410 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 420 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 430 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 440 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 450 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 460 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 470 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 480 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 490 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 500 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 510 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 520 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 530 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 540 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 550 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 560 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 570 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 580 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 590 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 600 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 610 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 620 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 630 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 640 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 650 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 660 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 670 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 680 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 690 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 700 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 710 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 720 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 730 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 240 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 750 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 760 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 770 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 780 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 790 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 800 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 810 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 820 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 830 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 840 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 850 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 860 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 870 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 880 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 890 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 900 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 910 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 920 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 930 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 940 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 950 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 960 000 CD47

молекул, по меньшей мере примерно 970 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 980 000 CD47 молекул, по меньшей мере примерно 990 000 CD47 молекул или по меньшей мере примерно 1 000 000 CD47 молекул на клетку.

[00676] Уровень экспрессии может быть обусловлен рядом факторов, известных специалистам в данной области техники. Например, на уровень экспрессии экзогенного полинуклеотида, кодирующего CD47, может влиять, помимо других факторов, количество копий экзогенного полинуклеотида в клетке, *например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более копий экзогенного полинуклеотида в клетке; присутствующие регуляторные элементы, такие как, *например*, любой из регуляторных элементов, описанных в данном документе или известных в данной области, включая любой из конститутивных, индуцируемых или условных промоторов, описанных в данном документе или известных в данной области техники; положение, где экзогенный полинуклеотид вставляется в геном клетки; тип вектора, используемого для введения экзогенного полинуклеотида в клетку; упорядочивание кассет в экзогенном полинуклеотиде, *например*, бицистронном и т. д.

[00677] Уровень экспрессии CD47 измеряют относительно уровня CD47, экспрессируемого в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того же типа клеток. Например, уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в Т-клетке, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной Т-клетки дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в NK-клетке, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной NK-клетки дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в эндотелиальной клетке, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной эндотелиальной клетки дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в островковой клетке поджелудочной железы, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной островковой клетки поджелудочной железы дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в клетке сердечной мышцы, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной клетки сердечной мышцы дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в гладкомышечной клетке, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной гладкомышечной клетки дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в клетке скелетных мышц передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной клетки скелетных мышц дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в гепатоците, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененного или

немодифицированного гепатоцита дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в глиальной клетке-предшественнике, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной глиальной клетки-предшественника дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в дофаминергическом нейроне, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененного или немодифицированного дофаминергического нейрона дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в пигментных эпителиальных клетках сетчатки, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной пигментной эпителиальной клетки сетчатки дикого типа; уровень экспрессии CD47, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, в клетке щитовидной железы, передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной клетки щитовидной железы дикого типа.

[00678] В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CD47 проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку CD47. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия мРНК экзогенного CD47 используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

CD24

[00679] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка или ее популяция, которая была модифицирована для экспрессии толерогенного фактора (например, иммуномодулирующего полипептида) CD24. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии CD24. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка экспрессирует экзогенный CD24. В некоторых случаях клетка экспрессирует экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD24.

[00680] CD24, который также называется термостабильным антигеном или антигеном кластера 4 мелкоклеточного рака легкого, представляет собой гликозилированный гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный поверхностный белок (Pirruccello et al., J Immunol, 1986, 136, 3779-3784; Chen et al., Glycobiology, 2017, 57, 800-806). Он связывается с Siglec-10 на клетках врожденного иммунитета. Недавно было показано, что CD24 посредством Siglec-10 действуетк ак контрольная точка врожденного иммунитета (Barkal et al., Nature, 2019, 572, 392-396).

[00681] В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящем документе клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD24, который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности (*например*, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001278666.1, NP_001278667.1,

NP_001278668.1 и NP_037362.1. В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящем документе клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD24, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001278666.1, NP_001278667.1, NP_001278668.1 и NP_037362.1.

[00682] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_00129737.1, NM_00129738.1, NM_001291739.1 и NM_013230.3. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_00129737.1, NM_00129738.1, NM_001291739.1 и NM_013230.3.

[00683] В некоторых вариантах осуществления используют подходящую систему редактирования генов (например, систему CRISPR/Cas или любую из систем редактирования генов, описанных в данном документе) для облегчения вставки полинуклеотида, кодирующего CD24, в геномный локус гипоиммуногенной клетки. В некоторых случаях полинуклеотид, кодирующий CD24, вставлен в безопасный или целевой локус, такой как, помимо прочего, локус гена AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3 (CD142), MICA, MICB, LRP1 (CD91), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 или KDM5D. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий CD24, вставлен в локус гена B2M, локус гена CIITA, локус гена TRAC или локус гена TRB. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий CD24, вставлен в любой из генных локусов, приведенных в таблице 15 в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий CD24, функционально связан с промотором.

[00684] В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CD24 проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку CD24. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия мРНК экзогенного CD24 используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

[00685] В некоторых вариантах осуществления используют подходящую систему редактирования генов (например, систему CRISPR/Cas или любую из систем редактирования генов, описанных в данном документе) для облегчения вставки полинуклеотида, кодирующего CD24, в геномный локус гипоиммуногенной клетки. В некоторых случаях полинуклеотид, кодирующий CD24, вставлен в безопасный или целевой локус, такой как, помимо прочего, локус гена AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3 (также известный как CD142), MICA, MICB, LRP1 (также известный как CD91), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 или KDM5D. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий CD24, вставлен в локус гена B2M, локус гена CIITA, локус

гена TRAC или локус гена TRB. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий CD24, вставлен в любой из генных локусов, приведенных в таблице 15 в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий CD24, функционально связан с промотором.

DUX4

[00686] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, стволовая клетка, индуцированная плюрипотентная стволовая клетка, дифференцированная клетка, гемопоэтическая стволовая клетка, первичная Т-клетка или CAR-Т-клетка) или ее популяция, содержащая геном, модифицированный для повышения экспрессии толерогенного или иммуносупрессивного фактора, такого как DUX4. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для обеспечения повышенной экспрессии DUX4. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена клетка или ее популяция, содержащая экзогенно экспрессируемые белки DUX4. В некоторых вариантах осуществления повышенная экспрессия DUX4 подавляет, снижает или устраняет экспрессию одной или более из следующих молекул ГКГС I: HLA-A, HLA-B и HLA-C.

[00687] DUX4 представляет собой транскрипционный фактор, активный в эмбриональных тканях и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках и подавленный в нормальных здоровых соматических тканях (Feng et al., 2015, ELife4; De Iaco et al., 2017, Nat Genet, 49, 941-945; Hendrickson et al., 2017, Nat Genet, 49, 925-934; Snider et al., 2010, PLoS Genet, e1001181; Whiddon et al., 2017, Nat Genet). Экспрессия DUX4 блокирует опосредованную IFN-гамма индукцию экспрессии генов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I (*например*, экспрессию *B2M*, *HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*). Экспрессия DUX4 была связана с подавлением презентации антигенов ГКГС класса I (Chew et al., Developmental Cell, 2019, 50, 1-14). DUX4 функционирует как транскрипционный фактор в (транскрипционной) программе генной экспрессии стадии расщепления. Его целевые гены включают в себя, помимо прочего, кодирующие гены, некодирующие гены и повторяющиеся элементы.

[00688] Существует по меньшей мере две изоформы DUX4, при этом наибольшая изоформа содержит С-концевой домен активации транскрипции DUX4. Изоформы образуются вследствие альтернативного сплайсинга.См., *например*, Geng et al., 2012, Dev Cell, 22, 38-51; Snider et al., 2010, PLoS Genet, e1001181. Активные изоформы DUX4 содержат его N-концевые ДНК-связывающие домены и его С-концевой домен активации. См., *например*, Choi et al., 2016, Nucleic Acid Res, 44, 5161-5173.

[00689] Было показано, что уменьшение числа мотивов CpG в DUX4 снижает сайленсинг трансгена DUX4 (Jagannathan et al., Human Molecular Genetics, 2016, 25(20):4419-4431). Последовательность нуклеиновой кислоты, приведенная в Jagannathan et al. выше, представляет собой последовательность DUX4 с измененными кодонами, содержащую одну или большее количество замен оснований для уменьшения общего

числа сайтов CpG с сохранением при этом последовательности белка DUX4. Последовательность нуклеиновой кислоты доступна на коммерческой основе от Addgene, № по каталогу 99281.

[00690] Во многих вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере один или большее количество полинуклеотидов для облегчения экзогенной экспрессии DUX4 клеткой, *например*, стволовой клеткой, индуцированной плюрипотентной стволовой клеткой, дифференцированной клеткой, гемопоэтической стволовой клеткой, первичной Т-клеткой или CAR-T-клеткой.

[00691] В некоторых вариантах осуществления используют подходящую систему редактирования генов (*например*, систему CRISPR/Cas или любую из систем редактирования генов, описанных в настоящем документе) для облегчения вставки полинуклеотида, кодирующего DUX4, в геномный локус гипоиммуногенной клетки. В некоторых случаях полинуклеотид, кодирующий DUX4, вставлен в безопасный или целевой локус, такой как, помимо прочего, локус гена AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3 (CD142), MICA, MICB, LRP1 (CD91), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 или KDM5D. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий DUX4, вставлен в локус гена B2M, локус гена CIITA, локус гена TRAC или локус гена TRB. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий DUX4, вставлен в любой из генных локусов, приведенных в таблице 15 в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий DUX4, функционально связан с промотором.

[00692] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая DUX4, содержит полинуклеотидную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность DUX4 с измененными кодонами, содержащую одну или более замен оснований для уменьшения общего числа сайтов CpG с сохранением при этом последовательности белка DUX4. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая DUX4, содержащая одну или большее количество замен оснований для уменьшения общего числа сайтов CpG, имеет по меньшей мере 85% (*например*, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с SEQ ID NO:1 из PCT/US2020/44635, поданной 31 июля 2020 г. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая DUX4, представляет собой SEQ ID NO:1 из PCT/US2020/44635.

[00693] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая DUX4, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID

NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:29, приведенные в PCT/US2020/44635. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая DUX4, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:29. Аминокислотные последовательности, приведенные как SEQ ID NO:2-29, проиллюстрированы на Фиг. 1A-1G в PCT/US2020/44635.

[00694] В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ACN62209.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ACN62209.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в эталонной последовательности NCBI № NP_001280727.1, или аминокислотной последовательностью, представленной в эталонной последовательности NCBI № NP_001280727.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ACP30489.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ACP30489.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в UniProt № P0CJ85.1, или аминокислотной последовательностью, представленной в UniProt № P0CJ85.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № AUA60622.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № AUA60622.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24683.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24683.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером

доступа GenBank № ACN62210.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ACN62210.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24706.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24706.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24685.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24685.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ACP30488.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ACP30488.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24687.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24687.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ACP30487.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ACP30487.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24717.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24717.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24690.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24690.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24689.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24689.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24692.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24692.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под

номером доступа GenBank № ADK24693.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24693.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24712.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24712.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24691.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24691.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в UniProt № P0CJ87.1, или аминокислотной последовательностью, представленной в UniProt № P0CJ87.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24714.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24714.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24684.1, или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24684.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24695.1 или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24695.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24699.1 или аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank № ADK24699.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в эталонной последовательности NCBI № NP_001768.1, или аминокислотной последовательностью, представленной в эталонной последовательности NCBI № NP_001768. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, приведенной в эталонной последовательности NCBI № NP_942088.1, или аминокислотную последовательность, приведенную в эталонной последовательности NCBI № NP_942088.1. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%

идентичности последовательности с SEQ ID NO:28, приведенной в PCT/US2020/44635, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, приведенную в PCT/US2020/44635. В некоторых случаях полипептид DUX4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:29, приведенной в PCT/US2020/44635, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, приведенную в PCT/US2020/44635.

[00695] В других вариантах осуществления экспрессию толерогенных факторов облегчают, используя экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность DUX4 с измененными кодонами, содержащую одну или большее количество замен оснований для уменьшения общего числа сайтов CpG с сохранением при этом последовательности белка DUX4. В некоторых случаях последовательность DUX4 с измененными кодонами содержит SEQ ID NO:1 из PCT/US2020/44635. В некоторых случаях последовательность DUX4 с измененными кодонами представляет собой SEQ ID NO:1 из PCT/US2020/44635. В других вариантах осуществления экспрессионный вектор содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую DUX4, содержащий SEQ ID NO:1 из PCT/US2020/44635. В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность полипептида DUX4, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:29 из PCT/US2020/44635. В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность полипептида DUX4, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:29 из PCT/US2020/44635.

[00696] Повышение экспрессии DUX4 можно оценивать, используя известные методики, такие как вестерн-блоттинг, анализы ELISA, анализы FACS, иммуноанализы и т. п.

Дополнительные толерогенные факторы

[00697] В определенных вариантах осуществления в клетки с отредактированным геномом можно вставлять или повторно вставлять один или более толерогенных факторов для создания иммунопривилегированных универсальных донорных клеток, таких как

универсальные донорные стволовые клетки, универсальные донорные Т-клетки или универсальные донорные клетки. В определенных вариантах осуществления описанные в настоящем документе гипоиммуногенные клетки были дополнительно модифицированы для экспрессии одного или более толерогенных факторов. Типовые толерогенные факторы включают в себя, помимо прочего, один или большее количество из CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и Serpinb9. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы, состоящей из CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FasL, Serpinb9, CCL21, CCL22 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы, состоящей из DUX4, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, ингибитора C1 и IL-35. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, ингибитора C1 и IL-35. IB некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы, включающей в себя CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептор, IL15-RF и Serpinb9.

[00698] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом CD27 (который также известен как рецептор CD27L, рецептор суперсемейства факторов некроза опухолей 7, TNFSF7, антиген активации Т-клеток S152, Tp55 и T14) приведена, например, в GeneCard Identifier GC12P008144, HGNC № 11922, NCBI Gene ID 939, Uniprot № P26842 и эталонных последовательностях NCBI №№ NM_001242.4 и NP_001233.1.

[00699] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом CD46 приведена, например, в GeneCard Identifier GC01P207752, HGNC № 6953, NCBI Gene ID 4179, Uniprot № P15529 и эталонных последовательностях NCBI №№ NM_002389.4, NM_153826.3, NM_172350.2, NM_172351.2, NM_172352.2 NP_758860.1, NM_172353.2, NM_172359.2, NM_172361.2, NP_002380.3, NP_722548.1, NP_758860.1, NP_758861.1, NP_758862.1, NP_758863.1, NP_758869.1 и NP_758871.1.

[00700] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом CD55 (также известном как комплементзависимый стимулятор гемолиза) приведена, например, в GeneCard Identifier GC01P207321, HGNC № 2665, NCBI Gene ID 1604, Uniprot № P08174 и эталонных последовательностях NCBI №№ NM_000574.4, NM_001114752.2, NM_001300903.1, NM_001300904.1, NP_000565.1, NP_001108224.1, NP_001287832.1, and NP_001287833.1.

[00701] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом CD59 приведена, например, в GeneCard Identifier GC11M033704, HGNC № 1689, NCBI Gene ID 966, Uniprot № P13987 и эталонных последовательностях NCBI №№

NP_000602.1, NM_000611.5, NP_001120695.1, NM_001127223.1, NP_001120697.1, NM_001127225.1, NP_001120698.1, NM_001127226.1, NP_001120699.1, NM_001127227.1, NP_976074.1, NM_203329.2, NP_976075.1, NM_203330.2, NP_976076.1 и NM_203331.2.

[00702] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом CD200 приведена, например, в GeneCard Identifier GC03P112332, HGNC № 7203, NCBI Gene ID 4345, Uniprot № P41217 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001004196.2, NM_001004196.3, NP_001305757.1, NM_001318828.1, NP_005935.4, NM_005944.6, XP_005247539.1 и XM_005247482.2.

[00703] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом HLA-C приведена, например, в GeneCard Identifier GC06M031272, HGNC № 4933, NCBI Gene ID 3107, Uniprot № P10321 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_002108.4 и NM_002117.5.

[00704] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом HLA-E приведена, например, в GeneCard Identifier GC06P047281, HGNC № 4962, NCBI Gene ID 3133, Uniprot № P13747 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_005507.3 и NM_005516.5.

[00705] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом HLA-G приведена, например, в GeneCard Identifier GC06P047256, HGNC № 4964, NCBI Gene ID 3135, Uniprot № P17693 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_002118.1 и NM_002127.5.

[00706] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом PD-L1 or CD274 приведена, например, в GeneCard Identifier GC09P005450, HGNC № 17635, NCBI Gene ID 29126, Uniprot № Q9NZQ7 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001254635.1, NM_001267706.1, NP_054862.1 и NM_014143.3.

[00707] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом IDO1 приведена, например, в GeneCard Identifier GC08P039891, HGNC № 6059, NCBI Gene ID 3620, Uniprot № P14902 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_002155.1 и NM_002164.5.

[00708] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом IL-10 приведена, например, в GeneCard Identifier GC01M206767, HGNC № 5962, NCBI Gene ID 3586, Uniprot № P22301 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_000563.1 и NM_000572.2.

[00709] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом лиганде Fas (который также известен как FasL, FASLG, CD178, TNFSF6 и т. п.) приведена, например, в GeneCard Identifier GC01P172628, HGNC № 11936, NCBI Gene ID 356, Uniprot № P48023 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_000630.1, NM_000639.2, NP_001289675.1 и NM_001302746.1.

[00710] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом CCL21 приведена, например, в GeneCard Identifier GC09M034709, HGNC №

10620, NCBI Gene ID 6366, Uniprot № O00585 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_002980.1 и NM_002989.3.

[00711] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом CCL22 приведена, например, в GeneCard Identifier GC16P057359, HGNC № 10621, NCBI Gene ID 6367, Uniprot № O00626 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_002981.2, NM_002990.4, XP_016879020.1 и XM_017023531.1.

[00712] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом Mfge8 приведена, например, в GeneCard Identifier GC15M088898, HGNC № 7036, NCBI Gene ID 4240, Uniprot № Q08431 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001108086.1, NM_001114614.2, NP_001297248.1, NM_001310319.1, NP_001297249.1, NM_001310320.1, NP_001297250.1, NM_001310321.1, NP_005919.2 и NM_005928.3.

[00713] Полезная геномная, полинуклеотидная и полипептидная информация о человеческом SerpinB9 приведена, например, в GeneCard Identifier GC06M002887, HGNC № 8955, NCBI Gene ID 5272, Uniprot № P50453 и эталонных последовательностях NCBI №№ NP_004146.1, NM_004155.5, XP_005249241.1 и XM_005249184.4.

[00714] Способы модуляции экспрессии генов и факторов (белков) включают технологии редактирования генома и технологии экспрессии РНК или белка и т. п. В случае всех этих технологий используют хорошо известные рекомбинантные технологии для создания рекомбинантных нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе.

[00715] В некоторых вариантах осуществления клетки (*например*, стволовая клетка, индуцированная плюрипотентная стволовая клетка, дифференцированная клетка, гемопоэтическая стволовая клетка, первичная Т-клетка или CAR-T-клетка) имеют генетические модификации, которые инактивируют гены B2M и CIITA и экспрессируют несколько экзогенных полипептидов, выбранных из группы, включающей в себя CD47 и DUX4, CD47 и CD24, CD47 и CD27, CD47 и CD46, CD47 и CD55, CD47 и CD59, CD47 и CD200, CD47 и HLA-C, CD47 и HLA-E, CD47 и тяжелую цепь HLA-E, CD47 и HLA-G, CD47 и PD-L1, CD47 и IDO1, CD47 и CTLA4-Ig, CD47 и ингибитор C1, CD47 и IL-10, CD47 и IL-35, CD47 и IL-39, CD47 и FasL, CD47 и CCL21, CD47 и CCL22, CD47 и Mfge8, и CD47 и Serpinb9, и любую их комбинацию. В некоторых случаях такие клетки также имеют генетическую модификацию, которая инактивирует ген CD142.

[00716] В некоторых случаях систему редактирования генов, такую как система CRISPR/Cas, используют для облегчения вставки толерогенных факторов, например, вставки толерогенных факторов в безопасный или целевой локус, такой как локус AAVS1, для активного ингибирования иммунного отторжения. В некоторых случаях толерогенные факторы вставляют в безопасный или целевой локус, используя экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления безопасный или целевой локус представляет собой локус гена AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3 (также известный как CD142), MICA, MICB, LRP1 (также известный как CD91), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 или KDM5D.

[00717] В некоторых вариантах осуществления экспрессию целевого гена (*например*, CD47 или другого гена толерогенного фактора) повышают за счет экспрессии

слитого белка или белкового комплекса, содержащего (1) сайт-специфический связывающий домен, специфический в отношении экзогенного целевого гена (*например*, CD47 или другого гена толерогенного фактора) и (2) активатор транскрипции.

[00718] В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор состоит из сайт-специфической ДНК-связывающей молекулы нуклеиновой кислоты, такой как направляющая РНК (нРНК). В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют с помощью сайт-специфических ДНК-связывающих нацеленных белков, таких как цинк-пальцевые белки (ZFP) или слитые белки, содержащие ZFP, которые также известны как цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN).

[00719] В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор содержит сайт-специфический связывающий домен, например с ДНК-связывающим белком или ДНК-связывающей нуклеиновой кислотой, который специфически связывается или гибридизируется с геном в целевой области. В некоторых вариантах осуществления предложенные полинуклеотиды или полипептиды сопряжены или образуют комплекс с сайт-специфической нуклеазой, такой как модифицированная нуклеаза. Например, в некоторых вариантах осуществления введение выполняют, используя слияние, содержащее ДНК-нацеленный белок модифицированной нуклеазы, такой как мегануклеаза или РНК-направляемая нуклеаза, например, систему на основе нуклеиновой кислоты коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)-Cas, такую как система CRISPR-Cas9. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза модифицирована так, чтобы у нее отсутствовала нуклеазная активность. В некоторых вариантах осуществления модифицированная нуклеаза представляет собой каталитически мертвую dCas9.

[00720] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический связывающий домен может быть получен из нуклеазы. Например, последовательностей распознавания хоминг-эндонуклеаз и мегануклеаз, таких как I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. Смотрите также патент США № 5420032; патент США № 6833252; Belfort *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon *et al.*, (1989) Gene 82:115-118; Perler *et al.*, (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble *et al.*, (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180; Argast *et al.*, (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 и каталог New England Biolabs. Кроме того, специфичность хоуминг-эндонуклеаз и мегануклеаз в отношении связывания ДНК может быть сконструирована для связывания не встречающихся в природе целевых сайтов. Смотрите, например, Chevalier *et al.*, (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat *et al.*, (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962; Ashworth *et al.*, (2006) Nature 441:656-659; Paques *et al.*, (2007) Current Gene Therapy 7:49-66; публикацию патента США № 2007/0117128.

[00721] Связывающие домены системы на основе цинковых пальцев, TALE и CRISPR могут быть «сконструированы» для связывания с заранее определенной нуклеотидной последовательностью, например, посредством конструирования (изменения одной или более аминокислот) области спирали распознавания встречающегося в природе

белка цинк-пальцевого белка или белка TALE. Сконструированные ДНК-связывающие белки (цинковые пальцы или TALE) представляют собой белки, не встречающиеся в природе. Рациональные критерии для конструирования включают применение правил проведения замен и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих конструкциях ZFP и/или TALE и данные по связыванию. Смотрите, например, патенты США №№ 6140081; 6453242; и 6534261; также смотрите WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496 и публикацию США № 20110301073.

[00722] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический связывающий домен содержит один или более цинк-пальцевых белков (ZFP) или их доменов, которые связываются с ДНК специфическим в отношении последовательности образом. ZFP или его домен представляет собой белок или его домен в более крупном белке, который связывает ДНК специфическим в отношении последовательности образом посредством одного или более цинковых пальцев, области аминокислотной последовательности в связывающем домене, структура которого стабилизируется за счет координации иона цинка.

[00723] Среди ZFP встречаются домены ZFP, нацеленные на конкретные последовательности ДНК, как правило, длиной 9-18 нуклеотидов, созданные за счет сборки отдельных «пальцев». ZFP включают те, в которых единственный пальцевой домен имеет длину приблизительно 30 аминокислот и содержит альфа-спираль, содержащую два инвариантных остатка гистидина, скоординированных посредством цинка, с двумя цистеинами одного бета-изгиба, и которые содержат два, три, четыре, пять или шесть пальцев. В общем случае специфичность в отношении последовательности ZFP можно менять посредством аминокислотных замен в четырех позициях спирали (−1, 2, 3 и 6) в цинк-пальцевой спирали распознавания. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ZFP или ZFP-содержащая молекула не встречаются в природе, например, сконструированы для связывания с выбранным целевым сайтом. Смотрите, например, Beerli *et al.* (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo *et al.* (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan *et al.* (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal *et al.* (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo *et al.* (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; патенты США №№ 6453242; 6534261; 6599692; 6503717; 6689558; 7030215; 6794136; 7067317; 7262054; 7070934; 7361635; 7253273; и публикации патентов США №№ 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

[00724] Многие ген-специфические сконструированные цинковые пальцы доступны на коммерческой основе. Например, Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA) разработали платформу (CompoZr) для конструирования цинковых пальцев совместно с Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), которая позволяет исследователям обойти как конструирование, так и валидацию цинковых пальцев и обеспечивает специфически нацеленные цинковые пальцы для тысяч белков (Gaj *et al.*, Trends in Biotechnology, 2013,

31(7), 397-405). В некоторых вариантах осуществления используют коммерчески доступные или специально сконструированные цинковые пальцы.

[00725] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический связывающий домен содержит встречающийся в природе или сконструированный (не встречающийся в природе) ДНК-связывающий домен на основе подобного активатору транскрипции белка (TAL), такой как в белке на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALE). См., *например*, публикацию патента США № 20110301073, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00726] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический связывающий домен получен из системы CRISPR/Cas. В общем случае «система CRISPR» в целом относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или управлении активностью CRISPR-ассоциированных («Cas») генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas, последовательность tracr (транс-активирующих CRISPR) (например tracrРНК или активную частичную tracrРНК), парную последовательность tracr (включающую «прямой повтор» и tracrРНК-процессируемый частичный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), гидовую последовательность (также называемую «спейсером» в контексте эндогенной системы CRISPR или «нацеливающей последовательностью») и/или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR.

[00727] В общем случае гидовая последовательность включает нацеливающий домен, содержащий полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную степень комплементарности с целевой полинуклеотидной последовательностью для гибридизации с целевой последовательностью и управления специфическим в отношении последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью, при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания, составляет около или более чем около 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более. В некоторых примерах нацеливающий домен нРНК является комплементарным, например по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 99% комплементарным, например полностью комплементарным, целевой последовательности в целевой нуклеиновой кислоте.

[00728] В некоторых вариантах осуществления целевой сайт расположен выше сайта инициации транскрипции целевого гена. В некоторых вариантах осуществления целевой сайт примыкает к сайту инициации транскрипции гена. В некоторых вариантах осуществления целевой сайт примыкает к сайту остановки РНК-полимеразы ниже сайта инициации транскрипции гена.

[00729] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий домен сконструирован для нацеливания на промоторную область целевого гена для стимуляции инициации транскрипции, связывания одного или более энхансеров или активаторов

транскрипции и/или РНК-полимеразы. Для нацеливания на промоторную область гена можно использовать одну или более нРНК. В некоторых вариантах осуществления можно осуществлять нацеливание на одну или более областей гена. В определенных аспектах целевые сайты расположены в пределах 600 пар оснований с любой стороны сайта инициации транскрипции (СИТ) гена.

[00730] Конструирование или идентификация последовательности нРНК, которая представляет собой или содержит последовательность, нацеленную на ген, включая экзонную последовательность и последовательности регуляторных областей, включая промоторы и активаторы, находятся в компетенции специалиста в данной области техники. Полногеномная база данных нРНК для редактирования генома CRISPR является общедоступной и содержит типовые целевые последовательности одиночной направляющей РНК (онРНК) в конститутивных экзонах генов человеческого генома или мышиного генома (смотрите, например, genescript.com/gRNA-database.html; также смотрите Sanjana et al. (2014) Nat. Methods, 11:783-4; www.e-crisp.org/E-CRISP/; crispr.mit.edu/). В некоторых вариантах осуществления последовательность нРНК представляет собой или содержит последовательность с минимальным нецелевым связыванием с нецелевым геном.

[00731] В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор дополнительно содержит функциональный домен, например, активатор транскрипции.

[00732] В некоторых вариантах осуществления активатор транскрипции представляет собой или содержит один или большее количество регуляторных элементов, таких как один или большее количество элементов контроля транскрипции целевого гена, посредством которых предложенный выше сайт-специфический домен управляет экспрессией такого гена. В некоторых вариантах осуществления активатор транскрипции управляет экспрессией целевого гена. В некоторых случаях активатор транскрипции может представлять собой или содержать весь гетерологичный домен трансактивации или его часть. Например, в некоторых вариантах осуществления активатор транскрипции выбран из полученного из вируса простого герпеса домена трансактивации, домена метилтрансферазы Dnmt3a, p65, VP16 и VP64.

[00733] В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор представляет собой цинк-пальцевой транскрипционный фактор (ZF-TF). В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор представляет собой VP64-p65-Rta (VPR).

[00734] В определенных вариантах осуществления регуляторный фактор дополнительно содержит домен регуляции транскрипции. Обычные домены включают, например, домены транскрипционных факторов (активаторы, репрессоры, коактиваторы, корепрессоры), сайленсеры, онкогены (например, члены семейств myc, jun, fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, mos и т. д.); ферменты репарации ДНК и связанные с ними факторы и модификаторы; ферменты перестройки ДНК и связанные с ними факторы и модификаторы; связанные с хроматином белки и их модификаторы (например киназы, ацетилазы и деацетилазы); и ДНК-модифицирующие ферменты (например,

метилтрансферазы, такие как члены семейства DNMT (например, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L и т. д., топоизомеразы, геликазы, лигазы, киназы, фосфатазы, полимеразы, эндонуклеазы) и связанные с ними факторы и модификаторы. Смотрите, например, публикацию США № 2013/0253040, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки.

[00735] Подходящие домены для обеспечения активации включают домен активации HSV VP 16 (смотрите, например, Hagmann *et al,* J. Virol. 71, 5952-5962 (1 97)), ядерные гормональные рецепторы (см., например, Torchia *et al.,* Curr. Opin. Cell. Biol. 10:373-383 (1998)); субъединицу p65 ядерного фактора каппа B (Bitko & Bank, J. Virol. 72:5610-5618 (1998) и Doyle & Hunt, Neuroreport 8:2937-2942 (1997)); Liu *et al.,* Cancer Gene Ther. 5:3-28 (1998)) или искусственные химерные функциональные домены, такие как VP64 (Beerli *et al.,* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14623-33), и дегрон (Molinari *et al.,* (1999) EMBO J. 18, 6439-6447). Дополнительные типовые домены активации включают Oct 1, Oct-2A, Spl, AP-2 и CTF1 (Seipel etal, EMBOJ. 11, 4961-4968 (1992), а также p300, CBP, PCAF, SRC1 PvALF, AtHD2A и ERF-2. Смотрите, например, Robyr *et al.* (2000) Mol. Endocrinol. 14:329-347; Collingwood *et al.* (1999) J. Mol. Endocrinol 23:255-275; Leo *et al.* (2000) Gene 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) Acta Biochim. Pol. 46:77-89; McKenna et al, (1999) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69:3-12; Malik et al, (2000) Trends Biochem. Sci. 25:277-283; и Lemon et al, (1999) Curr. Opin. Genet. Dev. 9:499-504. Дополнительные типовые домены активации включают, но не ограничиваются этим, OsGAI, HALF-1, Cl, AP1, ARF-5, -6, -1 и -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP и TRAB1. Смотрите, например, Ogawa *et al.,* (2000) Gene 245:21-29; Okanami *et al.,* (1996) Genes Cells 1:87-99; Goff *et al.,* (1991) Genes Dev. 5:298-309; Cho *et al.,* (1999) Plant Mol Biol 40:419-429; Ulmason *et al.,* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5844-5849; Sprenger-Haussels *et al.,* (2000) Plant J. 22:1-8; Gong *et al.,* (1999) Plant Mol. Biol. 41:33-44; и Hobo *et al.* , (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15,348-15,353.

[00736] Типовые домены репрессии, которые можно использовать для создания генетических репрессоров, включают, но не ограничиваются этим, KRAB A/B, KOX, TGF-бета-индуцибельный ранний ген (TIEG), v-erbA, SID, MBD2, MBD3, членов семейства DNMT (например, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L и т. д.), Rb и MeCP2. См., например, Bird *et al.,* (1999) Cell 99:451-454; Tyler *et al.,* (1999) Cell 99:443-446; Knoepfler *et al.,* (1999) Cell 99:447-450; и Robertson *et al.,* (2000) Nature Genet. 25:338-342. Дополнительные типовые домены репрессии включают, но не ограничиваются этим, ROM2 и AtHD2A. См., например, Chem *et al.,* (1996) Plant Cell 8:305-321; и Wu *et al.,* (2000) Plant J. 22:19-27.

[00737] В некоторых случаях домен участвует в эпигенетической регуляции хромосомы. В некоторых вариантах осуществления домен представляет собой гистонацетилтрансферазу (HAT), например типа A, локализованную в ядре, такую как члены семейства MYST MOZ, Ybf2/Sas3, MOF и Tip60, члены семейства GNAT Gcn5 или pCAF, члены семейства p300 CBP, p300 или Rttl09 (Bemdsen and Denu (2008) Curr Opin

Struct Biol 18(6):682-689). В других случаях домен представляет собой гистондеацетилазу (HD AC), например класса I (HDAC-l, 2, 3 и 8), класса II (HDAC IIA (HDAC-4, 5, 7 и 9), HD AC IIB (HDAC 6 и 10)), класса IV (HDAC-l 1), класса III (также известные как сиртуины (SIRT); SIRT1-7) (смотрите Mottamal *et al.*, (2015) Molecules 20(3):3898-394l). Другим доменом, который используют в некоторых вариантах осуществления, является гистонфосфорилаза или киназа, а примеры включают MSK1, MSK2, ATR, ATM, DNA-PK, Bubl, VprBP, IKK-a, PKCpi, Dik/Zip, JAK2, PKC5, WSTF и CK2. В некоторых вариантах осуществления используют домен метилирования, который может быть выбран из групп, таких как Ezh2, PRMT1/6, PRMT5/7, PRMT 2/6, CARM1, set7/9, MLL, ALL-1, Suv 39h, G9a, SETDB1, Ezh2, Set2, Dotl, PRMT 1/6, PRMT 5/7, PR-Set7 и Suv4-20h. Также в некоторых вариантах осуществления можно использовать домены, участвующие в сумоилировании и биотинилировании (Lys9, 13, 4, 18 и 12) (обзор смотрите в Kousarides (2007) Cell 128:693-705).

[00738] Слитые молекулы конструируют методами клонирования и биохимической конъюгации, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Слитые молекулы содержат ДНК-связывающий домен и функциональный домен (например, домен активации или репрессии транскрипции). Слитые молекулы также необязательно содержат сигналы ядерной локализации (такие как, например, из среднего Т-антигена SV40) и эпитопные теги (такие как, например, FLAG и гемагглютинин). Слитые белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) конструируют так, чтобы сохранить трансляционную рамку считывания среди компонентов слияния.

[00739] Слияния между полипептидным компонентом функционального домена (или его функционального фрагмента) с одной стороны, и небелковым ДНК-связывающим доменом (*например*, антибиотиком, интеркалятором, связывающим малую бороздку компонентом, нуклеиновой кислотой) с другой, конструируют методами биохимической конъюгации, известными специалистам в данной области техники. Смотрите, например, каталог компании Pierce Chemical Company (Rockford, IL). Методы и композиции для создания таких слияний между связывающим малую бороздку компонентом и полипептидом были описаны. Mapp *et al.*, (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3930-3935. Аналогично, CRISPR/Cas TF и нуклеазы, содержащие компонент нуклеиновой кислоты онРНК в ассоциации с функциональным доменом полипептидного компонента, также известны специалистам в данной области техники и подробно описаны в данном документе.

[00740] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, первичная Т-клетка, и гипоиммуногенная стволовая клетка, и их производное) или ее популяция, содержащая геном, который был модифицирован для регулируемой экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для регулируемой экспрессии CD47. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот

для облегчения вставки CD47 в линию клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:200784-231885 из таблицы 29 WO2016183041, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[00741] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, первичная Т-клетка, и гипоиммуногенная стволовая клетка, и их производное) или ее популяция, содержащая геном, который был модифицирован для экспрессии HLA-C. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии HLA-C. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-C в линию клеток. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:3278-5183 из таблицы 10 WO2016183041, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[00742] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, первичная Т-клетка, и гипоиммуногенная стволовая клетка, и их производное) или ее популяция, содержащая геном, который был модифицирован для экспрессии HLA-E. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии HLA-E. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-E в линию клеток. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:189859-193183 из таблицы 19 WO2016183041, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[00743] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, первичная Т-клетка, и гипоиммуногенная стволовая клетка, и их производное) или ее популяция, содержащая геном, который был модифицирован для экспрессии HLA-F. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии HLA-F. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-F в линию клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 688808-399754 из таблицы 45 WO2016183041, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[00744] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, первичная Т-клетка, и гипоиммуногенная стволовая клетка,

и их производное) или ее популяция, содержащая геном, который был модифицирован для экспрессии HLA-G. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии HLA-G. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-G в линию стволовых клеток. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:188372-189858 из таблицы 18 WO2016183041, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[00745] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, первичная Т-клетка, и гипоиммуногенная стволовая клетка, и их производное) или ее популяция, содержащая геном, который был модифицирован для экспрессии PD-L1. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии PD-L1. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки PD-L1 в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:193184-200783 из таблицы 21 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00746] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, первичная Т-клетка, и гипоиммуногенная стволовая клетка, и их производное) или ее популяция, содержащая геном, который был модифицирован для экспрессии CTLA4-Ig. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии CTLA4-Ig. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки CTLA4-Ig в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в WO2016183041, включая перечень последовательностей.

[00747] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, первичная Т-клетка, и гипоиммуногенная стволовая клетка, и их производное) или ее популяция, содержащая геном, который был модифицирован для экспрессии ингибитора CI. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии ингибитора CI. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки CI-ингибитора в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере

одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в WO2016183041, включая перечень последовательностей.

[00748] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (*например*, первичная Т-клетка, и гипоиммуногенная стволовая клетка, и их производное) или ее популяция, содержащая геном, который был модифицирован для экспрессии IL-35. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии IL-35. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки IL-35 в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в WO2016183041, включая перечень последовательностей.

[00749] В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы экспрессируют в клетке, используя экспрессионный вектор. Например, экспрессионный вектор для экспрессии CD47 в клетке содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую CD47. Экспрессионный вектор может представлять собой индуцибельный экспрессионный вектор. Экспрессионный вектор может представлять собой вирусный вектор, такой как, но не ограничиваясь этим, лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы вводят в клетки, используя фузоген-опосредованную доставку или систему на основе транспозазы, выбранную из группы, состоящей из кондициональных или индуцибельных транспозаз, кондициональных или индуцибельных транспозонов PiggyBac, кондициональных или индуцибельных транспозонов Sleeping Beauty (SB11), кондициональных или индуцибельных транспозонов Mos1 и кондициональных или индуцибельных транспозонов Tol2.

[00750] В некоторых вариантах осуществления используют подходящую систему редактирования генов (например, систему CRISPR/Cas или любую из систем редактирования генов, описанных в данном документе) для облегчения вставки полинуклеотида, кодирующего толерогенный фактор, в геномный локус гипоиммуногенной клетки. В некоторых случаях полинуклеотид, кодирующий толерогенный фактор, вставлен в безопасный или целевой локус, такой как, помимо прочего, локус гена AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3 (CD142), MICA, MICB, LRP1 (CD91), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 или KDM5D. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий толерогенный фактор, вставлен в локус гена B2M, локус гена CIITA, локус гена TRAC или локус гена TRB. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий толерогенный фактор, вставлен в любой из генных локусов, приведенных в таблице 16 в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий толерогенный фактор, функционально связан с промотором.

[00751] В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы для

экспрессии повышенного количества одного или большего количества из CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9, по сравнению с клеткой такого же клеточного типа, которая не содержит модификацию.

[00752] Уровень увеличения экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 можно измерить, например, как увеличение, кратность или процент экспрессии относительно неизмененной или немодифицированной клетки дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют по меньшей мере примерно 1x, по меньшей мере примерно 1,1x, по меньшей мере примерно 1,2x, по меньшей мере примерно 1,3x, по меньшей мере примерно 1,4x, по меньшей мере примерно 1,5x, по меньшей мере примерно 1,6x, по меньшей мере примерно 1,7x, по меньшей мере примерно 1,8x, по меньшей мере примерно 1,9x, по меньшей мере примерно 2x, по меньшей мере примерно 2,1x, по меньшей мере примерно 2,2x, по меньшей мере примерно 2,3x, по меньшей мере примерно 2,4x, по меньшей мере примерно 2,5x, по меньшей мере примерно 2,6x, по меньшей мере примерно 2,7x, по меньшей мере примерно 2,8x, по меньшей мере примерно 2,9x, по меньшей мере примерно 3x, по меньшей мере примерно 3,1x, по меньшей мере примерно 3,2x, по меньшей мере примерно 3,3x, по меньшей мере примерно 3,4x, по меньшей мере примерно 3,5x, по меньшей мере примерно 3,6x, по меньшей мере примерно 3,7x, по меньшей мере примерно 3,8x, по меньшей мере примерно 3,9x, по меньшей мере примерно 4x, по меньшей мере примерно 4,1x, по меньшей мере примерно 4,2x, по меньшей мере примерно 4,3x, по меньшей мере примерно 4,4x, по меньшей мере примерно 4,5x, по меньшей мере примерно 4,6x, по меньшей мере примерно 4,7x, по меньшей мере примерно 4,8x, по меньшей мере примерно 4,9x, по меньшей мере примерно 5x, по меньшей мере примерно 5,1x, по меньшей мере примерно 5,2x, по меньшей мере примерно 5,3x, по меньшей мере примерно 5,4x, по меньшей мере примерно 5,5x, по меньшей мере примерно 5,6x, по меньшей мере примерно 5,7x, по меньшей мере примерно 5,8x, по меньшей мере примерно 5,9x, по меньшей мере примерно 6x, по меньшей мере примерно 6,1x, по меньшей мере примерно 6,2x, по меньшей мере примерно 6,3x, по меньшей мере примерно 6,4x, по меньшей мере примерно 6,5x, по меньшей мере примерно 6,6x, по меньшей мере примерно 6,7x, по меньшей мере примерно 6,8x, по меньшей мере примерно 6,9x, по меньшей мере примерно 7x, по меньшей мере примерно 7,1x, по меньшей мере примерно 7,2x, по меньшей мере примерно 7,3x, по меньшей мере примерно 7,4x, по меньшей мере примерно 7,5x, по меньшей мере примерно 7,6x, по меньшей мере примерно 7,7x, по меньшей мере примерно 7,8x, по меньшей мере примерно 7,9x, по меньшей мере примерно 8x, по меньшей мере примерно 8,1x, по

меньшей мере примерно 8,2x, по меньшей мере примерно 8,3x, по меньшей мере примерно 8,4x, по меньшей мере примерно 8,5x, по меньшей мере примерно 8,6x, по меньшей мере примерно 8,7x, по меньшей мере примерно 8,8x, по меньшей мере примерно 8,9x, по меньшей мере примерно 9x, по меньшей мере примерно 9,1x, по меньшей мере примерно 9,2x, по меньшей мере примерно 9,3x, по меньшей мере примерно 9,4x, по меньшей мере примерно 9,5x, по меньшей мере примерно 9,6x, по меньшей мере примерно 9,7x, по меньшей мере примерно 9,8x, по меньшей мере примерно 9,9x, по меньшей мере примерно 10x или более от уровня CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, экспрессируемых в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того же типа клеток.

[00753] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 1 раз, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, по меньшей мере примерно в 1,3 раза, по меньшей мере примерно в 1,4 раза, по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 1,6 раза, по меньшей мере примерно в 1,7 раза, по меньшей мере примерно в 1,8 раза, по меньшей мере примерно в 1,9 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,1 раза, по меньшей мере примерно в 2,2 раза, по меньшей мере примерно в 2,3 раза, по меньшей мере примерно в 2,4 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 2,6 раза, по меньшей мере примерно в 2,7 раза, по меньшей мере примерно в 2,8 раза, по меньшей мере примерно в 2,9 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 3,1 раза, по меньшей мере примерно в 3,2 раза, по меньшей мере примерно в 3,3 раза, по меньшей мере примерно в 3,4 раза, по меньшей мере примерно в 3,5 раза, по меньшей мере примерно в 3,6 раза, по меньшей мере примерно в 3,7 раза, по меньшей мере примерно в 3,8 раза, по меньшей мере примерно в 3,9 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 4,1 раза, по меньшей мере примерно в 4,2 раза, по меньшей мере примерно в 4,3 раза, по меньшей мере примерно в 4,4 раза, по меньшей мере примерно в 4,5 раза, по меньшей мере примерно в 4,6 раза, по меньшей мере примерно в 4,7 раза, по меньшей мере примерно в 4,8 раза, по меньшей мере примерно в 4,9 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 5,1 раза, по меньшей мере примерно в 5,2 раза, по меньшей мере примерно в 5,3 раза, по меньшей мере примерно в 5,4 раза, по меньшей мере примерно в 5,5 раза, по меньшей мере примерно в 5,6 раза, по меньшей мере примерно в 5,7 раза, по меньшей мере примерно в 5,8 раза, по меньшей мере примерно в 5,9 раза, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 6,1 раза, по меньшей мере примерно в 6,2 раза, по меньшей мере примерно в 6,3 раза, по меньшей мере примерно в 6,4 раза, по меньшей мере примерно в 6,5 раза, по меньшей мере примерно в 6,6 раза, по меньшей мере примерно в 6,7 раза, по меньшей мере примерно в 6,8 раза, по меньшей мере примерно в 6,9 раза, по

меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 7,1 раза, по меньшей мере примерно в 7,2 раза, по меньшей мере примерно в 7,3 раза, по меньшей мере примерно в 7,4 раза, по меньшей мере примерно в 7,5 раза, по меньшей мере примерно в 7,6 раза, по меньшей мере примерно в 7,7 раза, по меньшей мере примерно в 7,8 раза, по меньшей мере примерно в 7,9 раза, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 8,1 раза, по меньшей мере примерно в 8,2 раза, по меньшей мере примерно в 8,3 раза, по меньшей мере примерно в 8,4 раза, по меньшей мере примерно в 8,5 раза, по меньшей мере примерно в 8,6 раза, по меньшей мере примерно в 8,7 раза, по меньшей мере примерно в 8,8 раза, по меньшей мере примерно в 8,9 раза, по меньшей мере примерно в 9 раз, по меньшей мере примерно в 9,1 раза, по меньшей мере примерно в 9,2 раза, по меньшей мере примерно в 9,3 раза, по меньшей мере примерно в 9,4 раза, по меньшей мере примерно в 9,5 раза, по меньшей мере примерно в 9,6 раза, по меньшей мере примерно в 9,7 раза, по меньшей мере примерно в 9,8 раза, по меньшей мере примерно в 9,9 раза, по меньшей мере примерно в 10 раз или более превышающий уровень CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, экспрессируемый в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того же типа клеток.

[00754] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют по меньшей мере примерно 110%, по меньшей мере примерно 120%, по меньшей мере примерно 130%, по меньшей мере примерно 140%, по меньшей мере примерно 150%, по меньшей мере примерно 160%, по меньшей мере примерно 170%, по меньшей мере примерно 180%, по меньшей мере примерно 190%, по меньшей мере примерно 200%, по меньшей мере примерно 250%, по меньшей мере примерно 300%, по меньшей мере примерно 350%, по меньшей мере примерно 400%, по меньшей мере примерно 450%, по меньшей мере примерно 500%, по меньшей мере примерно 550%, по меньшей мере примерно 600%, по меньшей мере примерно 650%, по меньшей мере примерно 700%, по меньшей мере примерно 750%, по меньшей мере примерно 800%, по меньшей мере примерно 850%, по меньшей мере примерно 900%, по меньшей мере примерно 950%, по меньшей мере примерно 1000%, по меньшей мере примерно 1500%, по меньшей мере примерно 2000%, по меньшей мере примерно 2500%, по меньшей мере примерно 3000%, по меньшей мере примерно 3500%, по меньшей мере примерно 4000%, по меньшей мере примерно 4500%, по меньшей мере примерно 5000%, по меньшей мере примерно 5500%, по меньшей мере примерно 6000%, по меньшей мере примерно 6500%, по меньшей мере примерно 7000%, по меньшей мере примерно 7500%, по меньшей мере примерно 8000%, по меньшей мере примерно 8500%, по меньшей мере примерно 9000%, по меньшей мере примерно 10000% или более уровня CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22,

Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, экспрессируемых в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того же типа клеток.

[00755] Уровень увеличения экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 можно также измерить, например, как кратное или процентное увеличение экспрессии относительно неизмененной или немодифицированной клетки дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют уровень экспрессии CD47 по меньшей мере примерно в 0,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 2 раза выше, по меньшей мере примерно в 1 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 1,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 1,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 1,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 1,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 2 раза выше, по меньшей мере примерно в 2,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 2,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 2,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 2,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 2,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 3 раза выше, по меньшей мере примерно в 3,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 3,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 3,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 3,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 3,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 4 раза выше, по меньшей мере примерно в 4,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 4,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 4,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 4,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 4,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 5 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 5,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 5,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 5,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 5,8 раз

выше, по меньшей мере примерно в 5,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 6 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 6,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 6,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 6,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 6,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 7 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 7,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 7,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 7,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 7,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 8 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 8,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 8,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 8,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 8,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 9 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 9,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 9,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 9,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 9,9 раз выше, по меньшей мере примерно в 10 раз выше или более уровня экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по сравнению с уровнем CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, экспрессируемыми в неизмененной или немодифицированной клетке дикого типа того же типа клеток.

[00756] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют по меньшей мере примерно в 0,1 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,2 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,3 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,4 раза выше, по меньшей мере примерно в 0,5 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,6 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,7 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,8 раз выше, по меньшей мере примерно в 0,9 раз выше, по меньшей мере примерно 1 раз выше, по меньшей мере примерно 1,1 раз выше, по меньшей мере примерно 1,2 раза выше, по меньшей мере примерно 1,3 раза выше, по меньшей мере примерно 1,4 раза выше, по меньшей мере примерно 1,5 раз выше, по меньшей мере примерно 1,6 раз выше, по меньшей мере примерно 1,7 раз выше, по меньшей мере примерно 1,8 раз выше, по меньшей мере примерно 1,9 раз выше, по меньшей мере

примерно 2 раза выше, по меньшей мере примерно 2,1 раз выше, по меньшей мере примерно 2,2 раза выше, по меньшей мере примерно 2,3 раза выше, по меньшей мере примерно 2,4 раза выше, по меньшей мере примерно 2,5 раз выше, по меньшей мере примерно 2,6 раз выше, по меньшей мере примерно 2,7 раз выше, по меньшей мере примерно 2,8 раз выше, по меньшей мере примерно 2,9 раз выше, по меньшей мере примерно 3 раз выше, по меньшей мере примерно 3,1 раз выше, по меньшей мере примерно 3,2 раза выше, по меньшей мере примерно 3,3 раза выше, по меньшей мере примерно 3,4 раза выше, по меньшей мере примерно 3,5 раз выше, по меньшей мере примерно 3,6 раз выше, по меньшей мере примерно 3,7 раз выше, по меньшей мере примерно 3,8 раз выше, по меньшей мере примерно 3,9 раз выше, по меньшей мере примерно 4 раз выше, по меньшей мере примерно 4,1 раз выше, по меньшей мере примерно 4,2 раза выше, по меньшей мере примерно 4,3 раза выше, по меньшей мере примерно 4,4 раза выше, по меньшей мере примерно 4,5 раз выше, по меньшей мере примерно 4,6 раз выше, по меньшей мере примерно 4,7 раз выше, по меньшей мере примерно 4,8 раз выше, по меньшей мере примерно 4,9 раз выше, по меньшей мере примерно 5 раз выше, по меньшей мере примерно 5,1 раз выше, по меньшей мере примерно 5,2 раза выше, по меньшей мере примерно 5,3 раза выше, по меньшей мере примерно 5,4 раза выше, по меньшей мере примерно 5,5 раз выше, по меньшей мере примерно 5,6 раз выше, по меньшей мере примерно 5,7 раз выше, по меньшей мере примерно 5,8 раз выше, по меньшей мере примерно 5,9 раз выше, по меньшей мере примерно 6 раз выше, по меньшей мере примерно 6,1 раз выше, по меньшей мере примерно 6,2 раза выше, по меньшей мере примерно 6,3 раза выше, по меньшей мере примерно 6,4 раза выше, по меньшей мере примерно 6,5 раз выше, по меньшей мере примерно 6,6 раз выше, по меньшей мере примерно 6,7 раз выше, по меньшей мере примерно 6,8 раз выше, по меньшей мере примерно 6,9 раз выше, по меньшей мере примерно 7 раз выше, по меньшей мере примерно 7,1 раз выше, по меньшей мере примерно 7,2 раза выше, по меньшей мере примерно 7,3 раза выше, по меньшей мере примерно 7,4 раза выше, по меньшей мере примерно 7,5 раз выше, по меньшей мере примерно 7,6 раз выше, по меньшей мере примерно 7,7 раз выше, по меньшей мере примерно 7,8 раз выше, по меньшей мере примерно 7,9 раз выше, по меньшей мере примерно 8 раз выше, по меньшей мере примерно 8,1 раз выше, по меньшей мере примерно 8,2 раза выше, по меньшей мере примерно 8,3 раза выше, по меньшей мере примерно 8,4 раза выше, по меньшей мере примерно 8,5 раз выше, по меньшей мере примерно 8,6 раз выше, по меньшей мере примерно 8,7 раз выше, по меньшей мере примерно 8,8 раз выше, по меньшей мере примерно 8,9 раз выше, по меньшей мере примерно 9 раз выше, по меньшей мере примерно 9,1 раз выше, по меньшей мере примерно 9,2 раза выше, по меньшей мере примерно 9,3 раза выше, по меньшей мере примерно 9,4 раза выше, по меньшей мере примерно 9,5 раз выше, по меньшей мере примерно 9,6 раз выше, по меньшей мере примерно 9,7 раз выше, по меньшей мере примерно 9,8 раз выше, по меньшей мере примерно 9,9 раз выше, по меньшей мере

примерно 10 раз выше или более уровня экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по сравнению с уровнем CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, экспрессируемыми в неизмененной или немодифицированной клетке дикого типа того же типа клеток.

[00757] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, экспрессируют уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 10% выше, по меньшей мере примерно на 20% выше, по меньшей мере примерно на 30% выше, по меньшей мере примерно на 40% выше, по меньшей мере примерно на 50% выше, по меньшей мере примерно на 60% выше, по меньшей мере примерно на 70% выше, по меньшей мере примерно на 80% выше, по меньшей мере примерно на 90% выше, по меньшей мере примерно на 100% выше, по меньшей мере примерно на 125% выше, по меньшей мере примерно на 150% выше, по меньшей мере примерно на 200% выше, по меньшей мере примерно на 250% выше, по меньшей мере примерно на 300% выше, по меньшей мере примерно на 350% выше, по меньшей мере примерно на 400% выше, по меньшей мере примерно на 450% выше, по меньшей мере примерно на 500% выше, по меньшей мере примерно на 550% выше, по меньшей мере примерно на 600% выше, по меньшей мере примерно на 650% выше, по меньшей мере примерно на 700% выше, по меньшей мере примерно на 750% выше, по меньшей мере примерно на 800% выше, по меньшей мере примерно на 850% выше, по меньшей мере примерно на 900% выше, по меньшей мере примерно на 950% выше, по меньшей мере примерно на 1000% выше, по меньшей мере примерно на 1500% выше, по меньшей мере примерно на 2000% выше, по меньшей мере примерно на 2500% выше, по меньшей мере примерно на 3000% выше, по меньшей мере примерно на 3500% выше, по меньшей мере примерно на 4000% выше, по меньшей мере примерно на 4500% выше, по меньшей мере примерно на 5000% выше, по меньшей мере примерно на 5500% выше, по меньшей мере примерно на 6000% выше, по меньшей мере примерно на 6500% выше, по меньшей мере примерно на 7000% выше, по меньшей мере примерно на 7500% выше, по меньшей мере примерно на 8000% выше, по меньшей мере примерно на 8500% выше, по меньшей мере примерно на 9000% выше, по меньшей мере примерно на 10000% выше или более по сравнению с уровнем CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, экспрессируемыми в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того

же типа клеток.

[00758] Уровень экспрессии может быть обусловлен рядом факторов, известных специалистам в данной области техники. Например, на уровень экспрессии экзогенного полинуклеотида, кодирующего CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, может влиять, помимо других факторов, количество копий экзогенного полинуклеотида в клетке, *например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более копий экзогенного полинуклеотида в клетке; присутствующие регуляторные элементы, такие как, *например*, любой из регуляторных элементов, описанных в данном документе или известных в данной области, включая любой из конститутивных, индуцируемых или условных промоторов, описанных в данном документе или известных в данной области техники; положение, где экзогенный полинуклеотид вставляется в геном клетки; тип вектора, используемого для введения экзогенного полинуклеотида в клетку; упорядочивание кассет в экзогенном полинуклеотиде, *например*, бицистронном и т. д.

[00759] Уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 измеряют относительно уровня CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, экспрессируемых в неизмененных или немодифицированных клетках дикого типа того же типа клеток. Например, уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в Т-клетке передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированные Т-клетки дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в NK-клетке передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной NK-клетки

дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в эндотелиальной клетке передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной эндотелиальной клетки дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в островковой клетке поджелудочной железы передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной островковой клетки поджелудочной железы дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в клетке сердечной мышцы передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной клетки сердечной мышцы дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в гладкомышечной клетке передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной гладкомышечной клетки дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным

полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в клетке скелетных мышц передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной клетки скелетных мышц дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в гепатоците передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененного или немодифицированного гепатоцита дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в глиальной клетке-предшественнике передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной глиальной клетки-предшественника дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в дофаминергическом нейроне передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененного или немодифицированного дофаминергического нейрона дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в пигментных эпителиальных клетках сетчатки передается как уровень экспрессии

относительно уровня неизмененной или немодифицированной пигментной эпителиальной клетки сетчатки дикого типа; уровень экспрессии CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, тяжелой цепи HLA-C, HLA-E, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, обеспечиваемый экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL- 10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептор CD16, IL15-RF и/или Serpinb9, в клетках щитовидной железы передается как уровень экспрессии относительно уровня неизмененной или немодифицированной клетки щитовидной железы дикого типа.

[00760] В другом варианте осуществления экспрессию белка CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 обнаруживают с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами против белка CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9. В другом варианте осуществления полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) используют для подтверждения присутствия экзогенных мРНК CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9.

Химерные антигенные рецепторы

[00761] В данном документе предложены гипоиммуногенные клетки, содержащие химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с CD22. В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с CD19 и CD22. В некоторых вариантах осуществления CAR выбран из группы, состоящей из CAR первого поколения, CAR второго поколения, CAR третьего поколения и CAR четвертого поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR включает в себя один связывающий домен, который связывается с одним антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления CAR включает в себя один связывающий домен, который связывается с более чем одним антигеном-мишенью, *например*, с 2, 3 или большим количеством антигенов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления CAR включает в себя два связывающих домена, так что каждый связывающий домен связывается с разными антигенами-мишенями. В некоторых вариантах осуществления CAR включает в себя два связывающих домена, так что каждый связывающий домен связывается с одним и тем же антигеном-мишенью. Подробное описание типичных CAR, включая CD19-специфические, CD22-специфические и

CD19/CD22-биспецифические CAR, можно найти в WO2012/079000, WO2016/149578 и WO2020/014482, полное содержание которых, включая перечни последовательностей и фигуры, включены в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления CAR включает в себя два связывающих домена, так что каждый связывающий домен связывается с одним и тем же антигеном-мишенью. Подробное описание типичных CAR, включая CD19-специфические, CD22-специфические и CD19/CD22-биспецифические CAR, можно найти в WO2012/079000, WO2016/149578 и WO2020/014482, полное содержание которых, включая перечни последовательностей и фигуры, включены в настоящий документ посредством ссылки.

[00762] В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR включает в себя одноцепочечный фрагмент антитела против CD19 (scFv), трансмембранный домен, такой как полученный из человеческого CD8α, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (CD137) и сигнальный домен CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления CD20-специфический CAR включает в себя scFv против CD20, трансмембранный домен, такой как полученный из человеческого CD8α, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (CD137) и сигнальный домен CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления CD19/CD20-биспецифический CAR включает в себя scFv против CD19, scFv против CD20, трансмембранный домен, такой как полученный из человеческого CD8α, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (CD137) и сигнальный домен CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления CD22-специфический CAR включает в себя scFv против CD22, трансмембранный домен, такой как полученный из человеческого CD8α, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (CD137) и сигнальный домен CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления CD19/CD22-биспецифический CAR включает в себя scFv против CD19, scFv против CD22, трансмембранный домен, такой как полученный из человеческого CD8α, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (CD137) и сигнальный домен CD3ζ.

[00763] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит коммерческую конструкцию CAR, которую несет Т-клетка. Неограничивающие примеры коммерческой терапии на основе CAR-Т-клеток включают в себя брексукабтаген аутолейцел (ТЕКАРТУС®), аксикабтаген цилолейцел (ЕСКАРТА®), идекабтаген виклейцел (АБЕКМА®), лизокабтаген маралейцел (БРЕЙАНЗИ®), тисагенлеклейцел (КИМРИА®), Descartes-08 и Descartes-11 от Cartesian Therapeutics, CTL110 от Novartis, P-BMCA-101 от Poseida Therapeutics, AUTO4 от Autolus Limited, UCARTCS от Cellectis, PBCAR19B и PBCAR269A от Precision Biosciences, FT819 от Fate Therapeutics и CYAD-211 от Clyad Oncology.

[00764] В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящем документе гипоиммуногенная клетка содержит полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе гипоиммуногенная клетка содержит химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен. В

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

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

[00765] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен (ABD) нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки. Другими словами, антигенсвязывающий домен нацелен на антиген, экспрессируемый неопластической или раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления ABD связывает опухолеассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для неопластической клетки (*например*, антиген, ассоциированный с неопластической или раковой клеткой), или опухолеассоциированный антиген выбран из рецептора клеточной поверхности, связанного с ионным каналом рецептора, связанного с ферментом рецептора, сопряженного с протеином G рецептора, рецепторной тирозинкиназы, ассоциированного с тирозинкиназой рецептора, рецептор-подобной тирозинфосфатазы, рецепторной серин/треонинкиназы, рецепторной гуанилатциклазы, ассоциированного с гистидинкиназой рецептора, рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) (включая ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 и ErbB4/HER4), рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR) (включая FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF18 и FGF21), рецепторов фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR) (включая VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и PIGF), рецептора RET и семейства рецепторов Eph (включая EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA9, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 и EphB6), CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CFTR, CIC-1, CIC-2, CIC-4, CIC-5, CIC-7, CIC-Ka, CIC-Kb, бестрофинов, TMEM16A, рецептора GABA, рецептора глицина, переносчиков ABC, NAV1.1, NAV1.2, NAV1.3, NAV1.4, NAV1.5, NAV1.6, NAV1.7, NAV1.8, NAV1.9, рецептора сфингозин-1-фосфата (S1P1R), канала NMDA, трансмембранного белка, многопролетного трансмембранного белка, мотивов Т-

клеточного рецептора; альфа-цепей Т-клеток; β-цепей Т-клеток; γ-цепей Т-клеток; δ-цепей Т-клеток, CCR7, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD11c, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD28, CD34, CD35, CD40, CD45RA, CD45RO, CD52, CD56, CD62L, CD68, CD80, CD95, CD117, CD127, CD133, CD137 (4-1 BB), CD163, F4/80, IL-4Ra, Sca-1, CTLA-4, GITR, GARP, LAP, гранзима B, LFA-1, рецептора трансферрина, NKp46, перфорина, CD4+, Th1, Th2, Th17, Th40, Th22, Th9, Tfh, канонических Treg, FoxP3+, Tr1, Th3, Treg17, $T_{RE}G$; CDCP, NT5E, EpCAM, CEA, gpA33, муцинов, TAG-72, угольной ангидразы IX, PSMA, фолат-связывающего белка, ганглиозидов (*например*, CD2, CD3, GM2), Льюис-γ^2, VEGF, VEGFR 1/2/3, αVβ3, α5β1, ErbB1/EGFR, ErbB1/HER2, ErB3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, танасцина, PDL-1, BAFF, HDAC, ABL, FLT3, KIT, MET, RET, IL-1β, ALK, RANKL, mTOR, CTLA-4, IL-6, IL-6R, JAK3, BRAF, PTCH, Smoothened, PIGF, ANPEP, TIMP1, PLAUR, PTPRJ, LTBR, ANTXR1, фолатного рецептора альфа (FRa), ERBB2 (Her2/neu), EphA2, IL-13Ra2, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), мезотелина, TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII , GD2, GD3, BCMA, MUC16 (CA125), L1CAM, LeY, MSLN, IL13Rα1, L1-CAM, Tn Ag, простат-специфического мембранного антигена (PSMA), ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, рецептора a интерлейкина-11 (IL-11Ra), PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюис Y, CD24, рецептора-бета тромбоцитарного фактора роста (PDGFR-бета), SSEA-4, CD20, MUC1, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-1, CAIX, LMP2, gpl00, bcr-abl, тирозиназы, фукозил GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-ацетил-GD2, фолатного рецептора бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLACl, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-la, MAGE-A1, легумаина, HPV E6, E7, ETV6-AML, белка спермия 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, связанного с геном главного комплекса гистосовместимости I белка (MR1), рецептора активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR), Fos-связанного антигена 1, p53, мутанта p53, простеина, сурвивина, теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутанта Ras, hTERT, точечных разрывов транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитого гена TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYPIB I, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, неоантигена, CD133, CD15, CD184, CD24, CD56, CD26, CD29, CD44, HLA-A, HLA-B, HLA-C, (HLA-A, B,C) CD49f, CD151 CD340, CD200, tkrA, trkB или trkC, или их антигенного фрагмента или антигенной части.

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

[00766] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацелен на антиген, характерный для Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления ABD связывает антиген, ассоциированный с Т-клеткой. В некоторых случаях такой

антиген экспрессируется Т-клеткой или находится на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для Т-клетки, или антиген, ассоциированный с Т-клеткой, выбран из рецептора клеточной поверхности, мембранного транспортного белка (*например*, активного или пассивного транспортного белка, такого как, например, белок ионного канала, порообразующий белок и т. д.), трансмембранного рецептора, мембранного фермента и/или белка клеточной адгезии, характерного для Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для Т-клетки, может представлять собой сопряженный с протеином G рецептор, рецепторную тирозинкиназу, ассоциированный с тирозинкиназой рецептор, рецептор-подобную тирозинфосфатазу, рецепторную серин/треонинкиназу, рецепторную гуанилатциклазу, ассоциированный с гистидинкиназой рецептор, AKT1; AKT2; AKT3; ATF2; BCL10; CALM1; CD3D (CD3δ); CD3E (CD3ε); CD3G (CD3γ); CD4; CD8; CD28; CD45; CD80 (B7-1); CD86 (B7-2); CD247 (CD3ζ); CTLA-4 (CD152); ELK1; ERK1 (MAPK3); ERK2; FOS; FYN; GRAP2 (GADS); GRB2; HLA-DRA; HLA-DRB1; HLA-DRB3; HLA-DRB4; HLA-DRB5; HRAS; IKBKA (CHUK); IKBKB; IKBKE; IKBKG (NEMO); IL2; ITPR1; ITK; JUN; KRAS2; LAT; LCK; MAP2K1 (MEK1); MAP2K2 (MEK2); MAP2K3 (MKK3); MAP2K4 (MKK4); MAP2K6 (MKK6); MAP2K7 (MKK7); MAP3K1 (MEKK1); MAP3K3; MAP3K4; MAP3K5; MAP3K8; MAP3K14 (NIK); MAPK8 (JNK1); MAPK9 (JNK2); MAPK10 (JNK3); MAPK11 (p38β); MAPK12 (p38γ); MAPK13 (p38δ); MAPK14 (p38α); NCK; NFAT1; NFAT2; NFKB1; NFKB2; NFKBIA; NRAS; PAK1; PAK2; PAK3; PAK4; PIK3C2B; PIK3C3 (VPS34); PIK3CA; PIK3CB; PIK3CD; PIK3R1; PKCA; PKCB; PKCM; PKCQ; PLCY1; PRF1 (перфорин); PTEN; RAC1; RAF1; RELA; SDF1; SHP2; SLP76; SOS; SRC; TBK1; TCRA; TEC; TRAF6; VAV1; VAV2 или ZAP70.

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

[00767] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства. В некоторых вариантах осуществления ABD связывает антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства. В некоторых случаях антиген экспрессируется клеткой, ассоциированной с аутоиммунным или воспалительным расстройством. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное или воспалительное расстройство выбрано из хронической болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), волчанки, артрита, иммунокомплексного гломерулонефрита, синдрома Гудпасчера, увеита, гепатита, системного склероза или склеродермии, сахарного диабета типа I, рассеянного склероза, болезни холодовых агглютининов, обыкновенной пузырчатки, болезни Грейвса, аутоиммунной гемолитической анемии, гемофилии A, первичного синдрома Шегрена, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, нейромиелита зрительного нерва, синдрома Эванса, IgM-опосредованной нейропатии, криоглобулинемии, дерматомиозита, идиопатической тромбоцитопении, анкилозирующего спондилита, пузырчатки, приобретенного ангиоотека, хронической

крапивницы, антифосфолипидной демиелинизирующей полинейропатии и аутоиммунной тромбоцитопении или нейтропении, или истинной эритроцитарной аплазии, тогда как типовые неограничивающие примеры аллоиммунных заболеваний включают в себя аллосенсибилизацию (см., например, Blazar et al., 2015, Am. J. Transplant, 15(4):931-41) или ксеносенсибилизацию после гемопоэтической трансплантации или трансплантации паренхиматозных органов, переливания крови, беременность с аллосенсибилизацией плода, неонатальную аллоиммунную тромбоцитопению, гемолитическое заболевание новорожденных, сенсибилизацию в отношении чужеродных антигенов, которая может происходить при заместительной терапии врожденных или приобретенных дефицитов, которые лечат ферменто- или белок-заместительной терапией, продуктами крови и генной терапией. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства, выбран из рецептора клеточной поверхности, связанного с ионным каналом рецептора, связанного с ферментом рецептора, сопряженного с протеином G рецептора, рецепторной тирозинкиназы, ассоциированного с тирозинкиназой рецептора, рецептор-подобной тирозинфосфатазы, рецепторной серин/треонинкиназы, рецепторной гуанилатциклазы или ассоциированного с гистидинкиназой рецептора.

[00768] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывается с лигандом, экспрессируемым на B-клетках, плазматических клетках или плазмабластах. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывается с CD10, CD19, CD20, CD22, CD24, CD27, CD38, CD45R, CD138, CD319, BCMA, CD28, TNF, рецепторами интерферонов, GM-CSF, ZAP-70, LFA-1, CD3 гамма, CD5 или CD2. См., *например*, US 2003/0077249; WO 2017/058753; WO 2017/058850, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

4. ABD нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток

[00769] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток, например, рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR). В некоторых вариантах осуществления ABD связывает антиген, ассоциированный со стареющей клеткой. В некоторых случаях антиген экспрессируется стареющей клеткой. В некоторых вариантах осуществления CAR можно использовать для лечения или профилактики расстройств, характеризующихся аберрантным накоплением стареющих клеток, *например*, фиброза печени и легких, атеросклероза, сахарного диабета и остеоартрита.

5. ABD нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания

[00770] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания. В некоторых вариантах осуществления ABD связывает антиген, ассоциированный с инфекционным заболеванием. В некоторых случаях антиген экспрессируется клеткой, пораженной инфекционным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание выбрано из вызванного ВИЧ, вирусом гепатита B, вирусом гепатита C, вирусом герпеса человека,

вирусом герпеса человека 8 (HHV-8, ассоциированный с саркомой Капоши вирус герпеса (KSHV)), человеческим Т-клеточным лимфотрофическим вирусом 1 (HTLV-1), полиомавирусом клеток Меркеля (MCV), вирусом обезьян 40 (SV40), вирусом Эпштейна - Барр, ЦМВ, папилломавирусом человека. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для инфекционного заболевания, выбран из рецептора клеточной поверхности, связанного с ионным каналом рецептора, связанного с ферментом рецептора, сопряженного с протеином G рецептора, рецепторной тирозинкиназы, ассоциированного с тирозинкиназой рецептора, рецептор-подобной тирозинфосфатазы, рецепторной серин/треонинкиназы, рецепторной гуанилатциклазы, ассоциированного с гистидинкиназой рецептора, HIV Env, gpl20 или CD4-индуцированного эпитопа на HIV-1 Env.

6. ABD связывается с клеточным поверхностным антигеном клетки

[00771] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с клеточным поверхностным антигеном клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген клеточной поверхности является характерным для конкретного типа клеток (*например*, экспрессируется ими). В некоторых вариантах осуществления антиген клеточной поверхности является характерным для более чем одного типа клеток.

[00772] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывает клеточный поверхностный антиген, характерный для Т-клетки, такой как клеточный поверхностный антиген на Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для Т-клетки, может представлять собой рецептор клеточной поверхности, мембранный транспортный белок (*например*, активный или пассивный транспортный белок, такой как, например, белок ионного канала, порообразующий белок и т. д.), трансмембранный рецептор, мембранный фермент и/или белок клеточной адгезии, характерный для Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для Т-клетки, может представлять собой сопряженный с протеином G рецептор, рецепторную тирозинкиназу, ассоциированный с тирозинкиназой рецептор, рецептор-подобную тирозинфосфатазу, рецепторную серин/треонинкиназу, рецепторную гуанилатциклазу или ассоциированный с гистидинкиназой рецептор.

[00773] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывает Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный рецептор может представлять собой AKT1; AKT2; AKT3; ATF2; BCL10; CALM1; CD3D (CD3δ); CD3E (CD3ε); CD3G (CD3γ); CD4; CD8; CD28; CD45; CD80 (B7-1); CD86 (B7-2); CD247 (CD3ζ); CTLA-4 (CD152); ELK1; ERK1 (MAPK3); ERK2; FOS; FYN; GRAP2 (GADS); GRB2; HLA-DRA; HLA-DRB1; HLA-DRB3; HLA-DRB4; HLA-DRB5; HRAS; IKBKA (CHUK); IKBKB; IKBKE; IKBKG (NEMO); IL2; ITPR1; ITK; JUN; KRAS2; LAT; LCK; MAP2K1 (MEK1); MAP2K2 (MEK2); MAP2K3 (MKK3); MAP2K4 (MKK4); MAP2K6 (MKK6); MAP2K7 (MKK7); MAP3K1 (MEKK1); MAP3K3; MAP3K4; MAP3K5; MAP3K8; MAP3K14 (NIK); MAPK8 (JNK1); MAPK9 (JNK2); MAPK10 (JNK3); MAPK11 (p38β); MAPK12 (p38γ); MAPK13 (p38δ); MAPK14 (p38α); NCK; NFAT1; NFAT2; NFKB1;

NFKB2; NFKBIA; NRAS; PAK1; PAK2; PAK3; PAK4; PIK3C2B; PIK3C3 (VPS34); PIK3CA; PIK3CB; PIK3CD; PIK3R1; PKCA; PKCB; PKCM; PKCQ; PLCY1; PRF1 (перфорин); PTEN; RAC1; RAF1; RELA; SDF1; SHP2; SLP76; SOS; SRC; TBK1; TCRA; TEC; TRAF6; VAV1; VAV2 или ZAP70.

7. Трансмембранный домен

[00774] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит по меньшей мере трансмембранную область альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит по меньшей мере трансмембранную(-ые) область(-и) CD8α, CD8β, 4-1BB/CD137, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40/CD134, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, TCRβ, TCRζ, CD32, CD64, CD64, CD45, CD5, CD9, CD22, CD37, CD80, CD86, CD40, CD40L/CD154, VEGFR2, FAS и FGFR2B, или их функциональный вариант. антигенсвязывающий домен связывается

8. Сигнальный домен или несколько сигнальных доменов

[00775] В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем документе CAR содержит один или по меньшей мере один сигнальный домен, выбранный из одного или большего количества 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/TNF-бета; OX40/TNFRSF4; лиганда OX40/TNFSF4; RELT/TNFRSF19L; TACI/TNFRSF13B; TL1A/TNFSF15; TNF-альфа; TNF RII/TNFRSF1B); 2B4/CD244/SLAMF4; BLAME/SLAMF8; CD2; CD2F-10/SLAMF9; CD48/SLAMF2; CD58/LFA-3; CD84/SLAMF5; CD229/SLAMF3; CRACC/SLAMF7; NTB-A/SLAMF6; SLAM/CD150); CD2; CD7; CD53; CD82/Kai-1; CD90/Thy1; CD96; CD160; CD200; CD300a/LMIR1; HLA класса I; HLA-DR; Ikaros; интегрина альфа 4/CD49d; интегрина альфа 4 бета 1; интегрина альфа 4 бета 7/LPAM-1; LAG-3; TCL1A; TCL1B; CRTAM; DAP12; дектина-1/CLEC7A; DPPIV/CD26; EphB6; TIM-1/KIM-1/HAVCR; TIM-4; TSLP; TSLP R; связанного с функцией лимфоцитов антигена 1 (LFA-1); NKG2C, домена CD3 дзета, иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, связанного с функцией лимфоцитов антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83, или их функционального фрагмента.

[00776] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один сигнальный домен содержит домен CD3 дзета, или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере один сигнальный домен содержит (i) домен CD3 дзета или

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

[00777] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два сигнальных домена содержат домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере два сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере один сигнальный домен содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен CD134 или домен 4-1BB или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен CD134 или домен 4-1BB или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

[00778] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три сигнальных домена содержат домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере три сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере три сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен CD134 или домен 4-1BB или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен CD134 или домен 4-1BB или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или

костимулирующего лиганда.

[00779] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен CD3 дзета, или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета, или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28, или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

[00780] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен CD134 или домен 4-1BB или их функциональный вариант.

[00781] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или домен 4-1BB или их функциональный вариант, и/или (iii) домен CD134 или домен 4-1BB или их функциональный вариант.

[00782] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен CD134 или домен 4-1BB или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

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

[00783] В некоторых вариантах осуществления CAR первого, второго, третьего или четвертого поколения дополнительно содержит домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина. В некоторых вариантах осуществления ген цитокина является эндогенным или экзогенным для клетки-мишени, содержащей CAR, который содержит домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина. В некоторых вариантах осуществления ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления ген цитокина кодирует IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IL-4, IL-10 или IFN-гамма или их функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, представляет собой или содержит транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, представляет собой или содержит транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции или его функциональный домен или фрагмент представляет собой или содержит ядерный фактор активированных Т-клеток (nuclear factor of activated T cells - NFAT), NF-kB или их функциональный домен или фрагмент. См., *например*, Zhang. C. *et al.*, Engineering CAR-T cells. Biomarker Research.

5:22 (2017); WO 2016126608; Sha, H. *et al.* Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. Bioscience Reports Jan 27, 2017, 37 (1).

[00784] В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит один или более спейсеров, *например*, когда спейсер представляет собой первый спейсер между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления первый спейсер содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина или ее вариант или модифицированную версию. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой второй спейсер между трансмембранным доменом и сигнальным доменом. В некоторых вариантах осуществления второй спейсер представляет собой олигопептид, например, когда олигопептид содержит остатки глицина и серина, такие как, но не ограничиваясь этим, глицин-сериновые дублеты. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит два или большее количество спейсеров, *например*, спейсер между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом и спейсер между трансмембранным доменом и сигнальным доменом.

[00785] В некоторых вариантах осуществления любая из клеток, описанных в настоящем документе, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR или CAR первого поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR первого поколения содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен опосредует последующую сигнализацию во время активации Т-клеток.

[00786] В некоторых вариантах осуществления любая из клеток, описанных в данном документе, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR или CAR второго поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR второго поколения содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и два сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен опосредует последующую сигнализацию во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен повышает выработку цитокинов, пролиферацию CAR-Т-клеток и/или персистенцию CAR-Т-клеток во время активации Т-клеток.

[00787] В некоторых вариантах осуществления любая из клеток, описанных в данном документе, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR или CAR третьего поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR третьего поколения содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен опосредует последующую сигнализацию во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен повышает выработку цитокинов, пролиферацию CAR-Т-клеток и/или персистенцию CAR-Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR третьего поколения

содержит по меньшей мере два костимулирующих домена. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два костимулирующих домена не являются одинаковыми.

[00788] В некоторых вариантах осуществления любая из клеток, описанных в настоящем документе, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR или CAR четвертого поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR четвертого поколения содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два, три или четыре сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен опосредует последующую сигнализацию во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен повышает выработку цитокинов, пролиферацию CAR-Т-клеток и/или персистенцию CAR-Т-клеток во время активации Т-клеток.

10. ABD, содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть

[00789] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR представляет собой или содержит антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR представляет собой или содержит scFv или Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR содержит фрагмент scFv или Fab антитела к CD19; антитела к CD22; антитела к альфа-цепи Т-клетки; антитела к β-цепи Т-клетки; антитела к γ-цепи Т-клетки; антитела к δ-цепи Т-клетки; антитела к CCR7; антитела к CD3; антитела к CD4; антитела к CD5; антитела к CD7; антитела к CD8; антитела к CD11b; антитела к CD11c; антитела к CD16; антитела к CD20; антитела к CD21; антитела к CD25; антитела к CD28; антитела к CD34; антитела к CD35; антитела к CD40; антитела к CD45RA; антитела к CD45RO; антитела к CD52; антитела к CD56; антитела к CD62L; антитела к CD68; антитела к CD80; антитела к CD95; антитела к CD117; антитела к CD127; антитела к CD133; антитела к CD137 (4-1 BB); антитела к CD163; антитела к F4/80; антитела к IL-4Ra; антитела к Sca-1; антитела к CTLA-4; антитела к GITR; антитела к GARP; антитела к LAP; антитела к гранзиму B; антитела к LFA-1; антитела к MR1; антитела к uPAR или антитела к рецептору трансферрина.

[00790] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит сигнальный домен, который представляет собой костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит второй костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит по меньшей мере два костимулирующих домена. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит по меньшей мере три костимулирующих домена. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит костимулирующий домен, выбранный из одного или большего количества из CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, лимфоцитарного функционального антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83. В некоторых вариантах осуществления, если CAR содержит два или

большее количество костимулирующих доменов, два костимулирующих домена являются разными. В некоторых вариантах осуществления, если CAR содержит два или более костимулирующих доменов, два костимулирующих домена являются одинаковыми.

[00791] Помимо CAR, описанных в настоящем документе, в данной области техники известны различные химерные антигенные рецепторы и кодирующие их нуклеотидные последовательности, которые подходят для фузосомальной доставки и перепрограммирования клеток-мишеней in vivo и in vitro, как описано в настоящем документе. Смотрите, например, WO2013040557; WO2012079000; WO2016030414; Smith T, *et al.*, Nature Nanotechnology. 2017. DOI: 10.1038/NNANO.2017.57, описания которых включены в данный документ посредством ссылки.

11. Дополнительные описания CAR

[00792] В определенных вариантах осуществления клетка может содержать экзогенный полинуклеотид, кодирующий 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. Полицистронный вектор по настоящему изобретению можно использовать для экспрессии одного или большего количества CAR в клетке-хозяине (например, Т-клетке) для применения в методах клеточной терапии против различных антигенов-мишеней. CAR, экспрессируемые одной или большим количеством кассет экспрессии, могут быть одинаковыми или разными. В этих вариантах осуществления CAR может содержать внеклеточный связывающий домен (также называемый «связующим веществом»), который специфически связывается с антигеном-мишенью, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления CAR может дополнительно содержать один или большее количество дополнительных элементов, включая один или большее количество сигнальных пептидов, один или большее количество внеклеточных шарнирных доменов и/или один или большее количество внутриклеточных костимулирующих доменов. Домены могут непосредственно примыкать друг к другу, или одна или большее количество аминокислот могут связывать эти домены. Нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, может быть получена из последовательности млекопитающего, например, последовательности мыши, последовательности примата, последовательности человека или их комбинации. В случаях, когда нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, не является человеческой, последовательность CAR можно гуманизировать. Нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, также может быть кодон-оптимизированной для экспрессии в клетке млекопитающего, например, в клетке человека. В любом из этих вариантов осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, может иметь по меньшей мере 80% идентичности (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) с любой из описанных в настоящем документе нуклеотидных последовательностей. Вариации последовательности могут быть связаны с оптимизацией кодонов, гуманизацией, «швами» в результате клонирования при помощи рестрикционных ферментов и/или дополнительными аминокислотными остатками, связывающими функциональные домены, и т. п.

[00793] В определенных вариантах осуществления CAR может содержать сигнальный пептид на N-конце. Неограничивающие примеры сигнальных пептидов включают в себя сигнальный пептид CD8α, сигнальный пептид IgK и сигнальный пептид субъединицы альфа рецептора гранулоцитарно-макрофагального 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)

[00794] 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 в себя линкер Уитлоу, 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 представлять собой антиген, который исключительно или предпочтительно экспрессируется на опухолевых клетках, или антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного заболевания. Примеры антигенов-мишеней включают в себя, помимо прочего, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD70, каппа-, лямбда- и антиген созревания B-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.

[00795] В некоторых вариантах осуществления CAR может содержать шарнирный домен, также называемый спейсером. В некоторых вариантах осуществления термины «шарнир» и «спейсер» могут использоваться в настоящем описании взаимозаменяемо. Неограничивающие примеры шарнирных доменов включают в себя 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

[00796] 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	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WV	Трансмембранный домен CD28
114	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII FWV	Трансмембранный домен CD28

[00797] 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 большее количество 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 аминокислотном положении 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	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	Сигнальный домен CD3ζ
115	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	Сигнальный домен CD3ζ (с мутацией Q на K в положении 14)

[00798] В определенных вариантах осуществления, где полицистронный вектор кодирует два или большее количество CAR, два или большее количество CAR могут содержать одинаковые функциональные домены или один или большее количество разных функциональных доменов, как описано. Например, два или большее количество CAR могут содержать разные сигнальные пептиды, внеклеточные связывающие домены, шарнирные домены, трансмембранные домены, костимулирующие домены и/или внутриклеточные сигнальные домены, чтобы минимизировать риск рекомбинации вследствие сходства последовательностей. Или, альтернативно, два или большее количество CAR могут содержать одинаковые домены. В случаях, когда используется одинаковый(-ые) домен(-ы) и/или остов, необязательно можно вводить расходящиеся кодоны на уровне нуклеотидных последовательностей, чтобы минимизировать риск рекомбинации.

CAR к CD19

[00799] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к CD19 («CD19-CAR»), и в этих вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую 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.

[00800] 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 включает 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.

[00801] 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.

[00802] 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 настоящий 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 6** 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 большее количество 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 большим количеством CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 21-23. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический scFv может содержать тяжелую цепь с одной или большим количеством CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 26-28. В любом из этих вариантов осуществления CD19-специфический scFv может содержать одну или большее количество CDR, содержащих одну или большее количество 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 большего количества CDR, как описано в настоящем документе.

[00803] В некоторых вариантах осуществления линкер, связывающий части V_H и V_L scFv, представляет собой линкер Уитлоу, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления линкер Уитлоу 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 6. Иллюстративные последовательности scFv к CD19 и компонентов

SEQ ID NO:	**Аминокислотная последовательность**	**Описание**
19	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI	Полная

	SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGS GKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPS QSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIK DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	последовательность scFv FMC63 к CD19 с линкером Уитлоу
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 Уитлоу
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	Полная последовательность scFv FMC63 к CD19 с линкером 3xG_4S

	GGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQS LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	
30	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер 3xG_4S

[00804] 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)), and 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 одной или большего количества CDR любого из антител.

[00805] 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 содержит 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 содержит 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.

[00806] 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.

[00807] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен CAR к CD19 содержит 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.

[00808] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR к CD19 содержит сигнальный домен CD3-дзета (ζ). CD3ζ связывается с Т-клеточными рецепторами (TCR) для генерации сигнала и содержит иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (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.

[00809] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD19, включая, например, CAR к CD19, содержащий CD19-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:29, 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 описанной последовательностью). В любом из этих вариантов осуществления CAR к CD19 может дополнительно содержать сигнальный пептид (например, сигнальный пептид CD8α), как описано.

[00810] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую

CAR к CD19, включая, например, CAR к CD19, содержащий 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 описанной последовательностью). В любом из этих вариантов осуществления CAR к CD19 может дополнительно содержать сигнальный пептид (например, сигнальный пептид CD8α), как описано.

[00811] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD19, включая, например, CAR к CD19, содержащий 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 описанной последовательностью). В любом из этих вариантов осуществления CAR к CD19 может дополнительно содержать сигнальный пептид (например, сигнальный пептид CD8α), как описано.

[00812] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD19, указанную в SEQ ID NO:116, или 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 нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:116 (см. **таблицу 7**). Кодируемый CAR к CD19 имеет соответствующую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:117 или 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 аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:117, со следующими компонентами: сигнальный пептид CD8α, FMC63 scFv (V_L-линкер Уитлоу-V_H), шарнирный домен CD8α, трансмембранный домен CD8α, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3ζ.

[00813] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую коммерчески доступный вариант CAR к CD19. Неограничивающие примеры коммерчески

доступных вариантов CAR к CD19, экспрессируемых и/или кодируемых Т-клетками, включают в себя тисагенлеклейсел, лизокабтаген маралейцел, аксикабтаген цилолейцел и брексукабтаген аутолейцел.

[00814] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую тисагенлеклейсел или его части. 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 7**, а аннотации последовательностей представлены в **таблице 8**.

[00815] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лизокабтаген маралейцел или его части. Лизокабтаген маралейцел содержит CAR к CD19 со следующими компонентами: сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA, scFv FMC63 (V_L-линкер Уитлоу-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 7**, а аннотации последовательностей представлены в **таблице 9**.

[00816] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аксикабтаген цилолейцел или его части. Аксикабтаген цилолеуцел содержит CAR к CD19 со следующими компонентами: сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA, scFv FMC63 (V_L-линкер Уитлоу-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 7**, а аннотации последовательностей представлены в **таблице 10**.

[00817] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую брексукабтаген аутолейцел или его части. Брексукабтаген аутолейцел содержит CAR CD19 со следующими компонентами: сигнальный пептид GMCSFR-α, scFv FMC63, шарнирный домен CD28, трансмембранный домен CD28, костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3ζ.

[00818] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD19, указанную в SEQ ID NO: 31, 33 или 35, или 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 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 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: 32, 34 или 36, соответственно.

Таблица 7. 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 gtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgaggggggctgg acttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtgg ggtccttctcctgtcactggttatcacccctttactgcaaacggggcagaa agaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaact actcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaga aggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcc cccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatcta ggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccggg accctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaag gcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagt	Иллюстративная нуклеотидная последовательность CAR к CD19

	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	Нуклеотидная последовательность CAR к CD19 тисагенлеклейсела

	tctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcc caccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggc cagcggcgggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcct gtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctc ctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcc tgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagag gaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatg tgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaca agcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaaga gaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagat gggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaat 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	Нуклеотидная последовательность CAR к CD19 лизобактагена

	gcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggc gtgcccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcct gaccatctccaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgccag cagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaacaaagctgga aatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcga gggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctgg cctggtggcccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagc ggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagcccc ccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagac cacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaagg acaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagacc gacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggc agctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtga gcagcgaatctaagtacggaccgccctgccccccttgccctatgttctg ggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggt caccgtggccttcatcatcttttgggtgaaacggggcagaaagaaactc ctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaaga ggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggat gtgaactgcgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctac cagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaa gggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctga gatgggcggcaagcctcggcggaagaacccccaggaaggcctgtat aacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcg gcatgaagggcgagcggaggcggggcaagggccacgacggcctgt atcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcac atgcaggccctgcccccaagg	маралейцела
34	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSL SASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQ VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVL	Аминокислотная последовательность CAR к CD19 лизобактагена маралейцела

	VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
35	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagc attcctcctgatcccagacatccagatgacacagactacatcctccctgt ctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcagg acattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgtta aactcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaag gttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacc tggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgctt ccgtacacgttcggaggggggactaagttggaaataacaggctccac ctctggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggc gaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcaca gagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatg gtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgg gagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatcc agactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaa tgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacat tattactacggtggtagctatgctatggactactggggtcaaggaacctc agtcaccgtctcctcagcggccgcaattgaagttatgtatcctcctcctta cctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaa acacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggt gctggtggtggttgggggagtcctggcttgctatagcttgctagtaaca gtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgca cagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgca agcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctc cagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcag ggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagagga gtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggg gaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaact gcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaag gcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtct	Нуклеотидная последовательность CAR к CD19 аксикабтагена цилолейцела

	cagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc	
36	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Аминокислотная последовательность CAR к CD19 аксикабтагена цилолейцела

Таблица 8. 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 9. 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 10. 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

[00819] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD19, указанную в SEQ ID NO: 31, 33 или 35, или 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 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 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: 32, 34 или 36, соответственно.

CAR к CD20

[00820] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к CD20 («CD20-CAR»), и в этих вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD20. CD20 представляет собой антиген, обнаруживаемый на поверхности В-клеток уже в про-В-фазе и постепенно увеличивающийся до уровня

зрелости B-клеток, а также на клетках большинства B-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.

[00821] 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 включает 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.

[00822] 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.

[00823] 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 некоторых вариантах

осуществления CAR CD20 получен из CAR, специфичного для CD20, включая, например, MB-106, UCART20 или C-CAR066, как подробно описано в **Таблице 11A**. В любом из этих вариантов осуществления внеклеточный связывающий домен CAR CD20 может содержать или состоять из V_H, V_L и/или одного или более CDR любого из антител или CAR, подробно описанных в **Таблице 11A**.

Таблица 11A. Типичные CD20-специфичные CAR

Название CAR	**Антиген**	**Компания**	**Литературный источник**
MB-106	CD20	Онкологический исследовательский центр Фреда Хатчинсона	Shadman et al., Blood 134 (Suppl._1):3235 (2019)
UCART20	CD20	Cellectis	www.cellbiomedgroup.com
C-CAR066	CD20	Cellular Biomedicine Group	Liang et al., J Clin Oncol 39(15)_suppl:2508-2508 (2021)

[00824] 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 Уитлоу, как описано в настоящем 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 11B** 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 CD20-специфический scFv может содержать одну или большее количество CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41 и 43 и 44. В некоторых вариантах осуществления CD20-специфический scFv может содержать легкую цепь с одной или большим количеством CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41. В некоторых вариантах осуществления CD20-специфический scFv может содержать тяжелую цепь с одной или большим количеством CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 43-44. В любом из этих

вариантов осуществления CD20-специфический scFv может содержать одну или большее количество CDR, содержащих одну или большее количество 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 большего количества CDR, как описано в настоящем документе.

Таблица 11B. 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 Уитлоу
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

[00825] 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 содержит 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 содержит 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.

[00826] 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.

[00827] 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.

[00828] 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.

[00829] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD20, включая, например, CAR к CD20, содержащий 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% идентичности, 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 описанной последовательностью).

[00830] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD20, включая, например, CAR к CD20, содержащий 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% идентичности, 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 описанной последовательностью).

[00831] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD20, включая, например, CAR к CD20, содержащий 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% идентичности, 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 описанной последовательностью).

[00832] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD20, включая, например, CAR к CD20, содержащий 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% идентичности, 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 описанной последовательностью).

[00833] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD20, включая, например, CAR к CD20, содержащий 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% идентичности, 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 описанной последовательностью).

[00834] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD20, включая, например, CAR к CD20, содержащий 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% идентичности, 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 описанной последовательностью).

CAR к CD22

[00835] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к CD22 («CD22-CAR»), и в этих вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD22. CD22, который представляет собой трансмембранный белок, обнаруживаемый в основном на поверхности зрелых B-клеток, функционирует как ингибирующий рецептор в отношении сигналинга B-клеточного рецептора (BCR). CD22 экспрессируется в 60-70% B-клеточных лимфом и лейкозов (например, B-хронический лимфолейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома Беркитта) и не присутствует на поверхности клеток на ранних стадиях развития B-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.

[00836] 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 включает 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.

[00837] 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.

[00838] 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 одной или большего количества CDR любого из антител.

[00839] 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 Уитлоу. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности всего scFv, полученного из m971 (также

называемого scFv m971), и его различных частей представлены в **таблице 12** 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 большее количество 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 большим количеством 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 большим количеством CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 51-53. В любом из этих вариантов осуществления CD22-специфический scFv может содержать одну или большее количество CDR, содержащих одну или большее количество 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 CD22 содержит или состоит из одной или большего количества CDR, как описано в настоящем документе.

[00840] 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 Уитлоу. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности всего scFv, полученного от m971-L7 (также называемого scFv m971-L7), и его различных частей представлены в **таблице 12** 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 большее количество 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 большим количеством 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 большим количеством CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 60-62. В любом из этих вариантов осуществления CD22-специфический scFv может содержать одну или большее количество CDR, содержащих одну или большее количество 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 CD22 содержит или состоит из одной или большего количества CDR, как описано в настоящем документе.

Таблица 12. 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 scFv m971-L7 к CD22
57	TYYRSTWYN	CDR2 тяжелой цепи scFv m971-L7 к CD22
58	AREVTGDLEDAFDI	CDR3 тяжелой цепи scFv m971-L7 к CD22
59	DIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTI WSYLNWYRQRPGEAPNLLIYAASSLQS	Вариабельная область легкой цепи scFv m971-

	GVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFAT YYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK	L7 к CD22
60	QTIWSY	CDR1 легкой цепи scFv m971-L7 к CD22
61	AAS	CDR2 легкой цепи scFv m971-L7 к CD22
62	QQSYSIPQT	CDR3 легкой цепи scFv m971-L7 к CD22

[00841] 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, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00842] 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 содержит 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 содержит 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.

[00843] 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.

[00844] 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.

[00845] 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.

[00846] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD22, включая, например, CAR к CD22, содержащий 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% идентичности, 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 описанной последовательностью).

[00847] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD22, включая, например, CAR к CD22, содержащий 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% идентичности, 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 описанной

последовательностью).

[00848] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD22, включая, например, CAR к CD22, содержащий 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 описанной последовательностью).

[00849] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD22, включая, например, CAR к CD22, содержащий 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% идентичности, 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 описанной последовательностью).

[00850] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD22, включая, например, CAR к CD22, содержащий 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% идентичности, 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 описанной последовательностью).

[00851] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к CD22, включая, например, CAR к CD22, содержащий 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 описанной последовательностью).

CAR к BCMA

[00852] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к BCMA («BCMA-CAR»), и в этих вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к BCMA. BCMA является членом семейства рецепторов некроза опухоли (tumor necrosis family receptor - TNFR), экспрессируемым на клетках линии B-клеток, с максимальной экспрессией на терминально дифференцированных B-клетках или зрелых B-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.

[00853] 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 включает 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.

[00854] 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.

[00855] 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 получен из 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 одной или большего количества CDR любого из антител.

[00856] 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 Уитлоу, аминокислотные последовательности которого представлены в **таблице 13** 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 BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать одну или большее количество CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 65-67 и 69-71. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать легкую цепь с одной или большим количеством CDR, имеющих 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 большим количеством CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 69-71. В любом из этих вариантов осуществления BCMA-специфический scFv может содержать одну или большее количество CDR, содержащих одну или большее количество 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.

[00857] 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 13** 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 BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать одну или большее количество CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 74-76 и 78-80. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать легкую цепь с одной или большим количеством CDR, имеющих 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 большим количеством CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 78-80. В любом из этих вариантов осуществления BCMA-специфический scFv может содержать одну или большее количество CDR, содержащих одну или большее количество 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.

[00858] 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.

[00859] 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.

[00860] 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 13** 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 BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать одну или большее количество 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.

[00861] 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 13** 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 BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать одну или большее количество CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 120-122 и 124-126. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать легкую цепь с одной или большим

количеством CDR, имеющих 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 большим количеством CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 124-126. В любом из этих вариантов осуществления BCMA-специфический scFv может содержать одну или большее количество CDR, содержащих одну или большее количество 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.

[00862] 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 настоящий документ посредством ссылки.

Таблица 13. 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 Уитлоу
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 Уитлоу
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	Вариабельная область тяжелой цепи scFv C12A3.2 к BCMA

	NLKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGT ALTVSS	
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 Уитлоу
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

[00863] 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 содержит 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 содержит 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.

[00864] 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.

[00865] 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.

[00866] 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.

[00867] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к BCMA, включая, например, CAR к BCMA, содержащий любой из описанных BCMA-специфических внеклеточных связывающих доменов, 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% идентичности, 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 описанной последовательностью). В любом из этих вариантов осуществления CAR к BCMA может дополнительно содержать сигнальный пептид (например, сигнальный пептид CD8α), как описано.

[00868] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к BCMA, включая, например, CAR к BCMA, содержащий любой из описанных BCMA-специфических внеклеточных связывающих доменов, 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% идентичности, 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 описанной последовательностью). В любом из этих вариантов осуществления CAR к BCMA может дополнительно содержать сигнальный пептид, как описано.

[00869] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR к BCMA, указанную в SEQ ID NO:127, или 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 нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:127 (см. **таблицу 14**). Кодируемый CAR к BCMA имеет соответствующую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:128 или 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 аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:128, со следующими компонентами: сигнальный пептид CD8α, CT103A scFv (V_L-линкер Уитлоу-V_H), шарнирный домен CD8α, трансмембранный домен CD8α, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3ζ.

[00870] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую коммерчески доступный вариант CAR к BCMA, включая, например, идекабтаген виклейсел (идекабтаген, также называемый bb2121). В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит кассету экспрессии, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую идекабтаген виклейсел или его части. 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 14. Иллюстративные последовательности CAR к BCMA

SEQ ID NO:	**Последовательность**	**Описание**
127	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctcca cgccgccaggccggacatccagatgacccagtctccatcctccctgtct gcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagc attagcagctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaa gctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggtt cagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgc aacctgaagattttgcaacttactactgtcagcaaaaatacgacctcctca cttttggcggagggaccaaggttgagatcaaaggcagcaccagcggct ccggcaagcctggctctggcgagggcagcacaaagggacagctgca gctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcggagaccctgtc cctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagtagtagttactactg gggctggatccgccagccccccagggaaggggctggagtggattggg agtatctcctatagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg agtcaccatatccgtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctg agttctgtgaccgccgcagacacggcggtgtactactgcgccagagat	Иллюстративная нуклеотидная последовательность CAR к BCMA

	cgtggagacaccatactagacgtatggggtcagggtacaatggtcacc gtcagctcattcgtgcccgtgttcctgcccgccaaacctaccaccacccc tgcccctagacctcccaccccagccccaacaatcgccagccagcctct gtctctgcggcccgaagcctgtagacctgctgccggcggagccgtgca caccagaggcctggacttcgcctgcgacatctacatctgggcccctctg gccggcacctgtggcgtgctgctgctgagcctggtgatcaccctgtact gcaaccaccggaacaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattca aacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctg tagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagt gaagttcagcagatccgccgacgcccctgcctaccagcagggacaga accagctgtacaacgagctgaacctgggcagacgggaagagtacgac gtgctggacaagcggagaggccgggaccccgagatgggcggaaag cccagacggaagaacccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaa agacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgag cggaggcgcggcaagggccacgatggcctgtaccagggcctgagca ccgccaccaaggacacctacgacgccctgcacatgcaggccctgccc cccaga	
128	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQKYDLLTFGGGTKVEIKGST SGSGKPGSGEGSTKGQLQLQESGPGLVKPSET LSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEW IGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARDRGDTILDVWGQGT MVTVSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Иллюстративная аминокислотная последовательность CAR к BCMA

[00871]

Характеристики гипоиммуногенных клеток

[00872] В некоторых вариантах осуществления популяция гипоиммуногенных стволовых клеток сохраняет плюрипотентность по сравнению с контрольными стволовыми клетками (*например*, стволовыми клетками дикого типа или иммуногенными стволовыми клетками). В некоторых вариантах осуществления популяция гипоиммуногенных стволовых клеток сохраняет потенциал дифференцировки по сравнению с контрольными стволовыми клетками (*например*, стволовыми клетками дикого типа или иммуногенными стволовыми клетками).

[00873] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня иммунной активации у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень иммунной активации, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем иммунной активации в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает иммунную активацию у субъекта или пациента.

[00874] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня Т-клеточного ответа у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень Т-клеточного ответа, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем Т-клеточного ответа в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает Т-клеточного ответа на клетки у субъекта или пациента.

[00875] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня ответа NK-клеток у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень ответа NK-клеток, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем ответа NK-клеток в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает ответа NK-клеток на клетки у субъекта или пациента.

[00876] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня поглощения макрофагами у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень ответа NK-клеток, вызываемый

клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем поглощения макрофагами в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает поглощения макрофагами клеток у субъекта или пациента.

[00877] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня системной активации TH1 у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень системной активации TH1, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем системной активации TH1 в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает системную активацию TH1 у субъекта или пациента.

[00878] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня уничтожения NK-клетками у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень ответа уничтожения NK-клетками, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем уничтожения NK-клетками в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает уничтожения NK-клетками у субъекта или пациента.

[00879] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень иммунной активации МКПК, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем иммунной активации МКПК в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает иммунную активацию МКПК у субъекта или пациента.

[00880] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня донор-специфичных антител

IgG у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень донор-специфических антител IgG, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем донор-специфических антител IgG в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает появление донор-специфических антител IgG у субъекта или пациента.

[00881] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня донор-специфичных антител IgM у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень донор-специфических антител IgM, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем донор-специфических антител IgM в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает появление донор-специфических антител IgM у субъекта или пациента.

[00882] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня продукции антител IgM и IgG у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень выработки антител IgM и IgG, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем выработки антител IgM и IgG в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает выработку антител IgM и IgG у субъекта или пациента.

[00883] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и CAR-T-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня уничтожения цитотоксическими Т-клетками у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем уничтожения цитотоксическими Т-клетками в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает уничтожение цитотоксическими Т-клетками у субъекта или пациента.

[00884] В некоторых вариантах осуществления введенная популяция гипоиммуногенных клеток, таких как гипоиммуногенные дифференцированные клетки и

CAR-Т-клетки, вызывает снижение или уменьшение уровня комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) у субъекта или пациента. В некоторых случаях уровень КЗЦ, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем КЗЦ в результате введения иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток не вызывает КЗЦ у субъекта или пациента.

Терапевтические клетки из первичных Т-клеток

[00885] В настоящем документе предложены гипоиммуногенные клетки, включая, помимо прочего, первичные Т-клетки, которые избегают иммунного распознавания. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки получают (*например*, генерируют, культивируют или создают) из Т-клеток, таких как первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки получают (*например*, собирают, экстрагируют, удаляют или берут) от субъекта или индивидуума. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки получают из пула Т-клеток, при этом Т-клетки получены от одного или большего количества субъектов (*например*, одного или большего количества людей, включая одного или большее количество здоровых людей). В некоторых вариантах осуществления пул первичных Т-клеток получен от 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более субъектов. В некоторых вариантах осуществления субъект-донор отличается от пациента (*например*, реципиента, которому вводят терапевтические клетки). В некоторых вариантах осуществления пул Т-клеток не содержит клетки от пациента. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество субъектов-доноров, от которых получен пул Т-клеток, отличаются от пациента.

[00886] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки не активируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у пациента (*например*, реципиента после введения). Предложены способы лечения расстройства путем введения популяции гипоиммуногенных клеток нуждающемуся в этом субъекту (*например*, реципиенту) или пациенту. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе гипоиммуногенные клетки содержат Т-клетки, сконструированные (*например*, модифицированные) для экспрессии химерного антигенного рецептора, включая, помимо прочего, химерный антигенный рецептор, описанный в настоящем документе. В некоторых случаях Т-клетки представляют собой популяции или субпопуляции первичных Т-клеток от одного или большего количества индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

[00887] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение направлено на гипоиммуногенные первичные Т-клетки, которые регулируемо сверхэкспрессируют CD47

и CAR и имеют регулируемую сниженную экспрессию или отсутствие экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и имеют сниженную экспрессию или отсутствие экспрессии молекул комплекса TCR. Клетки, описанные в данном документе, регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR и избегают иммунного распознавания. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки демонстрируют регулируемые сниженные уровни или активность антигенов/молекул ГКГС класса I, антигенов/молекул ГКГС класса II и/или молекул комплекса TCR. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR и содержат регулируемую геномную модификацию гена B2M. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR и содержат регулируемую геномную модификацию гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR и содержат регулируемую геномную модификацию гена TRAC. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR и содержат регулируемую геномную модификацию гена TRB. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки регулируемо сверхэкспрессируют CD47 и CAR и несут регулируемые геномные модификации в одном или более из следующих генов: гены B2M, CIITA, TRAC и TRB.

[00888] Типовые Т-клетки по настоящему изобретению выбраны из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, хелперных Т-клеток, Т-клеток памяти, Т-клеток центральной памяти, эффекторных Т-клеток памяти, эффекторных Т-клеток памяти RA, регуляторных Т-клеток, инфильтрирующих ткани лимфоцитов и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления Т-клетки экспрессируют CCR7, CD27, CD28 и CD45RA. В некоторых вариантах осуществления центральные Т-клетки экспрессируют CCR7, CD27, CD28 и CD45RO. В других вариантах осуществления эффекторные Т-клетки памяти экспрессируют PD-1, CD27, CD28 и CD45RO. В других вариантах осуществления эффекторные Т-клетки памяти RA экспрессируют PD-1, CD57 и CD45RA.

[00889] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой модифицированную (*например,* сконструированную) Т-клетку. В некоторых случаях модифицированная Т-клетка содержит модификацию, которая приводит к экспрессии клеткой по меньшей мере одного химерного антигенного рецептора, который специфически связывается с представляющим интерес антигеном или эпитопом, экспрессируемым на поверхности по меньшей мере одной из поврежденной клетки, диспластической клетки, инфицированной клетки, иммуногенной клетки, воспаленной клетки, злокачественной клетки, метапластической клетки, мутантной клетки и их комбинаций. В других случаях модифицированная Т-клетка содержит модификацию, которая приводит к экспрессии клеткой по меньшей мере одного белка, который модулирует представляющий интерес биологический эффект в смежных клетке, ткани или органе, когда клетка находится вблизи смежных клетки, ткани или органа. Применимые модификации первичных Т-клеток подробно описаны в US2016/0348073 и

WO2020/018620, полное описание которых включено в настоящий документ.

[00890] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе гипоиммуногенные клетки включают в себя Т-клетки, сконструированные (*например*, модифицированные) для экспрессии химерного антигенного рецептора, включая, помимо прочего, химерный антигенный рецептор, описанный в настоящем документе. В некоторых случаях Т-клетки представляют собой популяции или субпопуляции первичных Т-клеток от одного или большего количества индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4). В других вариантах осуществления описанные в настоящем документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию белка запрограммированной гибели клеток (PD-1). В определенных вариантах осуществления описанные в настоящем документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию CTLA-4 и PD-1. Способы снижения или устранения экспрессии CTLA-4, PD-1 и как CTLA-4, так и PD-1 могут включать в себя любые, известные специалистам в данной области техники, такие как, помимо прочего, технологии генетических модификаций, в которых используют редкощепящие эндонуклеазы и технологии сайленсинга РНК или РНК-интерференции. Неограничивающие примеры редкощепящих эндонуклеаз включают в себя любой белок Cas, TALEN, цинк-пальцевую нуклеазу, мегануклеазу и/или хоминг-эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный в настоящем документе полипептид (*например*, химерный антигенный рецептор, CD47 или другой толерогенный фактор, описанный в настоящем документе), вставляют в локус гена CTLA-4 и/или PD-1.

[00891] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют повышенную экспрессию PD-L1.

[00892] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная Т-клетка содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, при этом полинуклеотид вставлен в геномный локус. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вставлен в безопасный или целевой локус, такой как, помимо прочего, локус гена AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3 (также известный как CD142), MICA, MICB, LRP1 (также известный как CD91), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 или KDM5D. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вставлен в ген B2M, CIITA, TRAC, TRB, PD-1 или CTLA-4.

[00893] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная Т-клетка включает полинуклеотид, кодирующий CAR, который регулируемо экспрессируется в

клетке с использованием вектора экспрессии. В некоторых вариантах осуществления CAR вводят в клетку с использованием вирусного вектора экспрессии, который опосредует интеграцию последовательности CAR в геном клетки. Например, экспрессионный вектор для экспрессии CAR в клетке содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую CAR. Экспрессионный вектор может представлять собой индуцибельный экспрессионный вектор. Экспрессионный вектор может представлять собой вирусный вектор, такой как, но не ограничиваясь этим, лентивирусный вектор.

[00894] Гипоиммуногенные Т-клетки, предложенные в настоящем документе, применимы для лечения соответствующих типов рака, включая, помимо прочего, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, рак печени, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, острый миелоидный лимфоидный лейкоз, множественную миелому, рак желудка, аденокарциному желудка, аденокарциному поджелудочной железы, глиобластому, нейробластому, плоскоклеточную карциному легкого, гепатоцеллюлярную карциному и рак мочевого пузыря.

Терапевтические клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток

[00895] В настоящем документе предложены гипоиммуногенные клетки, включая клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, которые избегают иммунного распознавания. В некоторых вариантах осуществления клетки не активируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у пациента или субъекта (*например*, реципиента после введения). Предложены способы лечения расстройства, включающие повторное введение популяции гипоиммуногенных клеток нуждающемуся в этом субъекту-реципиенту.

[00896] В одном аспекте в данном документе предложены клетки HIP, которые дифференцируются в разные типы клеток, для последующей трансплантации субъектам-реципиентам. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, в общем случае путем оценки наличия клеточно-специфических маркеров. Как понятно специалистам в данной области техники, производные дифференцированных гипоиммуногенных плюрипотентных клеток можно трансплантировать, используя методики, известные в данной области техники, которые зависят как от типа клеток, так и от конечного использования этих клеток.

[00897] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка и любая клетка, дифференцированная из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируются для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I. В других вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса II. В определенных вариантах осуществления

плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют так, чтобы она демонстрировала регулируемо сниженную экспрессию комплексов TCR. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка и любая клетка, дифференцированная из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируются для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и II. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и II и комплексов TCR.

[00898] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка и любая клетка, дифференцированная из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируются для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или II и проявления регулируемого увеличения экспрессии CD47. В некоторых случаях клетка регулируемо сверхэкспрессирует CD47, неся один или более трансгенов, кодирующих один или более толерогенных факторов. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют так, чтобы она регулируемо демонстрировала сниженную экспрессию одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и II и демонстрировала регулируемое увеличение экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка и любая клетка, дифференцированная из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируются для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или II и комплексов TCR, и проявления регулируемого увеличения экспрессии CD47.

[00899] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или II, для проявления регулируемого увеличения экспрессии CD47 и для регулируемой экзогенной экспрессии химерного антигенного рецептора. В некоторых случаях клетка регулируемо сверхэкспрессирует один или более толерогенных факторов, неся один или более трансгенов, кодирующих один или более толерогенных факторов. В некоторых случаях клетка регулируемо сверхэкспрессирует CAR, неся один или более трансгенов CAR. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют так, чтобы она регулируемо проявляла сниженную экспрессию одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и II, демонстрировала

увеличенную регулируемую экспрессию одного или более толерогенных факторов, и для регулируемой экзогенной экспрессии химерного антигенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют так, чтобы она регулируемо проявляла сниженную экспрессию одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и II и комплексов TCR, проявляла регулируемую увеличенную экспрессию одного или более толерогенных факторов и для регулируемой экзогенной экспрессии химерного антигенного рецептора.

[00900] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка и любая клетка, дифференцированная из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируются для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или II и проявления регулируемого увеличения экспрессии CD47. В некоторых случаях клетка сверхэкспрессирует CD47 за счет наличия в ней одного или большего количества трансгенов CD47. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка и любая клетка, дифференцированная из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируются для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и II и проявления регулируемого увеличения экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка и любая клетка, дифференцированная из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируются для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или II и комплексов TCR, и проявления регулируемого увеличения экспрессии CD47.

[00901] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или II, для проявления регулируемого увеличения экспрессии CD47 и для экзогенной экспрессии химерного антигенного рецептора. В некоторых случаях клетка сверхэкспрессирует полипептиды CD47 за счет наличия в ней одного или большего количества трансгенов CD47. В некоторых случаях клетка сверхэкспрессирует полипептиды CAR за счет наличия в ней одного или большего количества трансгенов CAR. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют для проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и II, для проявления регулируемого увеличения экспрессии CD47 и для экзогенной экспрессии химерного антигенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют для

проявления регулируемой сниженной экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и II и комплексов TCR, для проявления регулируемого увеличения экспрессии CD47 и для экзогенной экспрессии химерного антигенного рецептора.

[00902] Такие плюрипотентные стволовые клетки являются гипоиммуногенными стволовыми клетками. Такие дифференцированные клетки являются гипоиммуногенными клетками.

[00903] Любую из плюрипотентных стволовых клеток, описанных в настоящем документе, можно дифференцировать в любые клетки организма или ткани. В некоторых вариантах осуществления клетки демонстрируют регулируемое снижение экспрессии одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или II и регулируемое снижение экспрессии комплексов TCR. В некоторых случаях экспрессия одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или II регулируется по сравнению с немодифицированными клетками или клетками дикого типа того же типа клеток. В некоторых случаях экспрессия комплексов TCR регулируемо снижается по сравнению с немодифицированными клетками или клетками дикого типа того же типа клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки демонстрируют повышенную экспрессию CD47. В некоторых случаях экспрессия CD47 повышена в клетках, охваченных настоящим изобретением, по сравнению с немодифицированными клетками или клетками дикого типа такого же клеточного типа. В некоторых вариантах осуществления клетки демонстрируют экзогенную экспрессию CAR. Способы снижения уровней молекул лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и комплексов TCR и повышения экспрессии CD47 и CAR описаны в настоящем документе.

[00904] В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые в способах, описанных в данном документе, избегают иммунного распознавания и ответа при введении пациенту (например, субъекту-реципиенту). Эти клетки могут избегать уничтожения иммунными клетками in vitro и in vivo. В некоторых вариантах осуществления клетки избегают уничтожения макрофагами и NK-клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки игнорируются иммунными клетками или иммунной системой субъекта. Другими словами, клетки, вводимые в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, не выявляются иммунными клетками иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления клетки являются замаскированными и поэтому избегают иммунного отторжения.

[00905] Способы определения того, избегает ли плюрипотентная стволовая клетка и любая клетка, дифференцированная из такой плюрипотентной стволовой клетки, иммунного распознавания, включают, помимо прочего, анализ Elispot IFN-γ, анализ уничтожения микроглией, животные модели прививания клеток, анализы высвобождения цитокинов, ИФА, анализы уничтожения с использованием биолюминесцентной визуализации, или анализ высвобождения хрома, или количественную микроэлектронную биосенсорную систему для анализа клеток в реальном времени (система RTCA

xCELLigence®, Agilent), реакцию смешанной культуры лимфоцитов, иммунофлуоресцентный анализ и т. д.

[00906] Терапевтические клетки, описанные в настоящем документе, применимы для лечения нарушения, такого как, помимо прочего, рак, генетическое расстройство, хроническое инфекционное заболевание, аутоиммунное расстройство, неврологическое расстройство и т. п.

1. Кардиальные клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[00907] В настоящем документе предложены типы кардиальных клеток, дифференцированные из гипоиммуногенно-индуцированных плюрипотентных (HIP) клеток для последующей трансплантации или приживления субъектам (например, реципиентам). Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий. Иллюстративные типы кардиальных клеток включают, но не ограничиваются этим, кардиомиоцит, нодальный кардиомиоцит, проводящий кардиомиоцит, рабочий кардиомиоцит, клетку-прекурсор кардиомиоцита, клетку-предшественника кардиомиоцита, кардиальную стволовую клетку, кардиальную мышечную клетку, атриальную кардиальную стволовую клетку, вентрикулярную кардиальную стволовую клетку, эпикардиальную клетку, гемопоэтическую клетку, клетку сосудистого эндотелия, эндокардиальную эндотелиальную клетку, интерстициальную клетку сердечного клапана, кардиальную кардиостимулирующую клетку и т. п.

[00908] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе сердечные клетки вводят реципиенту для лечения сердечного заболевания, выбранного из группы, состоящей из детской кардиомиопатии, возрастной кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, гипертрофической кардиомиопатии, рестриктивной кардиомиопатии, хронической ишемической кардиомиопатии, перипартальной кардиомиопатии, воспалительной кардиомиопатии, идиопатической кардиомиопатии, другой кардиомиопатии, ишемического реперфузионного поражения миокарда, желудочковой дисфункции, сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, терминальной стадии сердечной недостаточности, атеросклероза, ишемии, гипертонии, рестеноза, стенокардии, ревматической болезни сердца, ревматической болезни сердца, артериального воспаления, сердечно-сосудистого заболевания, инфаркта миокарда, ишемии миокарда, инфаркта миокарда, ишемии сердца, поражения сердца, ишемии миокарда, сосудистых заболеваний, приобретенного порока сердца, врожденного порока сердца, ишемической болезни сердца, дисфункции проводящих систем, дисфункции коронарной артерии, легочной гипертензии, сердечных аритмий, мышечной дистрофии, аномалий мышечной массы, мышечной дегенерации, миокардита, инфекционного миокардита, мышечных аномалий, вызванных лекарственными препаратами или токсинами, миокардита, обусловленного реакцией гиперчувствительности, митральной недостаточности, аутоиммунного

эндокардита, первичных аритмических заболеваний, сердечных каналеллопатий, синдромов удлиненного интервала QT, синдромов короткого интервала QT, синдрома Бругада, катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии и синдрома Джервелла и Ланге-Нильсена (см. van den Brink *et al., Stem Cells.* 2020 Feb;38(2):174-186).

[00909] Соответственно, в данном документе предложены способы лечения и предотвращения сердечного повреждения или сердечного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта. Описанные в данном документе способы можно применять для лечения, облегчения, предотвращения или замедления прогрессирования ряда заболеваний сердца или их симптомов, например, в результате патологического повреждения структуры и/или функции сердца. Термины «сердечное заболевание», «сердечное расстройство» и «сердечное повреждение» взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к состоянию и/или расстройству, связанному с сердцем, включая клапаны, эндотелий, инфарктные зоны или другие компоненты или структуры сердца. Такие сердечные заболевания или связанные с сердцем заболевания включают, но не ограничиваются этим, инфаркт миокарда, сердечную недостаточность, врожденный порок сердца, заболевание или дисфункцию сердечных клапанов, эндокардит, ревматическую лихорадку, пролапс митрального клапана, инфекционный эндокардит, гипертрофическую кардиомиопатию, дилятационную кардиомиопатию, миокардит, кардиомегалию и/или митральную недостаточность.

[00910] В некоторых вариантах осуществления предшественник кардиомиоцита включает клетку, которая способна дать потомство, которое включает (на конечной стадии) кардиомиоциты. Клетки-предшественников кардиомиоцитов часто можно идентифицировать, используя один или более маркеров, выбранных из GATA-4, Nkx2.5 и семейства транскрипционных факторов MEF-2. В некоторых случаях кардиомиоцит относится к незрелым кардиомиоцитам или зрелым кардиомиоцитам, которые экспрессируют один или более маркеров (иногда по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 маркеров) из следующего перечня: кардиотропонин I (cTnl), кардиотропонин T (cTnT), тяжелая цепь саркомерного миозина (ГКГС), GATA-4, Nkx2.5, N-кадгерин, β2-адренорецептор, ANF, семейство транскрипционных факторов MEF-2, креатинкиназа MB (CK-MB), миоглобин и атриальный натрийуретический фактор (ANF). В некоторых вариантах осуществления кардиальные клетки демонстрируют спонтанную периодическую сократительную активность. В некоторых случаях, когда кардиальные клетки культивируют в подходящей тканевой культуральной среде с соответствующей концентрацией Ca2+ и балансом электролитов, можно наблюдать периодическое сокращение клеток вдоль одной оси клетки, а затем релаксацию сокращения без добавления каких-либо дополнительных компонентов в культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления кардиальные клетки представляют собой гипоиммуногенные кардиальные клетки.

[00911] В некоторых вариантах осуществления способ получения популяции гипоиммуногенных кардиальных клеток из популяции гипоиммуногенных плюрипотентных (HIP) клеток путем in vitro дифференцировки включает: (a)

культивирование популяции гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в культуральной среде, содержащей ингибитор GSK; (b) культивирование популяции клеток HIP в культуральной среде, содержащей антагонист WNT, для получения популяции прекардиальных клеток; и (c) культивирование популяции прекардиальных клеток в культуральной среде, содержащей инсулин, для получения популяции гипоиммунных кардиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор GSK представляет собой CHIR-99021, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор GSK присутствует в концентрации в диапазоне от около 2 мМ до около 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления антагонист WNT представляет собой IWR1, его производное или его вариант. В некоторых случаях антагонист WNT присутствует в концентрации в диапазоне от около 2 мМ до около 10 мМ.

[00912] В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных кардиальных клеток выделяют из некардиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных кардиальных клеток размножают перед введением. В определенных вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных кардиальных клеток размножают и криоконсервируют перед введением.

[00913] Другие применимые способы дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или плюрипотентных стволовых клеток в кардиальные клетки описаны, например, в US2017/0152485; US2017/0058263; US2017/0002325; US2016/0362661; US2016/0068814; US9062289; US7897389; и US7452718. Дополнительные способы получения кардиальных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или плюрипотентных стволовых клеток описаны, например, в Xu *et al.*, Stem Cells and Development, 2006, 15(5): 631-9, Burridge *et al.*, Cell Stem Cell, 2012, 10: 16-28, и Chen *et al.*, Stem Cell Res, 2015, l5(2):365-375.

[00914] В различных вариантах осуществления гипоиммуногенные кардиальные клетки можно культивировать в культуральной среде, содержащей ингибитор пути BMP, активатор сигнализации WNT, ингибитор сигнализации WNT, агонист WNT, антагонист WNT, ингибитор Src, ингибитор EGFR, активатор PCK, цитокин, фактор роста, кардиотропный агент, соединение и т. п.

[00915] Активатор сигнализации WNT включает, но не ограничивается этим, CHIR99021. Активатор PCK включает, но не ограничивается этим, PMA. Ингибитор сигнализации WNT включает, но не ограничивается этим, соединение, выбранное из KY02111, SO3031 (KY01-I), SO2031 (KY02-I), SO3042 (KY03-I) и XAV939. Ингибитор Src включает, но не ограничивается этим, A419259. Ингибитор EGFR включает, но не ограничивается этим, AG1478.

[00916] Неограничивающие примеры агентов, для создания кардиальной клетки из iPSC включают активин A, BMP4, Wnt3a, VEGF, растворимый белок frizzled, циклоспорин A, ангиотензин II, фенилэфрин, аскорбиновую кислоту, диметилсульфоксид, 5-аза-2'-

дезоксицитидин и т. п.

[00917] Предложенные в данном документе клетки можно культивировать на поверхности, такой как синтетическая поверхность, для поддержания и/или стимуляции дифференцировки гипоиммуногенных плюрипотентных клеток в кардиальные клетки. В некоторых вариантах осуществления поверхность содержит полимерный материал, включая, но не ограничиваясь этим, гомополимер или сополимер выбранных одного или более акрилатных мономеров. Неограничивающие примеры акрилатных мономеров и метакрилатных мономеров включают тетра(этиленгликоль)диакрилат, глицериндиметакрилат, 1,4-бутандиолдиметакрилат, поли(этиленгликоль)диакрилат, ди(этиленгликоль)диметакрилат, тетра(этиленгликоль)диметакрилат, 1,6-гександиолпропоксилатдиакрилат, неопентилгликольдиакрилат, триметилолпропанбензоатдиакрилат, триметилолпропанэтоксилат (1 EO/QH) метил, трицикло [5.2.1.02,6]декандиметанолдиакрилат, неопентилгликольэтоксилатдиакрилат и триметилолпропантриакрилат. Акрилат синтезируют, как известно в данной области техники, или получают от коммерческого поставщика, такого как Polysciences, Inc., Sigma Aldrich, Inc. и Sartomer, Inc.

[00918] Полимерный материал можно диспергировать на поверхности несущего материала. Применимые несущие материалы, подходящие для культивирования клеток, включают керамическое вещество, стекло, пластик, полимер или сополимер, любые их комбинации или покрытие одного материала другим. В некоторых случаях стекло включает силикатное стекло, стекло пирекс, стекло викор, кварцевое стекло, силикон или их производные и т. п.

[00919] В некоторых случаях пластики или полимеры, включая дендритные полимеры, включают поли(винилхлорид), поли(виниловый спирт), поли(метилметакрилат), поли(винилацетат - малеиновый ангидрид), поли(диметилсилоксан) монометакрилат, циклические олефиновые полимеры, фторуглеродные полимеры, полистиролы, полипропилен, полиэтиленимин или их производные и т. п. В некоторых случаях сополимеры включают поли(винилацетат-со-малеиновый ангидрид), поли(стиро-со-малеиновый ангидрид), поли(этилен-со-акриловая кислота) или их производные и т. п.

[00920] Эффективность кардиальных клеток, полученных как описано в данном документе, можно оценивать в животных моделях криопоражения сердца, которое приводит к тому, что 55% ткани стенки левого желудочка становится sCAR-тканью без лечения (Li *et al.*, Ann. Thorac. Surg. 62:654, 1996; Sakai *et al.*, Ann. Thorac. Surg. 8:2074, 1999, Sakai *et al.*, Thorac. Cardiovasc. Surg. 118:715, 1999). Успешное лечение может уменьшать площадь рубцевания, ограничивать распространение рубцевания и улучшать функцию сердца по определению по систолическому, диастолическому и развиваемому давлению. Повреждение сердца также можно моделировать, используя эмболизационную спираль в дистальной части левой передней нисходящей артерии (Watanabe *et al.*, Cell Transplant. 7:239, 1998), а эффективность лечения можно оценивать по гистологии и

функции сердца.

[00921] В некоторых вариантах осуществления введение включает имплантацию в сердечную ткань субъекта, внутривенную инъекцию, внутриартериальную инъекцию, внутрикоронарную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, интрамиокардиальную инъекцию, трансэндокардиальную инъекцию, трансэпикардиальную инъекцию или инфузию.

[00922] В некоторых вариантах осуществления пациенту, которому вводят сконструированные кардиальные клетки, также вводят кардиотропный препарат. Иллюстративные примеры кардиотропных препаратов, которые подходят для применения в комбинированной терапии, включают, но не ограничиваются этим, факторы роста, полинуклеотиды, кодирующие факторы роста, ангиогенные агенты, блокатора кальциевых каналов, антигипертензивные агенты, антимитотические агенты, инотропные агенты, антиатерогенные агенты, антикоагулянты, бета-блокаторы, агенты против аритмии, противовоспалительные агенты, сосудорасширяющие средства, тромболитические агенты, сердечные гликозиды, антибиотики, противовирусные агенты, противогрибковые агенты, агенты, которые ингибируют простейшие организмы, нитраты, ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента (ACE), антагонист рецептора ангиотензина II, натрийуретический пептид головного мозга (BNP); антинеопластические агенты, стероиды и т. п.

[00923] Эффекты терапии в соответствии с предложенными в данном документе способами можно отслеживать рядом способов. Например, можно использовать электрокардиограмму (ЭКГ) или холтеровский монитор для определения эффективности лечения. ЭКГ представляет собой средство измерения сердечных ритмов и электрических импульсов и является очень эффективным и неинвазивным путем для определения того, обеспечивает ли терапия улучшение или сохранение, предотвращение или замедление деградации электрической проводимости в сердце субъекта. Применение холтеровского монитора, портативного устройства ЭКГ, которое можно носить в течение длительных периодов времени для отслеживания сердечных аномалий, аритмии и т. п., также является надежным методом для оценки эффективности терапии. ЭКГ или ядерное исследование можно использовать для определения улучшения функции желудочков.

2. Нейральные клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[00924] В данном документе предложены разные типы нейральных клеток, дифференцированных из клеток HIP, которые применимы для последующей трансплантации или прививания субъектам-реципиентам. Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий. Типовые типы нейральных клеток включают, но не ограничиваются этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны (например, дофаминергические нейроны), глиальные клетки и т. п.

[00925] В некоторых вариантах осуществления нервные клетки, описанные в

данном документе, вводят реципиенту для лечения неврологического нарушения, выбранного из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, другого нейродегенеративного заболевани или состояния, синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), ишемии, рассеянного склероза, черепно-мозговой травмы, эпилепсии, каталепсии, энцефалита, менингита, мигрени, инсульта, транзиторной ишемической атаки, субарахноидального кровоизлияния, субдурального кровоизлияния, гематомы, экстрадурального кровоизлияния, травмы спинного мозга, шейного спондилеза, синдрома запястного канала, опухолей головного или спинного мозга, периферической невропатии, синдрома Гийена - Барре, невралгии, бокового амиотрофического склероза (ALS), таупатий, болезни Пика, прогрессирующего супрануклеарного паралича, кортико-базальной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, Bell's palsy, cerebral palsy, motor neurone disease, neurofibromatosis, encephalitis, meningitis, Tourette's syndrome, schizophrenia, psychosis, depression, or other neuropsychiatric disorder (as described in Gorman *et al., J Cell Mol Med.* 2008 Dec;12(6A):2263-2280; Kovacs *et al. Handbook of Clin Neurol.* 2018;145:355-368).

[00926] В некоторых вариантах осуществления дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток осуществляют посредством воздействия на клетки или приведения клеток в контакт со специфическими факторами, которые, как известно, позволяют получать конкретные линии дифференцировки клеток, так, чтобы направить их дифференцировку на конкретные, необходимые линию и/или тип клеток, представляющие интерес. В некоторых вариантах осуществления окончательно дифференцированные клетки демонстрируют специализированные фенотипические характеристики или признаки. Во многих вариантах осуществления описанные в данном документе стволовые клетки дифференцируют в популяции нейроэктодермальных, нейрональных, нейроэндокринных, дофаминергических, холинергических, серотонинергических (5-HT), глутаматергических, GABAергических, адренергических, норадренергических, симпатических нейрональных, парасимпатических нейрональных, симпатических периферических нейрональных клеток. В некоторых случаях популяция глиальных клеток включает популяцию микроглиальных (например, амебоидных, разветвленных, активированных фагоцитарных и активированных нефагоцитарных) клеток или популяцию макроглиальных (клеток центральной нервной системы: астроциты, олигодендроциты, эпендимные клетки и радиальную глия; и клетки периферической нервной системы: шванновские клетки и сателлитные клетки) клеток или прекурсоров и предшественников любых из вышеперечисленных клеток.

[00927] Протоколы по созданию разных типов нейральных клеток описаны в заявке PCT № WO2010144696, патентах США №№ 9057053; 9376664; и 10233422. Дополнительные описания способов дифференцировки гипоиммуногенных плюрипотентных клеток можно найти, например, в Deuse *et al.*, Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258 and Han *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446.

Способы определения эффекта трансплантации нейральных клеток в животной модели неврологического нарушения или состояния описаны в следующих работах: для спинного мозга - Curtis *et al.*, Cell Stem Cell, 2018, 22, 941-950; для болезни Паркинсона - Kikuchi *et al.*, Nature, 2017, 548:592-596; для БАС - Izrael *et al.*, Stem Cell Research, 2018, 9(1):152 и Izrael *et al.*, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.72862; для эпилепсии - Upadhya *et al.*, PNAS, 2019, 116(1):287-296.

3. Эндотелиальные клетки головного мозга, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[00928] В некоторых вариантах осуществления нервные клетки вводят субъекту для лечения сосудистой деменции, болезни Альцгеймера; заболевания, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, рассеянного склероза, другого нейродегенеративного заболевания или состояния, синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), синдрома Туретта (СТ), шизофрении, психоза, депрессии, других нервно-психических расстройств, ВИЧ-1-ассоциированного нейрокогнитивного нарушения, травматического повреждения мозга (как описано в Grammas *et al., Exp Rev Mol Med.* 2011 Mar;13:e19; Wang *et al. Front Aging Neurosci.* 2018 Nov 16;00376). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе нейральные клетки вводят субъекту для лечения или уменьшения степени инсульта. В некоторых вариантах осуществления нейроны и глиальные клетки вводят субъекту с боковым амиотрофическим склерозом (БАС). В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки вводят для облегчения симптомов или эффектов кровоизлияния в мозг. В некоторых вариантах осуществления дофаминергические нейроны и вводят пациенту с болезнью Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления норадренергические нейроны, GABAэргические интернейроны вводят субъекту, который пережил эпилептический припадок. В некоторых вариантах осуществления двигательные нейроны, интернейроны, шванновские клетки, олигодендроциты и микроглию вводят субъекту, который пережил повреждение спинного мозга.

[00929] В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки (ЭК), их прекурсоров и предшественников дифференцируют из плюрипотентных стволовых клеток (например, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) на поверхности путем культивирования клеток в среде, содержащей один или более факторов, которые способствуют созданию церебральных ЭК или нейральных клеток. В некоторых случаях среда содержит один или более из следующих факторов: CHIR-99021, VEGF, основной FGF (bFGF) и Y-27632. В некоторых случаях среда содержит добавку, предназначенную для стимуляции выживаемости и функциональности нейральных клеток.

[00930] В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки (ЭК), их прекурсоров и предшественников дифференцируют из плюрипотентных стволовых клеток на поверхности путем культивирования клеток в некондиционированной или кондиционированной среде. В некоторых случаях среда

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

[00931] В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки экспрессируют или секретируют фактор, выбранный из группы, состоящей из CD31, VE кадгерина и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки экспрессируют или секретируют один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из CD31, CD34, CD45, CD117 (c-kit), CD146, CXCR4, VEGF, SDF-1, PDGF, GLUT-1, PECAM-1, eNOS, клаудина-5, окклюдина, ZO-1, p-гликопротеина, фактора фон Виллебранда, VE-кадгерина, рецептора липопротеинов низкой плотности LDLR, белка 1, связанного с рецептором липопротеинов низкой плотности LRP1, инсулинового рецептора INSR, лептинового рецептора LEPR, молекулы адгезии базальных клеток BCAM, рецептора трансферрина TFRC, рецептора, специфического к конечному продукту гликирования, AGER, рецептора поглощения ретинола STRA6, малой субъединицы 1 транспортера крупных нейтральных аминокислот SLC7A5, транспортера возбуждающих аминокислот 3 SLC1A1, натрий-сопряженного транспортера нейтральных аминокислот 5 SLC38A5, члена 1 семейства 16 транспортеров растворенных веществ SLC16A1, АТФ-зависимой транслоказы ABCB1, транспортера ATP-ABCC2-связывающей кассеты ABCG2, белка 1, связанного с множественной лекарственной резистентностью, ABCC1, канальчатого мультиспецифического транспортера органических анионов 1 ABCC2, белка 4, связанного с множественной лекарственной резистентностью, ABCC4, и белка 5, связанного с множественной лекарственной резистентностью, ABCC5.

[00932] В некоторых вариантах осуществления церебральные ЭК характеризуются одним или более признаками, выбранными из группы, состоящей из высокой экспрессии плотных соединений, высокого электрического сопротивления, низкой фенестрации, небольшого периваскулярного пространства, высокой распространенности рецепторов инсулина и трансферрина и большого числа митохондрий.

[00933] В некоторых вариантах осуществления церебральные ЭК отбирают или очищают, используя стратегию положительного отбора. В некоторых случаях церебральные ЭК сортируют против маркера эндотелиальных клеток, такого как, но не ограничиваясь этим, CD31. Другими словами, выделяют CD31-положительные

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

4. Дофаминергические нейроны, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[00934] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки HIP дифференцируют в дофаминергические нейроны, включая нейрональные стволовые клетки, нейрональные клетки-предшественники, незрелые дофаминергические нейроны и зрелые дофаминергические нейроны.

[00935] В некоторых случаях термин «дофаминергические нейроны» включает нейрональные клетки, которые экспрессируют тирозингидроксилазу (TH), ограничивающий скорость фермент для синтеза дофамина. В некоторых вариантах осуществления дофаминергические нейроны секретируют нейротрансмиттер дофамин и имеют низкую или отсутствующую экспрессию дофамингидроксилазы. Дофаминергический (DA) нейрон может экспрессировать один или более следующих маркеров: нейрон-специфическую энолазу (NSE), 1-ароматическую аминокислотную декарбоксилазу, везикулярный транспортер моноаминов 2, транспортер дофамина, Nurr-1 и рецептор дофамина 2 (D2-рецептор). В определенных случаях термин «нейральные стволовые клетки» включает популяцию плюрипотентных клеток, которые частично дифференцировали по пути нейральных клеток и экспрессируют один или более нейральных маркеров, включая, например, нестин. Нейральные стволовые клетки могут дифференцироваться в нейроны или глиальные клетки (например, астроциты и олигодендроциты). Термин «нейральные клетки-предшественники» включает культивируемые клетки, которые экспрессируют FOXA2 и низкие уровни бета-тубулина, но не тирозингидроксилазу. Такие нейральные клетки-предшественники обладают способностью дифференцироваться в ряд нейрональных подтипов; в частности ряд подтипов дофаминергических нейронов, после культивирования соответствующих факторов, таких как описанные в данном документе.

[00936] В некоторых вариантах осуществления DA нейроны, полученные из клеток HIP, вводят пациенту, например, пациенту-человеку, для лечения нейродегенеративного заболевания или состояния. В некоторых случаях нейродегенеративное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Хантингтона и рассеянного склероза. В других вариантах осуществления DA нейроны использую для лечения или облегчения одного или более симптомов нейропсихического расстройства, такого как синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), синдром Туретта (СТ), шизофрения, психоз и депрессия. В других вариантах осуществления DA нейроны использую для лечения пациента с дефективными DA нейронами.

[00937] В некоторых вариантах осуществления дифференцированные DA нейроны

трансплантируют внутривенно или путем инъекции в определенные участки тела пациента. В некоторых вариантах осуществления DA нейроны трансплантируют в черное вещество (в частности, в компактную область или вблизи нее), вентральную область покрышки (ВОП), хвостатое ядро, скорлупу, прилежащее ядро, субталамическое ядро или любую их комбинацию головного мозга для замещения DA нейронов, дегенерация которых привела к болезни Паркинсона. Клетки DA можно инъецировать в целевую область в виде клеточной суспензии. Альтернативно, клетки DA могут быть встроены в поддерживающую матрицу или каркас, если они содержатся в таком устройстве доставки. В некоторых вариантах осуществления каркас является биоразлагаемым. В других вариантах осуществления каркас не является биоразлагаемым. Каркас может содержать природные или синтетические (искусственные) материалы.

[00938] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные DA нейроны, их прекурсоров и предшественников дифференцируют из плюрипотентных стволовых клеток путем культивирования стволовых клеток в среде, содержащий один или более факторов или добавок. Применимые факторы и добавки, которые способствуют дифференцировке, росту, размножению, сохранению и/или созреванию DA нейронов, включают, но не ограничиваются этим, Wntl, FGF2, FGF8, FGF8a, белок «ежик соник» (SHH), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), трансформирующий фактор роста a (TGF-a), TGF-b, интерлейкин 1 бета, нейротрофический фактор линии глиальных клеток (GDNF), ингибитор GSK-3 (например, CHIR-99021), ингибитор TGF-b (например, SB-431542), добавку B-27, дорсоморфин, пурморфамин, ноггин, ретиноевую кислоту, cAMP, аскорбиновую кислоту, нейротурин, заменитель сыворотки крови KnockOut, N-ацетилцистеин, лиганд c-kit, их модифицированные формы, их миметики, их аналоги и их варианты. В некоторых вариантах осуществления DA нейроны дифференцируют в присутствии одного или более факторов, которые активируют или ингибируют путь WNT, путь NOTCH, путь SHH, путь BMP, путь FGF и т. п. Протоколы дифференцировки и их подробные описания приведены например, в US9968637, US7674620, Kim *et al.*, Nature, 2002, 418,50-56; Bjorklund *et al.*, PNAS, 2002, 99(4), 2344-2349; Grow *et al.*, Stem Cells Transl Med. 2016, 5(9): 1133-44, и Cho *et al.*, PNAS, 2008, 105:3392-3397, описания которых в полном объеме, включая подробное описание примеров, способов, фигур и результатов, включены в данный документ посредством ссылки.

[00939] В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных дофаминергических нейронов выделяют из отличных от нейрональных клеток. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных дофаминергических нейронов размножают перед введением. В определенных вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных дофаминергических нейронов размножают и криоконсервируют перед введением.

[00940] Чтобы охарактеризовать и пронаблюдать дифференцировку DA и оценить фенотип DA, можно оценивать экспрессию любого количества молекулярных и генетических маркеров. Например, наличие генетических маркеров можно определять

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

[00941] В некоторых вариантах осуществления DA нейроны оценивают в соответствии с электрофизиологической активностью клеток. Электрофизиологию клеток можно оценивать, используя анализы, известные специалистам в данной области техники. Например, цельноклеточный и перфорированный пэтч-кламп, анализы для выявления электрофизиологической активности клеток, анализы для измерения величины и длительности потенциала действия клеток и функциональные анализы для выявления выработки дофамина DA клетками.

[00942] В некоторых вариантах осуществления дифференцировка DA нейронов характеризуется спонтанными ритмическими потенциалами действия и высокочастотными потенциалами действия с адаптацией частоты повторения пиков после подачи деполяризующего тока. В других вариантах осуществления дифференцировка DA характеризуется выработкой дофамина. Вырабатываемый уровень дофамина рассчитывают путем измерения ширины потенциала действия в точке, в которой он достигает половины максимальной амплитуды (пиковая полумаксимальная ширина).

[00943] В некоторых вариантах осуществления дифференцированные DA нейроны трансплантируют внутривенно или путем инъекции в определенные участки тела пациента. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные DA нейроны трансплантируют в черное вещество (в частности, в компактную область или вблизи нее), вентральную область покрышки (ВОП), хвостатое ядро, скорлупу, прилежащее ядро, субталамическое ядро или любую их комбинацию головного мозга для замещения DA нейронов, дегенерация которых привела к болезни Паркинсона. Дифференцированные DA клетки можно вводить в целевой участок в виде клеточной суспензии. В альтернативном варианте дифференцированные DA клетки можно заключать в поддерживающую матрицу или каркас, ели они содержаться в таком устройстве доставки. В некоторых вариантах осуществления каркас является биоразлагаемым. В других вариантах осуществления каркас не является биоразлагаемым. Каркас может содержать природные или синтетические (искусственные) материалы.

[00944] Доставку DA нейронов можно осуществлять, используя подходящий

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

[00945] Полезные описания нейронов, полученных из стволовых клеток, и способов их создания можно найти, например, в Kirkeby *et al.*, Cell Rep, 2012, 1:703-714; Kriks *et al.*, Nature, 2011, 480:547-551; Wang *et al.*, Stem Cell Reports, 2018, 11(1):171-182; Lorenz Studer, "Chapter 8 - Strategies for Bringing Stem Cell-Derived Dopamine Neurons to the clinic-The NYSTEM Trial" в Progress in Brain Research, 2017, том 230, стр. 191-212; Liu *et al.*, Nat Protoc, 2013, 8:1670-1679; Upadhya *et al.*, Curr Protoc Stem Cell Biol, 38, 2D.7.1-2D.7.47; публикации заявки США № 20160115448 и US8252586; US8273570; US9487752 и US10093897, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[00946] Помимо DA нейронов из описанных в данном документе клеток HIP можно дифференцировать другие нейрональные клетки и их предшественников путем культивирования клеток в среде, содержащей один или более факторов или добавок. Неограничивающие примеры факторов и добавок включают GDNF, BDNF, GM-CSF, B27, основной FGF, основной EGF, NGF, CNTF, ингибитор SMAD, антагонист Wnt, активатор сигнализации SHH и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления ингибитор SMAD выбран из группы, состоящей из SB431542, LDN-193189, ноггина PD169316, SB203580, LY364947, A77-01, A-83-01, BMP4, GW788388, GW6604, SB-505124, лерделимумаба, метелимумаба, GC-I008, AP-12009, AP-110I4, LY550410, LY580276, LY364947, LY2109761, SB-505124, E-616452 (ингибитора ALK RepSox), SD-208, SMI6, NPC-30345, K 26894, SB-203580, SD-093, активина-M108A, P144, растворимого TBR2-Fc, DMH-1, дорсоморфина дигидрохлорида и их производных. В некоторых вариантах осуществления антагонист Wnt выбран из группы, состоящей из XAV939, DKK1, DKK-2, DKK-3, DKK-4, SFRP-1, SFRP-2, SFRP-3, SFRP-4, SFRP-5, WIF-1, Soggy, IWP-2, IWR1, ICG-001, KY0211, Wnt-059, LGK974, IWP-L6 и их производных. В некоторых вариантах осуществления активатор сигнализации SHH выбран из группы, состоящей из агониста Smoothened (SAG), аналога SAG, SHH, C25-SHH, C24-SHH, пурморфамина, Hg--Ag и/или их производных.

[00947] В некоторых вариантах осуществления нейроны экспрессируют один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из субъединицы 1 типа ионотропного

рецептора глутамата NMDA GRIN1, глутаматдекарбоксилазы 1 GAD1, гамма-аминомасляной кислоты ГАМК или GABA, тирозингидроксилазы TH, транскрипционного фактора гомеобокса LIM 1-альфа LMX1A, белка Forkhead-бокса O1 FOXO1, белка Forkhead-бокса A2 FOXA2, белка Forkhead-бокса O4 FOXO4, FOXG1, 2',3'-циклический нуклеотид 3'-фосфодиэстеразы CNP, основного белка миелина MBP, бета-цепи тубулина 3 TUB3, бета-цепи тубулина 3 NEUN, члена 6 семейства 1 транспортеров растворенных веществ SLC1A6, SST, PV, кальбиндина, RAX, LHX6, LHX8, DLX1, DLX2, DLX5, DLX6, SOX6, MAFB, NPAS1, ASCL1, SIX6, OLIG2, NKX2.1, NKX2.2, NKX6.2, VGLUT1, MAP2, CTIP2, SATB2, TBR1, DLX2, ASCL1, ChAT, NGFI-B, c-fos, CRF, RAX, POMC, гипокретина, NADPH, NGF, Ach, VAChT, PAX6, EMX2p75, CORIN, TUJ1, NURR1 и/или любой их комбинации.

5. Глиальные клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[00948] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе нейральные клетки включают глиальные клетки, такие как, но не ограничиваясь этим, микроглию, астроциты, олигодендроциты, эпендимные клетки и шванновские клетки, глиальные прекурсоры и глиальные предшественники, которые получают посредством дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в терапевтически эффективные глиальные клетки и т. п. Дифференцировка гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток дает гипоиммуногенные нейральные клетки, такие как гипоиммуногенные глиальные клетки.

[00949] В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки, их прекурсоров и предшественников создают путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток в среде, содержащей один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, IL-34, M-CSF, лиганда FLT3, GM-CSF, CCL2, ингибитора TGF-бета, ингибитора сигнализации BMP, активатора сигнализации SHH, FGF, тромбоцитарного фактора роста PDGF, PDGFR-альфа, HGF, IGF1, ноггина, SHH, дорсоморфина, ноггина и любой их комбинации. В определенных случаях ингибитор сигнализации BMP представляет собой LDN193189, SB431542 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки экспрессируют NKX2.2, PAX6, SOX10, нейротрофический фактор головного мозга BDNF, нейротрофин-3 NT-3, NT-4, EGF, цилиарный нейротрофический фактор CNTF, фактор роста нервов NGF, FGF8, EGFR, OLIG1, OLIG2, миелиновый основной белок MBP, GAP-43, LNGFR, нестин, GFAP, CD11b, CD11c, CX3CR1, P2RY12, IBA-1, TMEM119, CD45 и любую их комбинацию. Типовая среда для дифференцировки может содержать любые специфические факторы и/или малые молекулы, которые могут облегчать или обеспечивать создание определенного типа глиальных клеток, как известно специалистам в данной области техники.

[00950] Чтобы определить, демонстрируют ли клетки, созданные в соответствии с протоколом in vitro дифференцировки, характеристики и признаки глиальных клеток,

клетки можно трансплантировать в животную модель. В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки вводят мыши с ослабленным иммунитетом, например, мыши с ослабленным иммунитетом shiverer. Глиальные клетки вводят в головной мозг мыши, а привитые клетки оценивают через заданное количество времени. В некоторых случаях привитые клетки в головном мозге визуализируют, используя методы иммуноокрашивания и визуализации. В некоторых вариантах осуществления определяют, что глиальные клетки экспрессируют известные глиальные биомаркеры.

[00951] Применимые способы для создания глиальных клеток, их прекурсоров и предшественников из стволовых клеток можно найти, например, в US7579188; US7595194; US8263402; US8206699; US8252586; US9193951; US9862925; US8227247; US9709553; US2018/0187148; US2017/0198255; US2017/0183627; US2017/0182097; US2017/253856; US2018/0236004; WO2017/172976; и WO2018/093681. Способы дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток описаны, например, в Kikuchi *et al.*, Nature, 2017, 548, 592-596; Kriks *et al.*, Nature, 2011, 547-551; Doi *et al.*, Stem Cell Reports, 2014, 2, 337-50; Perrier *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101, 12543-12548; Chambers *et al.*, Nat Biotechnol, 2009, 27, 275-280; и Kirkeby *et al.*, Cell Reports, 2012, 1, 703-714.

[00952] Эффективность трансплантатов нейральных клеток в случае повреждения спинного мозга можно оценивать, например, в крысиной модели острого повреждения спинного мозга, как описано в McDonald, *et al.*, Nat. Med., 1999, 5:1410) и Kim, *et al.*, Nature, 2002, 418:50. Например, успешные трансплантаты могут характеризоваться тем, что полученные из трансплантатов клетки присутствуют в пораженном участке через 2-5 недель, дифференцируются в астроциты, олигодендроциты и/или нейроны и мигрируют вдоль спинного мозга от пораженного конца, а также улучшением походки, координации и набором массы. Конкретные животные модели выбирают на основании типа нейральных клеток и неврологического заболевания или состояния, подлежащего лечению.

[00953] В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных клеток, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, если субъект страдает заболеванием или состоянием, включая, помимо прочего, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен (AGD), боковой амиотрофический склероз (БАС), кортико-базальную дегенерацию (КБД), паркинсонизм, связанный с хромосомой 17 (FTDP-17), множественную системнцю атрофию (MCA), болезнь Паркинсона/диффузную болезнь с тельцами Леви (ПД/ДЛБД) или болезнь Альцгеймера (см. Miller *et al., Neuron Glia Biol.* 2004 Feb; 1(1): 13-21).

[00954] Нейральные клетки можно вводить способом, который подволяет им приживляться в соответствующем тканевом участке и восстанавливать или регенерировать область с нарушением функциональности. Например, нейральные клетки можно трансплантировать непосредственно в паренхимальные или интратекальные участки центральной нервной системы в соответствии с заболеванием, лечение которого проводят. В некоторых вариантах осуществления любые нейральные клетки, описанные в

данном документе, включая церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминергические нейроны, эпендимные клетки, астроциты, микроглиальные клетки, олигодендроциты и шванновские клетки, вводят пациенту путем внутривенной, интраспинальной, интрацеребровентрикулярной, интратекальной, внутриартериальной, внутримышечной, внутрибрюшинной, подкожной, внутримышечной, интраабдоминальной, внутриглазной, ретробульбарной инъекции и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят или депонируют в форме болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В определенных вариантах осуществления нейральные клетки вводят путем инъекции в головной мозг, в подходящий участок головного мозга и их комбинации. Инъекцию можно проводить, например, через просверленное в черепе субъекта отверстие. Подходящие участки для введения нейральных клеток в головной мозг включают, но не ограничиваются этим, желудочек головного мозга, боковые желудочки, мозжечково-мозговую цистерну, скорлупу, базальное ядро, кору гиппокампа, полосатое тело, области хвостатого ядра головного мозга и их комбинации.

[00955] Дополнительные описания нейральных клеток, включая дофаминергические нейроны, для применения в настоящем изобретении можно найти в WO2020/018615, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

6. Эндотелиальные клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[00956] В данном документе предложены гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые дифференцируются в различные типы эндотелиальных клеток, для последующей трансплантации или прививания субъектам (например, реципиентам). Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий.

[00957] В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки, дифференцированные из предложенных гипоиммуногенных плюрипотентных клеток, вводят пациенту, например, нуждающемуся в этом пациенту-человеку. Эндотелиальные клетки можно вводить пациенту, страдающему от заболевания или состояния, такого как, помимо прочего, атеросклероз, атерогенез, артериальный тромбоз, венозный тромбоз, тромбоцитарная микроангиопатия, транссудация, диффузное внутрисосудистое свертывание крови, диабет, резистентность к инсулину (как описано в Rajendra *et al., Int J Biol Sci.* 2013 Nov 9;9(10):1057-1069), сердечно-сосудистые заболевания, сосудистые заболевания, заболевания периферических сосудов, ишемическая болезнь, инфаркт миокарда, застойная сердечная недостаточность, обструктивная болезнь периферических сосудов, инсульт, реперфузионное повреждение, ишемия конечностей, невропатия (*например*, периферическая невропатия или диабетическая невропатия), органная недостаточность (*например*, печеночная недостаточность, почечная недостаточность и т.п.), диабет, ревматоидный артрит, остеопороз, повреждение сосудов, повреждение

тканей, гипертония, стенокардия и инфаркт миокарда вследствие ишемической болезни сердца, почечная сосудистая гипертензия, почечная недостаточность вследствие стеноза почечной артерии, хромота нижних конечностей и тому подобное. В определенных вариантах осуществления пациент имел или имеет преходящий ишемический приступ или инсульт, который в некоторых случаях может быть связан с цереброваскулярным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления сконструированные эндотелиальные клетки вводят для лечения тканевой ишемии например, которая возникает при атеросклерозе, инфаркте миокарда и ишемии конечностей, а также для восстановления пораженных кровеносных сосудов. В некоторых случаях клетки используют в биоконструировании трансплантатов.

[00958] Например, эндотелиальные клетки можно использовать в клеточной терапии для восстановления ишемических тканей, образования кровеносных сосудов и сердечных клапанов, конструирования искусственных сосудов, восстановления поврежденных сосудов и индукции образования кровеносных сосудов в сконструированных тканях (например, перед трансплантацией). Кроме того, эндотелиальные клетки можно дополнительно модифицировать для доставки агентов к мишени и лечения опухолей.

[00959] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ восстановления или замены ткани, нуждающейся в сосудистых клетках или васкуляризации. Этот способ включает введение нуждающемуся в таком лечении пациенту-человеку композиции, содержащей выделенные эндотелиальные клетки, для стимуляции васкуляризации в такой ткани. Ткань, в которой необходимы васкулярные клетки или васкуляризация, может представлять собой, помимо прочего, ткань сердца, ткань печени, ткань поджелудочной железы, ткань почки, мышечную ткань, нейральную ткань, костную ткань, которая может быть поврежденной тканью и характеризоваться избыточной гибелью клеток, тканью, подверженной риску повреждения или искусственно сконструированной тканью.

[00960] В некоторых вариантах осуществления сосудистые заболевания, которые могут быть связаны с сердечными заболеваниями или нарушениями, можно лечить путем введения эндотелиальных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, окончательные сосудистые эндотелиальные клетки и эндокардиальные эндотелиальные клетки, полученные как описано в данном документе. Такие сосудистые заболевания включают, но не ограничиваются этим, ишемическую болезнь сердца, цереброваскулярное заболевание, аортальный стеноз, аневризму аорты, заболевание периферических артерий, атеросклероз, варикозное расширение вен, ангиопатию, инфарктный участок сердца с отсутствием коронарной перфузии, незаживающие раны, диабетические или недиабетические язвы или любое другое заболевание или расстройство, при котором необходимо индуцировать образование кровеносных сосудов.

[00961] Во многих вариантах осуществления эндотелиальные клетки используют для улучшения эндопротезов (например, сосудов, изготовленных из синтетических

материалов, таких как Dacron и Gortex.), которые используют в реконструктивной хирургии сосудов. Например, артериальные эндопротезы часто используют для замещения пораженных артерий, которые питают жизненно важные органы или конечности. В других вариантах осуществления сконструированные эндотелиальные клетки используют для покрытия поверхности эндопротезов сердечных клапанов для снижения риска образования эмболов, делая поверхность клапана менее тромбогенной.

[00962] Описанные эндотелиальные клетки можно трансплантировать пациенту, используя хорошо известные хирургические методики для прививания ткани и/или выделенных клеток в сосуд. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в ткань сердца пациента путем инъекции (например, интрамиокардиальной инъекции, внутрикоронарной инъекции, трансэндокардиальной инъекции, трансэпикардиальной инъекции, чрескожной инъекции), инфузии, прививания и имплантации.

[00963] Введение (доставка) эндотелиальных клеток включает, но не ограничивается этим, подкожное или парентеральное, включая внутривенное, внутриартериальное (например, внутрикоронарное), внутримышечное, внутрибрюшинное, интрамиокардиальное, трансэндокардиальное, трансэпикардиальное, интраназальное введение, а также интратекальное, и инфузионные методы.

[00964] Как понятно специалистам в данной области техники, производные HIP трансплантируют, используя методики, известные в данной области техники, которые зависят как от типа клеток, так и от конечного применения этих клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки трансплантируют внутривенно или путем инъекции в определенные участки тела пациента. При пересадке в определенные участки клетки можно суспендировать в гелевой матрице для предотвращения рассредоточения, пока они приживаются.

[00965] Типовые типы эндотелиальных клеток включают, но не ограничиваются этим, капиллярные эндотелиальные клетки, сосудистые эндотелиальные клетки, аортальные эндотелиальные клетки, артериальные эндотелиальные клетки, венозные эндотелиальные клетки, почечные эндотелиальные клетки, эндотелиальные клетки головного мозга, печеночные эндотелиальные клетки и т. п.

[00966] Описанные в данном документе эндотелиальные клетки могут экспрессировать один или более маркеров эндотелиальных клеток. Неограничивающие примеры таких маркеров включают VE-кадгерин (CD 144), ACE (ангиотензин-конвертирующий фермент) (CD 143), BNH9/BNF13, CD31, CD34, CD54 (ICAM-l), CD62E (E-селектин), CD105 (эндоглин), CD146, эндокан (ESM-l), эндогликс-l, эндомуцин, эотаксин-3, EPAS1 (белок 1 эндотелиального домена PAS), связанный с фактором VIII антиген, FLI-l, Flk-l (KDR, VEGFR-2), FLT-l (VEGFR-l), GATA2, GBP-l (гуанилатсвязывающий белок-l), GRO-альфа, HEX, ICAM-2 (молекула межклеточной адгезии 2), LM02, LYVE-l, MRB (magic roundabout), нуклеолин, PAL-E (патологическая анатомия Ляйден - эндотелий), RTKs, sVCAM-l, TALI, TEM1 (опухолевый эндотелиальный маркер 1), TEM5 (опухолевый эндотелиальный маркер 5), TEM7

(опухолевый эндотелиальный маркер 7), тромбомодулин (TM, CD141), VCAM-l (молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа) (CD106), VEGF, vWF (фактор фон Виллебранда), ZO-l, молекула эндотелиальной клеточной адгезии (ESAM), CD102, CD93, CD184, CD304 и DLL4.

[00967] В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки генетически модифицируют для экспрессии экзогенного полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес белок, такой как, но не ограничиваясь этим, фермент, гормон, рецептор, лиганд или лекарственный препарат, применимый для лечения нарушения/состояния или облегчения симптомов расстройства/состояния. Стандартные способы генетической модификации эндотелиальных клеток описаны, например, в US5674722.

[00968] Такие эндотелиальные клетки можно использовать для обеспечения коснтитутивного синтеза и доставки полипептидов или белков, которые применимы для предотвращения или лечения заболевания. Таким образом полипептид секретируется непосредственно в кровоток или другой участок организма (например, центральную нервную систему) индивида. В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки можно модифицировать для секреции инсулина, фактора свертывания крови (например, фактора VIII или фактора фон Виллебранда), альфа-l антитрипсина, аденозиндезаминазы, тканевого активатора плазминогена, интерлейкинов (например, IL-l, IL-2, IL-3) и т. п.

[00969] В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки можно модифицировать так, чтобы улучшить их характеристики в контексте прививаемого имплантата. Неограничивающие примеры включают секрецию или экспрессию тромболитического агента для предотвращения интралюминального тромбообразования, секрецию ингибитора пролиферации гладких мышц для предотвращения люминального стеноза вследствие гипертрофии гладких мышц и экспрессию и/или секрецию митогена эндотелиальных клеток или аутокринного фактора для стимуляции пролиферации эндотелиальных клеток и повышения степени или длительности выстилки эндотелиальными клетками полости имплантата.

[00970] В некоторых вариантах осуществления сконструированные эндотелиальные клетки используют для доставки терапевтических уровней секретируемого продукта в конкретные орган или конечность. Например, имплантат сосуда, выстланный сконструированными (трансдуцированными) in vitro эндотелиальными клетками, можно прививать в конкретные орган или конечность. Секретируемый продукт трансдуцированных эндотелиальных клеток будет доставляться в высокой концентрации в перфузируемую ткань с достижением, таким образом, необходимого эффекта в целевом анатомическом участке.

[00971] В других вариантах осуществления эндотелиальные клетки генетически модифицируют для содержания гена, которые нарушает или ингибирует ангиогенез при экспрессии эндотелиальными клетками в васкуляризированной опухоли. В некоторых

случаях эндотелиальные клетки также можно генетически модифицировать для экспрессии любого из селективных суицидальных генов, описанных в данном документе, которые позволяют осуществлять негативную селекцию привитых эндотелиальных клеток после завершения лечения опухоли.

[00972] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе эндотелиальные клетки вводят субъекту-реципиенту для лечения сосудистого заболевания, выбранного из группы, состоящей из повреждения сосудов, сердечно-сосудистого заболевания, сосудистого заболевания, заболевания периферических сосудов, ишемического заболевания, инфаркта миокарда, застойной сердечной недостаточности, обструктивного заболевания периферических сосудов, гипертензии, ишемического повреждения ткани, реперфузионного поражения, ишемии конечностей, инсульта, нейропатии (например, периферической нейропатии или диабетической нейропатии), органной недостаточности (например, печеночной недостаточности, почечной недостаточности и т. п.), сахарного диабета, ревматоидного артрита, остеопороза, цереброваскулярного заболевания, гипертензии, стенокардии и инфаркта миокарда вследствие ишемической болезни сердца, гипертензии сосудов почек, почечной недостаточности вследствие стеноза почечной артерии, нарушения кровообращения в нижних конечностях и/или другого сосудистого состояния или заболевания.

[00973] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки дифференцируются в эндотелиальные колониеобразующие клетки (ECFC) с образованием новых кровеносных сосудов для лечения заболевания периферических артерий. Известны способы дифференцировки эндотелиальных клеток. Смотрите, например, Prasain *et al.*, doi: 10.1038/nbt.3048, в полном объеме и конкретно включенную посредством ссылки, в отношении способов и реагентов для получения эндотелиальных клеток из плюрипотентных стволовых клеток человека, а также в отношении методик трансплантации. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, в общем случае путем оценки наличия ассоциированных с эндотелиальными клетками маркеров или специфических маркеров или путем измерения функциональности.

[00974] В некоторых вариантах осуществления способ получения популяции гипоиммуногенных эндотелиальных клеток из популяции гипоиммуногенных плюрипотентных клеток путем in vitro дифференцировки включает: (a) культивирование популяции клеток HIP в первой культуральной среде, содержащей ингибитор GSK; (b) культивирование популяции клеток HIP во второй культуральной среде, содержащей VEGF и bFGF, для получения популяции преэндотелиальных клеток; и (c) культивирование популяции преэндотелиальных клеток в третьей культуральной среде, содержащей ингибитор ROCK и ингибитор ALK, для получения популяции гипоиммунных эндотелиальных клеток.

[00975] В некоторых вариантах осуществления ингибитор GSK представляет собой CHIR-99021, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор GSK

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

[00976] В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда содержит от 2 пМ до около 10 пМ CHIR-99021. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда содержит 50 нг/мл VEGF и 10 нг/мл bFGF. В других вариантах осуществления вторая культуральная среда дополнительно содержит Y-27632 и SB-431542. В различных вариантах осуществления третья культуральная среда содержит 10 пМ Y-27632 и 1 пМ SB-431542. В определенных вариантах осуществления третья культуральная среда дополнительно содержит VEGF и bFGF. В конкретных случаях первая культуральная среда и/или вторая культуральная среда не содержат инсулин.

[00977] Предложенные в данном документе клетки можно культивировать на поверхности, такой как синтетическая поверхность, для поддержания и/или стимуляции дифференцировки гипоиммуногенных плюрипотентных клеток в кардиальные клетки. В некоторых вариантах осуществления поверхность содержит полимерный материал, включая, но не ограничиваясь этим, гомополимер или сополимер выбранных одного или более акрилатных мономеров. Неограничивающие примеры акрилатных мономеров и метакрилатных мономеров включают тетра(этиленгликоль)диакрилат, глицериндиметакрилат, 1,4-бутандиолдиметакрилат, поли(этиленгликоль)диакрилат, ди(этиленгликоль)диметакрилат, тетра(этиленгликоль)диметакрилат, 1,6-гександиолпропоксилатдиакрилат, неопентилгликольдиакрилат, триметилолпропанбензоатдиакрилат, триметилолпропанэтоксилат (1 EO/QH) метил, трицикло[5.2.1.02,6]декандиметанолдиакрилат, неопентилгликольэтоксилатдиакрилат и триметилолпропантриакрилат. Акрилат синтезируют, как известно в данной области техники, или получают от коммерческого поставщика, такого как Polysciences, Inc., Sigma Aldrich, Inc. и Sartomer, Inc.

[00978] В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки можно высевать на полимерную матрицу. В некоторых случаях матрица является биоразлагаемой. Подходящие биоразлагаемые матрицы хорошо известны в данной области техники и включают коллаген-GAG, коллаген, фибрин, PLA, PGA и сополимеры PLA/PGA. Дополнительные биоразлагаемые материалы включают поли(ангидриды), поли(гидроксикислоты), поли(ортоэфиры), поли(пропилфумераты), поли(капролактоны), полиамиды, полиаминокислоты, полиацетали, биоразлагаемые полицианоакрилаты, биоразлагаемые полиуретаны и полисахариды.

[00979] Также можно использовать небиоразлагаемые полимеры. Другие небиоразлагаемые, но биосовместимые полимеры включают полипиррол, полиамины,

политиофен, полистирол, сложные полиэфиры, небиоразлагаемые полиуретаны, полимочевины, поли(этиленвинилацетат), полипропилен, полиметакрилат, полиэтилен, поликарбонаты и поли(этиленоксид). Полимерная матрица может иметь любую форму, например, в виде частиц, губки, трубки, сферы, нити, спирали, капиллярной сети, пленки, волокна, сита или листа. Полимерную матрицу можно модифицировать так, чтобы она включала природные или синтетические материалы внеклеточного матрикса и факторы.

[00980] Полимерный материал можно диспергировать на поверхности несущего материала. Применимые несущие материалы, подходящие для культивирования клеток, включают керамическое вещество, стекло, пластик, полимер или сополимер, любые их комбинации или покрытие одного материала другим. В некоторых случаях стекло включает силикатное стекло, стекло пирекс, стекло викор, кварцевое стекло, силикон или их производные и т. п.

[00981] В некоторых случаях пластики или полимеры, включая дендритные полимеры, включают поли(винилхлорид), поли(виниловый спирт), поли(метилметакрилат), поли(винилацетат - малеиновый ангидрид), поли(диметилсилоксан) монометакрилат, циклические олефиновые полимеры, фторуглеродные полимеры, полистиролы, полипропилен, полиэтиленимин или их производные и т. п. В некоторых случаях сополимеры включают поли(винилацетат-со-малеиновый ангидрид), поли(стиро-со-малеиновый ангидрид), поли(этилен-со-акриловая кислота) или их производные и т. п.

[00982] В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных эндотелиальных клеток выделяют из неэндотелиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных эндотелиальных клеток размножают перед введением. В определенных вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных эндотелиальных клеток размножают и криоконсервируют перед введением.

[00983] Дополнительные описания эндотелиальных клеток для применения в способах, предложенных в данном документе, можно найти в WO2020/018615, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

7. Клетки щитовидной железы, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[00984] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки дифференцируют в клетки-предшественников щитовидной железы и фолликулярные органоиды щитовидной железы, которые могут секретировать гормоны щитовидной железы, для лечения аутоиммунного тиреоидита. Методики дифференцировки клеток щитовидной железы известны в данной области техники. Смотрите, например, Kurmann *et al.*, Cell Stem Cell, 2015 Nov 5;17(5):527-42, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении способов и реагентов для получения клеток щитовидной железы из плюрипотентных стволовых клеток человека, а также в отношении методик трансплантации.

Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, в общем случае путем оценки наличия ассоциированных с клетками щитовидной железы маркеров или специфических маркеров или путем измерения функциональности.

[00985] В некоторых вариантах осуществления клетки щитовидной железы, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток субъекта, вводят пациенту, *например*, пациенту-человеку, страдающему от заболевания или состояния, такого как, помимо прочего, зоб, гиперпаратиреоз, гипопаратиреоз (врожденный или аутоиммунный), тиреоидит, тиреоидит Хашимото, послеродовой тиреоидит, подострый тиреоидит, ятрогенный гипотиреоз, болезнь Грейвса и заболевание щитовидной железы (см. Lassen *et al., Ann Endocrinol (Paris).* 2019 Sep;80(4):240-249; Bilezikian *et al., Lancet.* 2018 Jan 13;391(10116):168-178; Weetman, *J Endocrinol Invest.* 2021 May;44(5):883-890; Weiler, *Clin Exp Optom.* 2017 Jan;100(1):20-25).

8. Гепатоциты, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[00986] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенно-индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (HIP) дифференцируются в гепатоциты для решения проблемы утраты функционирования гепатоцитов или цирроза печени. Существует ряд методик, которые можно использовать для дифференцировки клеток HIP в гепатоциты; смотрите, например, Pettinato et al., doi: 10.1038/spre32888, Snykers *et al.*, Methods Mol Biol, 2011 698:305-314, Si-Tayeb *et al.*, Hepatology, 2010, 51:297-305 и Asgari *et al.*, Stem Cell Rev, 2013, 9(4):493- 504, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении методологий и реагентов для дифференцировки. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, в общем случае путем оценки наличия ассоциированных с гепатоцитами и/или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь этим, альбумин, альфа-фетопротеин и фибриноген. Дифференцировку также можно измерять функционально, например, по метаболизации аммиака, хранению и поглощению ЛПНП, поглощению и высвобождению ICG и накоплению гликогена.

[00987] В некоторых вариантах осуществления гепатоциты, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток субъекта, вводят пациенту, *например*, пациенту-человеку, страдающего заболеванием или состоянием, таким как, помимо прочего, инфекционный гепатит (A, B и C; Bianco *et al., Dig Liver Dis.* 2004 Dec;36(12):834-842), аутоиммунный гепатит (Sirbe *et al., Int J Mol Sci.* 2021 Dec;22(24):13578), первичный билиарный холангит, первичный склерозирующий холангит (оба описаны в Park *et al. Biomedicines.* 2022 Jun;10(6):1288), неалкогольная жировая болезнь печени (Francque *et al., JHEP Rep.* 2021 Oct;3(5):100322), цирроз печени (Yoshiji *et al., J Gastroenterol.* 2021;56(7):593-619), гемохроматоз (Brissot *et al., Nat Rev Dis Primers.* 2018 Apr 5;4:18016), гипероксалурия (Hoppe and Martin-Higueras, *Drugs.* 2022;82(10):1077-1094), дефицит альфа-1-антитрипсина (Chapman *et al., Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018;13:419-432), отказ печени (Zaccherini *et al., JHEP Rep.* 2021

Feb:3(1):100176), болезнь Вильсона (Yuan *et al., Curr Neuropharmacol.* 2021 Apr;19(4):465-485), печеночная энцефалопатия (Goh *et al., Cochrane Database Syst Rev.* 2018 May;2018(5):CD012410), желтуха (Chee *et al., Hong Kong Med J.* 2018 Jun;24(3):285-292), острая печеночная порфирия (Wang *et al., Hepatol. Commun.* 2018 Dec 20;3(2):193-206), синдром Алажиля (Kohut *et al., Semin Liver Dis.* 2021 Nov;41(4):525-537), желчная атрезия (Lakshminarayann and Davenport, *J Autoimmun.* 2016 Sep;73:1-9), синдром Бадда-Киари (Iliescu *et al., Med Ultrason.* 2019 Aug 31;21(3):344-348), гипербилирубинемии, синдром Криглера-Найяра, синдром Жильбера-Мейленграхта, синдром Дубина-Джонсона, синдром Ротора (все описаны в Strassburg, *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010 Oct;24(5):555-571), галактоземия (Coelho *et al., J Inherit Metab Dis.* 2017 May;40(3):325-342), болезнь накопления гликогена, тип 1 (Kishnani *et al., Genet Med.* 2014 Nov;16(11):e1), гепаторенальный синдром (Ojeda-Yuren *et al., Ann Hepatol.* 2021 May-Jun;22:100236), внутрипеченочный холестаз беременных (Smith and Rood, *Clin Obstet Gynecol.* 2020 Mar;63(1):134-151), прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз (Baker *et al., Clin Res Hepaol Gastroenterol.* 2019 Feb;43(1):20-36), синдром Рея (Maheady, *J Pediatr Health Care.* 1989 Sep-Oct;3(5):246-250) или дефицит лизосомальной кислой липазы (Pastores and Hughes, *Drug Des Devel Ther.* 2020 Feb 11;14:591-601).

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

[00988] В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы (также называемые бета-клетками) происходят из клеток HIP, описанных в данном документе. В некоторых случаях гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые дифференцируются в различные типы островковых клеток поджелудочной железы, трансплантируют или прививают субъектам (например, реципиентам). Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий. Типовые типы островковых клеток поджелудочной железы включают, но не ограничиваются этим, островковые клетки-предшественники поджелудочной железы, незрелые островковые клетки поджелудочной железы, зрелые островковые клетки поджелудочной железы и т. п. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки поджелудочной железы вводят субъекту для лечения или сахарного диабета.

[00989] В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток субъекта, вводят пациенту, например, пациенту-человеку, страдающему от заболевания или состояния, такого как, помимо прочего, панкреатит, связанный с алкоголем, желчнокаменный панкреатит, сахарный диабет (тип 1 и тип 2), предиабет, гестационный диабет, сахарный диабет, экзокринная недостаточность поджелудочной железы, острый панкреатит, хронический панкреатит, наследственный панкреатит, гиперинсулинемия, кисты поджелудочной железы, синдром Золлингера-Эллисона,

синдром Швахмана-Даймонда, наследственный гемохроматоз, талассемия, отложение железа в поджелудочной железе, муковисцидоз, разделенная поджелудочная железа и резекция поджелудочной железы (см. Ciochina *et al., Biomolecules* 2022 May;12(5):618).

[00990] В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы получены из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток, описанных в данном документе. Полезный способ дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в островковые клетки поджелудочной железы описан, например, в US9,683,215; US9,157,062 и US8,927,280. В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы содержат островковые клетки альфа, бета, дельта, PP (продуцирующие панкреатические полипептиды) и/или ε-клетки (продуцирующие грелин). В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы содержат бета-клетки, полученные из iPSC.

[00991] В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы, полученные способами, описанными в данном документе, секретируют инсулин. В некоторых вариантах осуществления островковая клетка поджелудочной железы демонстрирует по меньшей мере две характеристики эндогенной островковой клетки поджелудочной железы, например, но не ограничиваясь этим, секрецию инсулина в ответ на глюкозу и экспрессию маркеров бета-клеток.

[00992] Типовые маркеры бета-клеток или маркеры предшественников бета-клеток включают, но не ограничиваются этим, с-пептид, Pdxl, транспортер глюкозы 2 (Glut2), HNF6, VEGF, глюкокиназу (GCK), прогормон-конвертазу (PC 1/3), Cdcpl, NeuroD, Ngn3, Nkx2.2, Nkx6.l, Nkx6.2, Pax4, Pax6, Ptfla, Isll, Sox9, Soxl7 и FoxA2.

[00993] В некоторых вариантах осуществления выделенные островковые клетки поджелудочной железы вырабатывают инсулин в ответ на повышение уровня глюкозы. В различных вариантах осуществления выделенные островковые клетки поджелудочной железы секретируют инсулин в ответ на повышение уровня глюкозы. В некоторых вариантах осуществления клетки имеют отличную морфологию, такую как клеточная морфология типа «брусчатки», и/или диаметр от около 17 пм до около 25 пм.

[00994] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки дифференцируют в бета-подобные клетки или островковые органоиды для трансплантации с целью лечения сахарного диабета I типа (СД I). Клеточные системы, перспективные в плане лечения СД 1, смотрите, например, в Ellis *et al.*, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017 Oct;14(10):612-628, включенной в данный документ посредством ссылки. Дополнительно, в Pagliuca *et al.* (Cell, 2014, 159(2):428-39) сообщается об успешной дифференцировке β-клеток из hiPSC, содержание которой в полном объеме в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении описанных способов и реагентов для крупномасштабного производства функциональных человеческих β-клеток из человеческих плюрипотентных стволовых клеток). Кроме того, в Vegas *et al.* продемонстрировано получение человеческих β-клеток из человеческих плюрипотентных стволовых клеток с последующей инкапсуляцией для избежания

иммунного отторжения хозяином; Vegas *et al.*, Nat Med, 2016, 22(3):306-11, в полном объеме включенная в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении описанных способов и реагентов для крупномасштабного производства функциональных человеческих β-клеток из человеческих плюрипотентных стволовых клеток.

[00995] В некоторых вариантах осуществления способ получения популяции гипоиммуногенных островковых клеток поджелудочной железы из популяции гипоиммуногенных плюрипотентных клеток путем in vitro дифференцировки включает: (a) культивирование популяции клеток HIP в первой культуральной среде, содержащей один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из инсулин-подобного фактора роста, трансформирующего фактора роста, FGF, EGF, HGF, SHH, VEGF, суперсемейства трансформирующего фактора роста-b, BMP2, BMP7, ингибитора GSK, ингибитора ALK, ингибитора рецептора BMP типа 1 и ретиноевой кислоты, для получения популяции незрелых островковых клеток поджелудочной железы; (b) культивирование популяции незрелых островковых клеток поджелудочной железы во второй культуральной среде, которая отличается от первой культуральной среды, для получения популяции гипоиммунных островковых клеток поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор GSK представляет собой CHIR-99021, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор GSK присутствует в концентрации в диапазоне от около 2 мМ до около 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ALK представляет собой SB-431542, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор ALK присутствует в концентрации в диапазоне от около 1 пМ до около 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда и/или вторая культуральная среда не содержат сыворотки животного происхождения.

[00996] В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных островковых клеток поджелудочной железы выделяют из клеток, отличных от островковых клеток поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных островковых клеток поджелудочной железы размножают перед введением. В определенных вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных островковых клеток поджелудочной железы размножают и криоконсервируют перед введением.

[00997] Дифференцировку анализируют, как это известно в данной области техники, в общем случае путем оценки наличия ассоциированных с β-клетками или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь этим, инсулин. Дифференцировку также можно измерять функционально, например, путем измерения метаболизма глюкозы, в общем случае смотрите Muraro *et al.*, Cell Syst. 2016 Oct 26; 3(4): 385-394.e3, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении описанных биомаркеров. После того как бета-клетки созданы, их можно трансплантировать (как в виде клеточной суспензии, так и в гелевой матрице, как обсуждается в данном документе) в воротную вену/печень, сальник, слизистую оболочку

желудочно-кишечного тракта, костный мозг, мышцы или подкожные карманы.

[00998] Дополнительные описания островковых клеток поджелудочной железы, включая дофаминергические нейроны, для применения в настоящем изобретении можно найти в WO2020/018615, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

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

[00999] В данном документе предложены клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), полученные из клеток HIP, описанных выше. Например, человеческие клетки ПЭС можно получать путем дифференцировки человеческих клеток HIP. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые дифференцируются в различные типы клеток ПЭС, трансплантируют или прививают субъектам (например, реципиентам). Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий.

[001000] Термин клетки «ПЭС» относится к клеткам пигментного эпителия сетчатки, имеющим профиль генетической экспрессии, аналогичный или практически аналогичный профилю нативных клеток ПЭС. Такие клетки ПЭС, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, могут обладать полигональной планарной морфологией нативных клеток ПЭС при выращивании до конфлюэнтности на планарном субстрате.

[001001] Клетки ПЭС можно имплантировать пациенту, имеющему макулярную дегенерацию, или пациенту, имеющему поврежденные клетки ПЭС. В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется возрастная макулярная дегенерация (ВМД), ранняя ВМД, промежуточная ВМД, поздняя ВМД, неоваскулярная возрастная дегенерация желтого пятна, сухая дегенерация желтого пятна (сухая возрастная дегенерация желтого пятна), влажная дегенерация желтого пятна (влажная возрастная дегенерация желтого пятна), вителлиформная макулярная дистрофия у взрослых (ВМД), вителлиформная макулярная дистрофия Беста, макулярная дистрофия, подобная Штаргардту (STGD3), дистрофия глазного дна Сорби (ДФС), заболевание, связанное с ABCA4, тип IB по Ашеру, аутосомно-рецессивная бестрофинопатия, аутосомно-доминантная витреоретинохориоидопатия, ювенильная дегенерация желтого пятна (JMD) (*например*, болезнь Штаргардта, болезнь Беста и ювенильный ретиношизис), врожденный амавроз Лебера или пигментный ретинит (все они описаны в Yang *et al., Front Pharmacol.* 2021 Jul 28;12:727870; Sparrow *et al., Curr Mol Med.* 2010 Dec;10(9):802-823). В других вариантах осуществления пациент страдает отслойкой или разрывами сетчатки.

[001002] Типовые типы клеток ПЭС включают, но не ограничиваются этим, клетку пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), клетку-предшественника ПЭС, незрелую клетку ПЭС, зрелую клетку ПЭС, функциональную клетку ПЭС и т. п.

[001003] Применимые способы дифференцировки плюрипотентных стволовых

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

[001004] Человеческие плюрипотентные стволовые клетки дифференцировали в клетки ПЭС, используя методики, изложенные в Kamao et al , Stem Cell Reports 2014:2:205-18, в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении способов и реагентов, описанных для методик дифференцировки и реагентов; также смотрите Mandai *et al.*, N Engl J Med, 2017, 376:1038-1046, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки в отношении методик создания слоев клеток ПЭС и трансплантации пациентам. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, в общем случае путем оценки наличия ассоциированных с ПЭС маркеров и/или специфических маркеров или путем измерения функциональности. Смотрите, например, Kamao *et al.*, Stem Cell Reports, 2014, 2(2):205-18, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении маркеров, описанных в первом параграфе раздела результатов.

[001005] В некоторых вариантах осуществления способ получения популяции гипоиммуногенных клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) из популяции гипоиммуногенных плюрипотентных клеток путем in vitro дифференцировки включает: (a) культивирование популяции гипоиммуногенных плюрипотентных клеток в первой культуральной среде, содержащей один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из активина A, bFGF, BMP4/7, DKK1, IGF1, ноггина, ингибитора BMP, ингибитора ALK, ингибитора ROCK и ингибитора VEGFR, для получения популяции пре-ПЭС клеток; (b) культивирование популяции пре-ПЭС клеток во второй культуральной среде, которая отличается от первой культуральной среды, для получения популяции гипоиммуногенных клеток ПЭС. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ALK представляет собой SB-431542, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор ALK присутствует в концентрации в диапазоне от около 2 мМ до около 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ROCK представляет собой Y-27632, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор ROCK присутствует в концентрации в диапазоне от около 1 пМ до около 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда и/или вторая культуральная среда не содержат сыворотки животного происхождения.

[001006] Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, в общем случае путем оценки наличия ассоциированных с ПЭС

маркеров и/или специфических маркеров или путем измерения функциональности. Смотрите, например, Kamao *et al.*, Stem Cell Reports, 2014, 2(2):205-18, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении раздела результатов.

[001007] Дополнительные описания клеток ПЭС для применения в способах по настоящему изобретению можно найти в WO2020/018615, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[001008] Для терапевтических применений клетки, полученные в соответствии с описанными способами, как правило, могут быть предоставлены в форме фармацевтической композиции, содержащей изотонический эксципиент, и получены в условиях, которые являются в достаточной степени стерильными для применения человеком. Общие принципы медицинских составов клеточных композиций см. в "Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy," by Morstyn & Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; and "Hematopoietic Stem Cell Therapy," E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000. Клетки могут быть упакованы в устройстве или контейнере, подходящих для распределения или клинического применения.

11. Т-лимфоциты, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[001009] Предложенные в данном документе Т-лимфоциты (Т-клетки, включая первичные Т-клетки) получают из клеток HIP, описанных в данном документе (например, гипоиммуногенных iPSC). Способы получения Т-клеток, включая CAR-Т-клетки, из плюрипотентных стволовых клеток (*например*, iPSCs) описаны, например, в Iriguchi *et al.*, Nature Communications 12, 430 (2021); Themeli *et al.*, Cell Stem Cell, 16(4):357-366 (2015); Themeli *et al.*, Nature Biotechnology 31:928-933 (2013).

[001010] Т-лимфоциты, полученные из гипоиммуногенных клеток, включают, но не ограничиваются этим, Т-клетки, которые избегают иммунного распознавания. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки получают (*например*, генерируют, культивируют или создают) из Т-клеток, таких как первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки получают (*например*, собирают, экстрагируют, удаляют или берут) от субъекта или индивидуума. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки получают из пула Т-клеток, при этом Т-клетки получены от одного или большего количества субъектов (*например*, одного или большего количества людей, включая одного или большее количество здоровых людей). В некоторых вариантах осуществления пул первичных Т-клеток получен от 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более субъектов. В некоторых вариантах осуществления субъект-донор отличается от пациента (*например*, реципиента, которому вводят терапевтические клетки). В некоторых вариантах осуществления пул Т-клеток не содержит клетки от пациента. В некоторых вариантах

осуществления один или большее количество субъектов-доноров, от которых получен пул Т-клеток, отличаются от пациента.

[001011] В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток субъекта, вводят пациенту, например, пациенту-человеку, страдающему от заболевания или состояния, такого как, помимо прочего, тяжелые комбинированные иммунодефициты (ТКИД), синдром Оменна, гипоплазия хряща и волос, ретикулярная дисгенезия (все они описаны в Shearer et al., J Allergy Clin Immunol. 2014 Apr;133(4):1092-8), синдром Вискотта-Олдрича (Massaad *et al., Ann N Y Acad Sci.* 2013 May;1285:26-4), атаксия телеангиэктазия (Rothblum-Oviatt et al., Orphnet J Rare Dis. 2016, Nov 25;11(1):159), синдром ДиДжорджа (синдром делеции 22q11.2, см. McDonald-McGinn et al., Nat Rev Dis Primers. 2015 Nov 19;1:15071), иммунно-костные дисплазии (Saraiva et al., J Med Genet. 1999 Oct;36(10):786-789), врожденный дискератоз (Stoopler and Shanti, Mayo Clin Proc. 2019 Sep;94(9):1668-1669) или хронический кожно-слизистый кандидоз (Kirkpatrick, J Am Acad Dermatol. 1994 Sep;31(3 Pt 2):S14-17). В других вариантах осуществления Т-клетки, предложенные в настоящем документе, применимы для лечения соответствующих типов рака, включая, помимо прочего, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, рак печени, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, острый миелоидный лимфоидный лейкоз, множественную миелому, рак желудка, аденокарциному желудка, аденокарциному поджелудочной железы, глиобластому, нейробластому, плоскоклеточную карциному легкого, гепатоцеллюлярную карциному и рак мочевого пузыря (см. Mohanti et al., Oncol Rep 42: 2183-2195, 2019).

[001012] В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток субъекта, вводят пациенту, например, пациенту-человеку, страдающему от заболевания или состояния, такого как, помимо прочего, тяжелые комбинированные иммунодефициты (ТКИД), синдром Оменна, гипоплазия хряща и волос, ретикулярная дисгенезия (все они описаны в Shearer et al., J Allergy Clin Immunol. 2014 Apr;133(4):1092-8), синдром Вискотта-Олдрича (Massaad *et al., Ann N Y Acad Sci.* 2013 May;1285:26-4), атаксия телеангиэктазия (Rothblum-Oviatt et al., Orphnet J Rare Dis. 2016, Nov 25;11(1):159), синдром ДиДжорджа (синдром делеции 22q11.2, см. McDonald-McGinn et al., Nat Rev Dis Primers. 2015 Nov 19;1:15071), иммунно-костные дисплазии (Saraiva et al., J Med Genet. 1999 Oct;36(10):786-789), врожденный дискератоз (Stoopler and Shanti, Mayo Clin Proc. 2019 Sep;94(9):1668-1669) или хронический кожно-слизистый кандидоз (Kirkpatrick, J Am Acad Dermatol. 1994 Sep;31(3 Pt 2):S14-17). В других вариантах осуществления Т-клетки, предложенные в настоящем документе, применимы для лечения соответствующих типов рака, включая, помимо прочего, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, рак печени, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого,

острый миелоидный лимфоидный лейкоз, множественную миелому, рак желудка, аденокарциному желудка, аденокарциному поджелудочной железы, глиобластому, нейробластому, плоскоклеточную карциному легкого, гепатоцеллюлярную карциному и рак мочевого пузыря (см. Mohanti et al., Oncol Rep 42: 2183-2195, 2019).

[001013] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. Неограничивающие примеры гематологических злокачественных новообразований включают фолликулярную лимфому (ФЛ), миелоидное новообразование, зрелое новообразование T/NK, гистиоцитарное новообразование, множественную миелому (ММ), миелодиспластический синдром (МДС), лимфоплазмоцитарную лимфому (ЛПЛ), макроглобулинемию Вальденстрема, лимфому Беркитта (БЛ), первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому (PMBL), лимфому Ходжкина, мантийноклеточную лимфому (MCL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), миелопролиферативный/миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоидный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), острый миелолейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), острый В-клеточный лимфоидный лейкоз (В-ОЛЛ), острый Т-клеточный лимфолейкоз (Т-ОЛЛ), Т-клеточную лимфому и В-клеточную лимфому (см. Taylor et al., Blood 2017 Jul 27; 130(4): 410-423).

[001014] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, включая, например, волчанку, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит, рассеянный склероз, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Аддисона, болезнь Грейвса, синдром Шегрена, болезнь Хашимото, тиреоидит, сахарный диабет 1 типа, первичный билиарный цирроз печени, аутоиммунный гепатит и целиакия (описаны в *Wang et al., J Intern Med.* 2015;278(4):369-395).

[001015] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки не активируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у пациента (*например*, реципиента после введения). Предложены способы лечения расстройства путем введения популяции гипоиммуногенных клеток нуждающемуся в этом субъекту (*например*, реципиенту) или пациенту. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе гипоиммуногенные клетки содержат Т-клетки, сконструированные (*например*, модифицированные) для экспрессии химерного антигенного рецептора, включая, помимо прочего, химерный антигенный рецептор, описанный в настоящем документе. В некоторых случаях Т-клетки представляют собой популяции или субпопуляции первичных Т-клеток от одного или большего количества индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

[001016] В некоторых вариантах осуществления полученная из HIP Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор (CAR). Любой подходящий CAR может быть

включен в полученную из HIP Т-клетку, включая описанные в данном документе CAR. В некоторых вариантах осуществления полученная из HIP Т-клетка содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, при этом полинуклеотид вставлен в геномный локус. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вставлен в безопасный или целевой локус. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вставлен в ген B2M, CIITA, TRAC, TRB, PD-1 или CTLA-4. Любой подходящий способ можно использовать для вставки CAR в геномный локус гипоиммуногенной клетки, включая описанные в настоящем документе методы генного редактирования (*например*, систему CRISPR/Cas).

[001017] Полученные из HIP Т-клетки, предложенные в настоящем документе, применимы для лечения соответствующих типов рака, включая, помимо прочего, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, рак печени, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, острый миелоидный лимфоидный лейкоз, множественную миелому, рак желудка, аденокарциному желудка, аденокарциному поджелудочной железы, глиобластому, нейробластому, плоскоклеточную карциному легкого, гепатоцеллюлярную карциному и рак мочевого пузыря.

12. NK-клетки, полученные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

[001018] Предложенные в данном документе естественные кллетки-киллеры (NK) получают из клеток HIP, описанных в данном документе (например, гипоиммуногенных iPSC).

[001019] NK-клетки (также определяемые как «большие гранулярные лимфоциты») представляют линию клеток, дифференцированных из общего лимфоидного предшественника (который также дает В-лимфоциты и Т-лимфоциты). В отличие от Т-клеток, NK-клетки естественным образом не содержат CD3 на плазматической мембране. Что важно, NK-клетки не экспрессируют TCR и, как правило, также не имеют других антиген-специфических рецепторов клеточной поверхности (а также TCR и CD3, они также не экспрессируют В-клеточные рецепторы иммуноглобулина, а вместо этого, как правило, экспрессируют CD16 и CD56). Для цитотоксической активности NK-клеток отсутствует необходимость в сенсибилизации, при этом она повышается за счет активации рядом цитокинов, включая IL-2. В общем случае считается, что у NK-клеток отсутствуют надлежащие или полные сигнальные пути, необходимые для опосредованной антигенным рецептором сигнализации, и, таким образом, они не способны к зависимым от антигенных рецепторов сигнализации, активации и размножению. NK-клетки являются цитотоксическими и балансируют сигнализацию активирующих и ингибирующих рецепторов для модуляции их цитотоксической активности. Например, NK-клетки, экспрессирующие CD16, могут связываться с Fc-доменом антител, связанных с инфицированной клеткой, что приводит к активации NK-клеток. Напротив, активность снижается в отношении клеток, экспрессирующих высокие уровни белков/молекул ГКГС

класса I. При контакте с целевой клеткой NK-клетки высвобождают белки, такие как перфорин, и ферменты, такие как протеазы (гранзимы). Перфорин может образовывать поры в клеточной мембране клетки-мишени, индуцируя апоптоз или лизис клетки.

[001020] Существует ряд методик, которые можно использовать для создания NK-клеток, включая CAR-NK-клетки, из плюрипотентных стволовых клеток (например, iPSC); смотрите, например, Zhu *et al.*, *Methods Mol Biol.* 2019; 2048:107-119; Knorr *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2013 2(4):274-83. doi: 10.5966/sctm.2012-0084; Zeng *et al.*, *Stem Cell Reports.* 2017 Dec 12;9(6):1796-1812; Ni *et al.*, *Methods Mol Biol.* 2013;1029:33-41; Bernareggi *et al.*, *Exp Hematol.* 2019 71:13-23; Shankar *et al.*, *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):234, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении методик и реагентов для дифференцировки. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, в общем случае путем оценки наличия ассоциированных с NK-клетками маркеров и/или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь этим, CD56, KIR, CD16, NKp44, NKp46, NKG2D, TRAIL, CD122, CD27, CD244, NK1.1, NKG2A/C, NCR1, Ly49, CD49b, CD11b, KLRG1, CD43, CD62L и/или CD226.

[001021] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток субъекта, вводят пациенту, например, пациенту-человеку, страдающему от заболевания или состояния, такого как, помимо прочего, системная красная волчанка (СКВ), диабет 1 типа, аутоиммунные заболевания печени, синдром Шегрена, ревматоидный артрит, системный склероз (склеродермия), органоспецифические аутоиммунные заболевания (аутоиммунный гепатит, первичный склерозирующий холангит), алкогольные заболевания печени, рассеянный склероз (все они описаны в Liu *et al., Front Immunol.* 2021; 12: 624687), дефицит NK-клеток (NKD) (функциональный (FNKD) или классический (CNKD)), иммунодефицит-полиэндокринопатия-энтеропатия-Х-сцепленный (IPEX)-подобный синдром, синдром Блума, анемия Фанкони, врожденный дискератоз, синдром Чедиака-Хигаси, семейный гематофагоцитарный лимфогистоцитоз (СГЛ), синдром Гришелли 2 типа, синдром Германски-Пудляка, синдром Папийона-Лефевра, синдром Вискотта-Олдрича, аутосомно-рецессивный синдром гипер-IgE, аномалия Мэй-Хегглина или дефицит адгезии лейкоцитов типа I или типа III (все описаны в Orange, J. S, *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep; 132(3): 515-526). В других вариантах осуществления NK-клетки, предложенные в настоящем документе, применимы для лечения соответствующих типов рака, включая, помимо прочего, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, рак печени, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, острый миелоидный лимфоидный лейкоз, множественную миелому, рак желудка, аденокарциному желудка, аденокарциному поджелудочной железы, глиобластому, нейробластому, плоскоклеточную карциному легкого, гепатоцеллюлярную карциному и рак мочевого пузыря (см. Mohanti *et al.,* Oncol Rep 42: 2183-2195, 2019).

[001022] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки не активируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ у пациента (*например*, реципиента после введения). Предложены способы лечения расстройства путем введения популяции NK-клеток нуждающемуся в этом субъекту (*например*, реципиенту) или пациенту. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе NK-клетки, сконструированные (например, модифицированные) для экспрессии химерного антигенного рецептора, включая, но не ограничиваясь этим, химерный антигенный рецептор, описанный в данном документе. Любой подходящий CAR может быть включен в NK-клетки, включая описанные в данном документе CAR. В некоторых вариантах осуществления NK-клетка содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, при этом полинуклеотид вставлен в геномный локус. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вставлен в безопасный или целевой локус. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вставлен в ген B2M, CIITA, TRAC, TRB, PD1 или CTLA4. Любой подходящий способ можно использовать для вставки CAR в геномный локус NK-клетки, включая описанные в данном документе методы генного редактирования (например, систему CRISPR/Cas).

[001023]

Способы генетической модификации

[001024] В некоторых вариантах осуществления вектор в настоящем документе представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, способную переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты, в том числе в клетку или в геном клетки. Перенесенная нуклеиновая кислота обычно связана, например, вставлена в молекулу нуклеиновой кислоты, являющуюся вектором. Вектор может включать в себя последовательности, которые направляют автономную репликацию в клетке, или может включать в себя последовательности, подходящие для интеграции в ДНК клетки-хозяина. Пригодные векторы включают в себя, например, плазмиды (например, плазмиды ДНК или плазмиды РНК), транспозоны, космиды, бактериальные искусственные хромосомы и вирусные векторы. Пригодные вирусные векторы включают в себя, например, дефектные по репликации ретровирусы и лентивирусы. Невирусные векторы могут требовать средства доставки для облегчения попадания молекулы нуклеиновой кислоты в клетку.

[001025] Вирусный вектор может содержать молекулу нуклеиновой кислоты, которая включает в себя полученные из вируса элементы нуклеиновой кислоты, которые обычно облегчают перенос молекулы нуклеиновой кислоты или ее интеграцию в геном клетки или в вирусную частицу, которая опосредует перенос нуклеиновой кислоты. Вирусные частицы, как правило, включают в себя различные вирусные компоненты, а иногда и компоненты клетки-хозяина в дополнение к нуклеиновой(-ым) кислоте(-ам). Вирусный вектор может содержать, например, вирус или вирусную частицу, способную переносить нуклеиновую кислоту в клетку или к переносимой нуклеиновой кислоте (например, такой как голая ДНК). Вирусные векторы и трансферные плазмиды могут содержать структурные и/или функциональные генетические элементы, которые в первую

очередь были получены из вируса. Ретровирусный вектор может содержать вирусный вектор или плазмиду, содержащие структурные и функциональные генетические элементы, или их части, которые в первую очередь были получены из ретровируса.

[001026] В некоторых векторах, описанных в настоящем документе, по меньшей мере часть одного или большего количества кодирующих белок областей, которые способствуют репликации или необходимы для нее, могут отсутствовать по сравнению с соответствующим вирусом дикого типа. Это делает вирусный вектор дефектным по репликации. В некоторых вариантах осуществления вектор способен трансдуцировать целевую неделящуюся клетку-хозяина и/или интегрировать ее геном в геном-хозяин.

[001027] В некоторых вариантах осуществления ретровирусная нуклеиновая кислота содержит один или большее количество (например, все) из: 5’ промотора (например, для контроля экспрессии всей упакованной РНК), 5’ LTR (например, который включает в себя R (сигнал хвоста полиаденилирования) и/или U5, который включает в себя сигнал активации праймера), сайта связывания праймера, упаковывающего сигнала psi, элемента RRE для ядерного экспорта, промотора непосредственно выше от трансгена для контроля экспрессии трансгена, трансгена (или другого элемента экзогенного агента), полипуринового тракта и 3’ LTR (например, который включает в себя мутировавший U3, R и U5). В некоторых вариантах осуществления ретровирусная нуклеиновая кислота дополнительно содержит один или большее количество из cPPT, WPRE и/или инсуляторного элемента.

[001028] Ретровирус обычно реплицируется путем обратной транскрипции его геномной РНК в копию линейной двухцепочечной ДНК и впоследствии ковалентно интегрирует свою геномную ДНК в геном-хозяин. Структура ретровирусного генома дикого типа часто содержит 5'-длинный концевой повтор (LTR) и 3' LTR, между или внутри которых расположены сигнал упаковки для обеспечения возможности упаковки генома, сайт связывания праймера, сайты интеграции для обеспечения возможности интеграции в геном клетки-хозяина и гены gag, pol и env, кодирующие компоненты упаковки, которые способствуют сборке вирусных частиц. Более сложные ретровирусы содержат дополнительные свойства, такие как последовательности rev и RRE в ВИЧ, которые обеспечивают эффективный экспорт транскриптов РНК интегрированного провируса из ядра в цитоплазму инфицированной клетки-мишени. В провирусе вирусные гены фланкированы с обоих концов областями, называемыми длинными концевыми повторами (LTR). LTR участвуют в интеграции и транскрипции провирусов. LTR также служат в качестве последовательностей энхансера-промотора и могут контролировать экспрессию вирусных генов. Инкапсулирование ретровирусных РНК происходит на основании последовательности psi, расположенной на 5'-конце вирусного генома.

[001029] Сами по себе LTR обычно представляют собой аналогичные (например, идентичные) последовательности, которые можно разделить на три элемента, называемые U3, R и U5. U3 получен из последовательности, уникальной для 3'-конца РНК. R получен из последовательности, повторяющейся на обоих концах РНК, а U5 получен из

последовательности, уникальной для 5'-конца РНК. Размеры трех элементов могут значительно варьироваться для различных ретровирусов.

[001030] Для вирусного генома сайт инициации транскрипции обычно расположен на границе между U3 и R в одном LTR, а сайт поли (A) добавления (терминации) расположен на границе между R и U5 в другом LTR. U3 содержит большую часть элементов контроля транскрипции провируса, включающих в себя последовательность промотора и несколько последовательностей энхансера, реагирующих на клеточные белки, а в некоторых случаях - на вирусные белки-активаторы транскрипции. Некоторые ретровирусы содержат любой один или большее количество из следующих генов, которые кодируют белки, участвующие в регуляции экспрессии генов: tot, rev, tax и rex.

[001031] Что касается самих структурных генов gag, pol и env, gag кодирует внутренний структурный белок вируса. Белок gag протеолитически преобразуется в зрелые белки MA (матрица), CA (капсид) и NC (нуклеокапсид). Ген pol кодирует обратную транскриптазу (OT), которая содержит ДНК-полимеразу, связанные РНКазу H и интегразу (IN), которые опосредуют репликацию генома. Ген env кодирует поверхностный гликопротеин (SU) и трансмембранный белок (TM) вириона, которые образуют комплекс, специфически взаимодействующий с белками клеточных рецепторов. Такое взаимодействие способствует инфицированию, например, путем слияния вирусной мембраны с клеточной мембраной.

[001032] В геноме дефектного по репликации ретровирусного вектора gag, pol и env могут отсутствовать или не функционировать. Области R на обоих концах РНК обычно представляют собой повторяющиеся последовательности. U5 и U3 представляют уникальные последовательности на 5'- и 3'-конце генома РНК, соответственно. Ретровирусы также могут содержать дополнительные гены, которые кодируют белки, отличные от gag, pol и env. Примеры дополнительных генов включают в себя (в ВИЧ) один или большее количество из vif, vpr, vpx, vpu, tat, rev и nef. EIAV имеет (среди прочих) дополнительный ген S2.

[001033] Иллюстративные ретровирусы, подходящие для использования в конкретных вариантах осуществления, включают в себя, помимо прочего: вирус мышиного лейкоза Молони (M-MuLV), вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза обезьян гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус мышиного лейкоза Фрэнд, вирус стволовых клеток мыши (MSCV), вирус саркомы Рауса (RSV) и лентивирус.

[001034] В некоторых вариантах осуществления ретровирус представляет собой гаммаретровирус. В некоторых вариантах осуществления ретровирус представляет собой эпсилонретровирус. В некоторых вариантах осуществления ретровирус представляет собой альфаретровирус. В некоторых вариантах осуществления ретровирус представляет собой бетаретровирус. В некоторых вариантах осуществления ретровирус представляет собой дельтаретровирус. В некоторых вариантах осуществления ретровирус представляет

собой спумаретровирус. В некоторых вариантах осуществления ретровирус представляет собой эндогенный ретровирус. В некоторых вариантах осуществления ретровирус представляет собой лентивирус.

[001035] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный или лентивирусный вектор дополнительно содержит один или большее количество инсуляторных элементов, например, инсуляторный элемент, описанный в настоящем документе. В различных вариантах осуществления векторы содержат промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим экзогенный агент. Векторы могут иметь один или большее количество LTR, причем любой LTR содержит одну или большее количество модификаций, таких как одна или большее количество нуклеотидных замен, добавлений или делеций. Векторы могут дополнительно содержать один или большее количество вспомогательных элементов для повышения эффективности трансдукции (например, cPPT/FLAP), вирусную упаковку (например, сигнал упаковки Psi (Y), RRE) и/или другие элементы, которые повышают экспрессию экзогенного гена (например, последовательности поли (A)), а также могут необязательно содержать WPRE или HPRE. В некоторых вариантах осуществления лентивирусная нуклеиновая кислота содержит одно или большее количество, например, все, например, от 5’ к 3’, из: промотора (например, CMV), последовательности R (например, содержащей TAR), последовательности U5 (например, для интеграции), последовательности PBS (например, для обратной транскрипции), последовательности DIS (например, для димеризации генома), сигнала упаковки psi, частичной последовательности gag, последовательности RRE (например, для ядерного экспорта), последовательности cPPT (например, для ядерного импорта), промотора для управления экспрессией экзогенного агента, гена, кодирующего экзогенный агент, последовательности WPRE (например, для эффективной экспрессии трансгена), последовательности PPT (например, для обратной транскрипции), последовательности R (например, для полиаденилирования и терминации) и сигнала U5 (например, для интеграции).

[001036] Иллюстративные лентивирусы включают в себя, помимо прочего: ВИЧ (вирус иммунодефицита человека; включая ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2); вирус висна-маэди (VMV); вирус артрита-энцефалита коз (CAEV); вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV); вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). В некоторых вариантах осуществления используются векторные остовы на основе ВИЧ (т.е. цис-действующей элементы последовательности ВИЧ). Лентивирусный вектор может содержать вирусный вектор или плазмиду, содержащую структурные и функциональные генетические элементы или их части, включая LTR, которые преимущественно получены из лентивируса.

[001037] В вариантах осуществления лентивирусный вектор (например, лентивирусный вектор экспрессии) может содержать лентивирусную трансферную плазмиду (например, в виде голой ДНК) или инфекционную лентивирусную частицу. Что

касается элементов, таких как сайты клонирования, промоторы, регуляторные элементы, гетерологичные нуклеиновые кислоты и т.д., следует понимать, что последовательности этих элементов могут присутствовать в форме РНК в лентивирусных частицах и могут присутствовать в форме ДНК в плазмидах ДНК.

[001038] В вариантах осуществления лентивирусный вектор представляет собой вектор с достаточной ретровирусной генетической информацией, чтобы позволить упаковку генома РНК в присутствии компонентов упаковки в вирусную частицу, способную инфицировать клетку-мишень. Инфицирование клетки-мишени может включать обратную транскрипцию и ингтеграцию в геном клетки-мишени. RLV обычно несет невирусные кодирующие последовательности, которые должны быть доставлены вектором в клетку-мишень. В вариантах осуществления RLV не способен к независимой репликации для создания инфекционных ретровирусных частиц внутри клетки-мишени. Как правило, RLV не имеет функционального гена gag-pol и/или env, и/или других генов, участвующих в репликации. Вектор может быть выполнен в виде вектора с расщепленным интроном, например, как описано в заявке на патент PCT WO 99/15683, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[001039] В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор содержит минимальный вирусный геном, например, с вирусным вектором проводили манипуляции таким образом, чтобы удалить несущественные элементы и сохранить существенные элементы с целью обеспечить требуемые функциональные возможности, чтобы инфицировать, трансдуцировать и доставить представляющую интерес нуклеотидную последовательность в целевую клетку-хозяина, например, как описано в WO 98/17815, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[001040] Минимальный лентивирусный геном может содержать, например, (5')R-U5-одна или большее количество первый нуклеотидных последовательностей-U3-R(3'). Однако плазмидный вектор, используемый для получения лентивирусного генома внутри исходной клетки, также может включать в себя транскрипционные регуляторные контрольные последовательности, функционально связанные с лентивирусным геномом, чтобы управлять транскрипцией генома в исходной клетке. Эти регуляторные последовательности могут содержать природные последовательности, связанные с транскрибируемой ретровирусной последовательностью, например, областью 5' U3, или они могут содержать гетерологичный промотор, такой как другой вирусный промотор, например, промотор CMV. Некоторые лентивирусные геномы содержат дополнительные последовательности для обеспечения эффективной выработки вируса. Например, в случае ВИЧ могут быть включены последовательности rev и RRE.

[001041] В некоторых вариантах осуществления редкощепящую эндонуклеазу вносят в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей редкощепящую эндонуклеазу. Процесс внесения нуклеиновых кислот в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие способы включают опосредованную фосфатом кальция или липидами

трансфекцию, электропорацию и трансдукцию или инфицирование с помощью вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную ДНК, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит модифицированную мРНК, как описано в данном документе (например, синтетическую модифицированную мРНК).

[001042] В настоящем изобретении предложено изменение целевых полинуклеотидных последовательностей полинуклеотидов любым способом, доступным специалисту в данной области техники, с использованием системы редактирование генов (*например* CRISPR/Cas) по данному изобретению. Можно использовать любую систему CRISPR/Cas, способную изменять целевую поинуклеотидную последовательность в клетке. Такие системы CRISPR-Cas могут использовать различные белки Cas (Haft *et al.* PLoS Comput Biol. 2005; 1(6)e60). Молекулярная машиненрия таких белков Cas, которая позволяет системе CRISPR/Cas изменять целевые полинуклеотидные последовательности в клетках, включает РНК-связывающие белки, эндо- и экзонуклеазы, геликазы и полимеразы. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа I. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа II. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа V.

[001043] Системы CRISPR/Cas по настоящему изобретению 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 по настоящему изобретению можно использовать для коррекции ОНП, связанного с заболеванием, в клетке путем замены его аллелью дикого типа. В качестве другого примера, полинуклеотидная последовательность целевого гена, который отвечает за проникновение патогена в клетку или его пролиферацию, может быть подходящей мишенью для делеции или вставки с целью нарушения функции целевого гена для предотвращения проникновения патогена в клетку или его пролиферации внутри клетки.

[001044] 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.

[001045] В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas по настоящему изобретению содержит белок Cas и по меньшей мере одну или две рибонуклеиновые кислоты, которые способны направлять белок Cas к целевому мотиву целевой полинуклеотидной последовательности и гибридизоваться с этим мотивом. В контексте настоящего документа термины «белок» и «полипептид» используются взаимозаменяемо для обозначения ряда аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями (*т. е.* полимера из аминокислот), и включают в себя модифицированные аминокислоты (*например*, фосфорилированные, гликированные, гликозилированные и др.) и аминокислотные аналоги. Типовые полипептиды или белки включают в себя генные продукты, встречающиеся в природе белки, гомологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного.

[001046] В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит одну или более аминокислотных замен или модификаций. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен включают консервативную аминокислотную замену. В некоторых случаях, замены и/или модификации могут предотвращать или понижать протеолитическую деградацию и/или увеличивать период полужизни полипептида в клетке. В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать замену пептидной связи (например, 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.).

[001047] В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает коровый белок Cas, его изоформу или любой Cas-подобный белок с аналогичной функцией или активностью любого белка Cas или его изоформы. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает коровый белок Cas. Типовые коровые белки Cas включают, но не ограничиваются этим, Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 и Cas9. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает в себя белок Cas типа V. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает в себя белок Cas подтипа E. coli (также известный как CASS2). Типовые белки Cas подтипа E. Coli включают в себя, помимо прочего, 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. См., например, Klompe *et al.*, Nature 571, 219-225 (2019); Strecker *et al.*, Science 365, 48-53 (2019). Примеры белков Cas включают в себя, помимо прочего: Cas3, Cas8a, Cas5, Cas8b, Cas8c, Cas10d, Cse1, Cse2, Csy1, Csy2, Csy3 и/или GSU0054. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает в себя Cas3, Cas8a, Cas5, Cas8b, Cas8c, Cas10d, Cse1, Cse2, Csy1, Csy2, Csy3 и/или GSU0054. В некоторых вариантах осуществления примеры белков Cas включают, помимо прочего: Cas9, Csn2 и/или Cas4. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает Cas9, Csn2 и/или Cas4. В некоторых вариантах осуществления примеры белков Cas включают в себя, помимо прочего: Cas10, Csm2, Cmr5, Cas10, Csx11 и/или Csx10. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает Cas10, Csm2, Cmr5, Cas10, Csx11 и/или Csx10. В некоторых вариантах осуществления примеры белков Cas включают в себя, помимо прочего: Csf1. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает в себя Csf1. В некоторых вариантах осуществления примеры белков Cas включают в себя, помимо прочего: Cas12a, Cas12b, Cas12c, C2c4, C2c8, C2c5, C2c10 и C2c9; а также CasX (Cas12e) и CasY (Cas12d). Также смотрите, например, Koonin *et al., Curr Opin Microbiol.* 2017; 37:67-78: “Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems.” В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает в себя Cas12a, Cas12b, Cas12c, Cas12d, Cas12e, Cas12d и/или Cas12e. В некоторых вариантах осуществления примеры белков Cas включают в себя, помимо прочего: Cas13, Cas13a, C2c2, Cas13b, Cas13c и/или Cas13d. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает в себя Cas13, Cas13a, C2c2, Cas13b, Cas13c и/или Cas13d.

[001048] В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает любой из белков Cas, описанных в данном документе, или его функциональную часть. В контексте

настоящего документа термин «функциональная часть» относится к части пептида, которая сохраняет свою способность образовывать комплекс с по меньшей мере одной рибонуклеиновой кислотой (*например*, направляющей РНК (нРНК)) и расщеплять целевую полинуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cas9, выбранных из группы, состоящей из ДНК-связывающего домена, по меньшей мере одного РНК-связывающего домена, геликазного домена и эндонуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cas12a (также известного Cpf1), выбранных из группы, состоящей из ДНК-связывающего домена, по меньшей мере одного РНК-связывающего домена, геликазного домена и эндонуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления функциональные домены образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть белка Cas9 содержит функциональную часть RuvC-подобного домена. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть белка Cas9 содержит функциональную часть нуклеазного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть белка Cas12a содержит функциональную часть RuvC-подобного домена.

[001049] 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 обнаруживаемую метку.

[001050] Во многих вариантах осуществления белки Cas можно конъюгировать или сливать с заряженным белком (*например*, который несет положительный, отрицательный или в целом нейтральный электрический заряд). Такая связь может быть ковалентной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas может быть слит с суперположительно заряженным ЗФБ 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 можно сливать с доменом белковой трансдукции (ДБТ) с целью облегчения его проникновение в клетку. Типовые ДБТ включают Tat, олигоаргинин и пенетратин. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с проникающим в клетки пептидом. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с ДБТ. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом tat. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом олигоаргинина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом пенетратина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с суперположительно заряженным ЗФБ. В

некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с проникающим в клетки пептидом. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с ДБТ. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом tat. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом олигоаргинина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом пенетратина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с суперположительно заряженным ЗФБ.

[001051] В некоторых вариантах осуществления белок Cas можно вносить в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas. Процесс внесения нуклеиновых кислот в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие способы включают опосредованную фосфатом кальция или липидами трансфекцию, электропорацию и трансдукцию или инфицирование с помощью вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную ДНК, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит модифицированную мРНК, как описано в данном документе (например, синтетическую модифицированную мРНК).

[001052] 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).

[001053] Способы по настоящему изобретению предполагают применение любой рибонуклеиновой кислоты, которая способна направлять белок Cas к целевому мотиву целевой полинуклеотидной последовательности и гибридизоваться с этим мотивом. 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 гибридизируются 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 или

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

[001054] 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.

[001055] 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.

[001056] 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).

[001057] Иллюстративные последовательности нРНК, пригодные для нацеливания на описанные в настоящем документе гены с помощью CRISPR/Cas, представлены в таблице 15. Последовательности можно найти в WO2016183041, поданной 9 мая 2016 г., полное содержание которой, включая таблицы, приложения и перечень последовательностей, включено в настоящий документ посредством ссылки.

Таблица 15. Примеры последовательностей нРНК, пригодных для нацеливания на гены

Название гена	SEQ ID NO:	WO2016183041
HLA-A	SEQ ID NO: 2-1418	Таблица 8, приложение 1
HLA-B	SEQ ID NO: 1419-3277	Таблица 9, приложение 2
HLA-C	SEQ ID NO:3278-5183	Таблица 10, приложение 3
RFX-ANK	SEQ ID NO: 95636-102318	Таблица 11, приложение 4
NFY-A	SEQ ID NO: 102319-121796	Таблица 13, приложение 6
RFX5	SEQ ID NO: 85645-90115	Таблица 16, приложение 9
RFX-AP	SEQ ID NO: 90116-95635	Таблица 17, приложение 10
NFY-B	SEQ ID NO: 121797-135112	Таблица 20, приложение 13
NFY-C	SEQ ID NO: 135113-176601	Таблица 22, приложение 15
IRF1	SEQ ID NO: 176602-182813	Таблица 23, приложение 16
TAP1	SEQ ID NO: 182814-188371	Таблица 24, приложение 17
CIITA	SEQ ID NO:5184-36352	Таблица 12, приложение 5
B2M	SEQ ID NO:81240-85644	Таблица 15, приложение 8
NLRC5	SEQ ID NO:36353-81239	Таблица 14, приложение 7
CD47	SEQ ID NO:200784-231885	Таблица 29, приложение 22
HLA-E	SEQ ID NO:189859-193183	Таблица 19, приложение 12
HLA-F	SEQ ID NO:688808-699754	Таблица 45, приложение 38

HLA-G	SEQ ID NO:188372-189858	Таблица 18, приложение 11
PD-L1	SEQ ID NO:193184-200783	Таблица 21, приложение 14
Название гена	SEQ ID NO:	US20160348073
TRAC	SEQ ID NO: 532-609 и 9102-9797	
TRB (также TCRB и TRBC)	SEQ ID NO: 610-765 и 9798-10532	

[001058] Другие типовые последовательности нРНК, применимые для нацеливания на гены с помощью системы CRISPR/Cas, описанной в данном документе, приведены предварительной заявке на патент США № 63/190685, поданной 19 мая 2021 г., и предварительной заявке на патент США № 63/221887, поданной 14 июля 2021 г., описания которых, включая таблицы, приложения и перечни последовательностей, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

[001059] В некоторых вариантах осуществления клетки по представленной технологии создают с помощью методологий с использованием нуклеаз на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN).

[001060] Под «TALE-нуклеазой» (TALEN) подразумевается слитый белок, состоящий из связывающего нуклеиновую кислоту домена, как правило, полученного из эффектора, подобного активатору транскрипции (TALE), и одного нуклеазного каталитического домена для расщепления целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Каталитический домен предпочтительно представляет собой нуклеазный домен и более предпочтительно домен, обладающий эндонуклеазной активностью, такой как, например, I-TevI, ColE7, NucA и Fok-I. Во многочисленных вариантах осуществления домен TALE может быть слит с мегануклеазой, такой как, например, I-CreI и I-OnuI или их функциональным вариантом. В более предпочтительном варианте осуществления указанная нуклеаза представляет собой мономерную TALE-нуклеазу. Мономерная TALE-нуклеаза представляет собой TALE-нуклеазу, для димеризации которой не требуется специфическое распознавание и расщепление, такую как слияния сконструированных повторов TAL с каталитическим доменом I-TevI, описанные в WO2012138927. Эффектор, подобный активатору транскрипции (TALE), представляет собой белки бактериального вида Xanthomonas, содержащие множество повторяющихся последовательностей, причем каждый повтор содержит два остатка в позициях 12 и 13 (RVD), которые специфичны для каждого нуклеотидного основания целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Связывающие домены с аналогичными свойствами связывания нуклеиновых кислот модульного типа «основание за основанием» (MBBBD) также можно получать из новых модульных белков, недавно открытых заявителем в другом виде бактерий. Преимущество новых модульных белков заключается в том, что они демонстрируют большую изменчивость последовательностей, чем повторы TAL. Предпочтительно RVD, связанные с распознаванием разных нуклеотидов, представляют собой HD для распознавания C, NG

для распознавания T, NI для распознавания A, NN для распознавания G или A, NS для распознавания A, C, G или T, HG для распознавания T, IG для распознавания T, NK для распознавания G, HA для распознавания C, ND для распознавания C, HI для распознавания C, HN для распознавания G, NA для распознавания G, SN для распознавания G или A и YG для распознавания T, TL для распознавания A, VT для распознавания A или G и SW для распознавания A. В другом варианте осуществления критические аминокислоты 12 и 13 можно заменять другими аминокислотными остатками, чтобы модулировать их специфичность в отношении нуклеотидов A, T, C и G и, в частности, для усиления этой специфичности. Наборы TALEN продаются на коммерческой основе.

[001061] В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают манипуляциям с помощью цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN). «Цинк-пальцевой связывающий белок» представляет собой белок или полипептид, который связывает ДНК, РНК и/или белок, предпочтительно специфичным для последовательности образом, в результате стабилизации структуры белка посредством координации иона цинка. Термин цинк-пальцевой связывающий белок часто сокращенно называют цинк-пальцевым белком или ZFP (англ. zinc finger protein). 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, как правило, содержит приблизительно 30 аминокислот, цинк-хелатирующий, ДНК-связывающий субдомен. Исследования показали, что один цинковый палец этого класса состоит из альфа-спирали, содержащей два инвариантных гистидиновых остатка, координационно связанных с цинком, наряду с двумя цистеиновыми остатками одного бета-изгиба (смотрите, например, Berg & Shi, Science 271:1081-1085 (1996)).

[001062] В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению получают с использованием хоминг-эндонуклеазы. Такие хоминг-эндонуклеазы хорошо известны в данной области техники (Stoddard 2005). Хоминг-эндонуклеазы распознают целевую последовательность ДНК и генерируют одно- или двухцепочечный разрыв. Хоминг-эндонуклеазы являются высокоспецифичными, распознавая целевые сайты ДНК длиной от 12 до 45 пар оснований (п. о.), обычно в диапазоне от 14 до 40 п. о. Хоминг-эндонуклеаза согласно технологии может, например, соответствовать эндонуклеазе LAGLIDADG, эндонуклеазе HNH или эндонуклеазе GIY-YIG. Предпочтительная хоминг-эндонуклеаза по настоящему изобретению может представлять собой вариант I-CreI.

[001063] В некоторых вариантах осуществления клетки по представленной технологии получают, используя мегануклеазу. Мегануклеазы по определению представляют собой специфические в отношении последовательности эндонуклеазы, распознающие большие последовательности (Chevalier, B. S. and B. L. Stoddard, Nucleic

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

[001064] В некоторых вариантах осуществления клетки по представленной технологии получают, используя РНК-сайленсинг или РНК-интерференцию (РНКи) для нокдауна (*например*, снижения, устранения или ингибирования) экспрессии полипептида, такого как толерогенный фактор. Применимые методы РНКи включают в себя те, в которых используют синтетические молекулы РНКи, короткие интерферирующие РНК (киРНК), PIWI-взаимодействующие РНК (piРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК), микроРНК (микро-РНК) и другие способы осуществления временного нокдауна, известные специалистам в данной области техники. Реагенты для РНК-интерференции, включая специфические в отношении последовательности кшРНК, киРНК, микроРНК и т. п., являются коммерчески доступными. Например, нокдаун CIITA в плюрипотентной стволовой клетке можно осуществлять посредством внесения киРНК CIITA или трансдукции вируса, экспрессирующего кшРНК CIITA, в клетку. В некоторых вариантах осуществления РНК-интерференцию используют для снижения или ингибирования экспрессии по меньшей мере одного белка, выбранного из группы, состоящей из CIITA, B2M, NLRC5, TCR-альфа и TCR-бета.

[001065] В некоторых вариантах осуществления клетки, предложенные в настоящем документе, генетически модифицируют для снижения экспрессии одного или большего количества иммунных факторов (включая целевые полипептиды) для создания иммунопривилегированных или гипоиммуногенных клеток. В определенных вариантах осуществления клетки (*например*, стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, гемопоэтические клетки, первичные Т-клетки и CAR-Т-клетки), описанные в настоящем документе, содержат одну или большее количество генетических модификаций для снижения экспрессии одного или большего количества целевых полинуклеотидов. Неограничивающие примеры таких целевых полинуклеотидов и полипептидов включают в себя CIITA, B2M, NLRC5, CTLA-4, PD-1, HLA-A, HLA-BM, HLA-C, RFX-ANK, NFY-A, RFX5, RFX-AP, NFY-B, NFY-C, IRF1 и TAP1.

[001066] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация происходит с помощью системы CRISPR/Cas. За счет модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии одного или нескольких целевых полинуклеотидов такие клетки демонстрируют сниженную иммунную активацию при прививании субъекту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления клетка считается гипоиммуногенной, *например*, в организме субъекта-реципиента или пациента после введения.

A. Системы редактирования генов

[001067] В некоторых вариантах осуществления способы генетической модификации клеток для нокаута, нокдауна или иной модификации одного или большего количества генов включают в себя применение сайт-направленной нуклеазы, включая, например, цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), мегануклеазы, транспозазы и системы на основе коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)/Cas, а также системы на основе никаз, системы редактирования оснований, системы прайм-редактирования и системы записи генов, известные в данной области техники.

1. ZFN

[001068] ZFN представляют собой слитые белки, содержащие матрицу сайт-специфических ДНК-связывающих доменов, адаптированных из содержащих цинковые пальцы транскрипционных факторов, присоединенных к эндонуклеазному домену бактериального рестрикционного фермента FokI. ZFN может иметь один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) ДНК-связывающих доменов или цинк-пальцевых доменов. Смотрите, например, Carroll *et al.*, *Genetics Society of America* (2011) 188:773-782; Kim *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93:1156-1160. Каждый цинк-пальцевой домен представляет собой небольшой белковый структурный мотив, стабилизированный одним или большим количеством ионов цинка, и обычно распознает последовательность ДНК длиной 3-4 п. о. Таким образом, тандемные домены могут потенциально связываться с удлиненной нуклеотидной последовательностью, являющейся уникальной в геноме клетки.

[001069] Различные цинковые пальцы с известной специфичностью можно комбинировать для получения многопальцевых полипептидов, которые распознают последовательности длиной около 6, 9, 12, 15 или 18 п. о. Доступны различные методики селекции и модульной сборки для создания цинковых пальцев (и их комбинаций), распознающих конкретные последовательности, включая фаговый дисплей, дрожжевые одногибридные системы, бактериальные одногибридные и двухгибридные системы и клетки млекопитающих. Цинковые пальцы можно конструировать так, чтобы они связывали предопределенную последовательность нуклеиновой кислоты. Критерии для конструирования цинкового пальца для связывания с предопределенной последовательностью нуклеиновой кислоты известны в данной области техники. См., *например*, Sera *et al.*, *Biochemistry* (2002) 41:7074-7081; Liu *et al.*, *Bioinformatics* (2008) 24:1850-1857.

[001070] ZFN, содержащие нуклеазные домены FokI, или другие димерные нуклеазные домены, функционируют как димер. Таким образом, пара ZFN необходима для нацеливания на непалиндромные сайты ДНК. Две отдельные ZFN должны связывать противоположные цепи ДНК, при этом их нуклеазы должны быть должным образом разнесены в пространстве. См. Bitinaite *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:10570-10575. Для расщепления конкретного сайта в геноме конструируют пару ZFN для

распознавания двух последовательностей, фланкирующих этой сайт: одну на прямой цепи, а другую на обратной цепи. После связывания ZFN с любой стороны сайта нуклеазные домены димеризуются и расщепляют ДНК в этом сайте, создавая ДЦР с 5′-выступами. Затем можно использовать HDR для внесения конкретной мутации с помощью матрицы репарации, содержащей необходимую мутацию, фланкируемую плечами гомологии. Матрица репарации обычно представляет собой экзогенный двухцепочечный ДНК-вектор, вносимый в клетку. См. Miller *et al.*, *Nat. Biotechnol.* (2011) 29:143-148; Hockemeyer *et al.*, *Nat. Biotechnol.* (2011) 29:731-734.

2. TALEN

[001071] TALEN являются другим примером искусственной нуклеазы, которую можно использовать для редактирования целевого гена. TALEN получают из ДНК-связывающих доменов, называемых повторами TALE, которые обычно содержат тандемные матрицы с 10-30 повторами, которые связывают и распознают удлиненные последовательности ДНК. Длина каждого повтора составляет 33-35 аминокислот, при этом две смежные аминокислоты (называемые вариабельным двойным остатком повтора или RVD (англ. repeat-variable di-residue)) придают специфичность в отношении одной из четырех пар оснований ДНК. Таким образом, существует однозначное соответствие между повторами и парами оснований в целевых последовательностях ДНК.

[001072] TALEN получают искусственно путем слияния одного или большего количества ДНК-связывающих доменов TALE (*например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) с нуклеазным доменом, например, эндонуклеазным доменом FokI. Смотрите Zhang, *Nature Biotech.* (2011) 29:149-153. Для применения в TALEN в FokI было внесено несколько мутаций; например, улучшающих специфичность или активность расщепления. См. Cermak *et al.*, *Nucl. Acids Res.* (2011) 39:e82; Miller *et al.*, *Nature Biotech.* (2011) 29:143-148; Hockemeyer *et al.*, *Nature Biotech.* (2011) 29:731-734; Wood *et al.*, *Science* (2011) 333:307; Doyon *et al.*, *Nature Methods* (2010) 8:74-79; Szczepek *et al.*, *Nature Biotech* (2007) 25:786-793; Guo *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2010) 200:96. Домен FokI функционирует как димер, для чего необходимы две конструкции с уникальными ДНК-связывающими доменами для сайтов в целевом геноме с соответствующими ориентацией и пространственным расположением. Как число аминокислотных остатков между ДНК-связывающим доменом TALE и нуклеазным доменом FokI, так и число оснований между двумя отдельными связывающими сайтами TALEN являются важными параметрами для достижения высоких уровней активности. Miller *et al.*, *Nature Biotech.* (2011) 29:143-148.

[001073] Комбинируя сконструированные повторы TALE с нуклеазным доменом, можно получать сайт-специфические нуклеазы для любой необходимой последовательности ДНК. Аналогично с ZFN, TALEN можно вносить в клетку для создания ДЦР в необходимом целевом сайте в геноме и, таким образом, можно использовать для нокаута генов или нокин-мутаций аналогичными HDR-опосредованными путями. См. Boch, *Nature Biotech.* (2011) 29:135-136; Boch *et al.*, *Science* (2009) 326:1509-1512; Moscou *et al.*, *Science* (2009) 326:3501.

3. Мегануклеазы

[001074] Мегануклеазы представляют собой ферменты из семейства эндонуклеаз, которые характеризуются способностью распознавать и разрезать большие последовательности ДНК (от 14 до 40 пар оснований). Мегануклеазы сгруппированы в семейства на основании их структурных мотивов, которые влияют на нуклеазную активность и/или распознавание ДНК. Наиболее широко распространенными и наиболее известными мегануклеазами являются белки из семейства LAGLIDADG, которые получили свое названия благодаря консервативной аминокислотной последовательности. См. Chevalier *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18): 3757-3774. С другой стороны, представители семейства GIY-YIG имеют модуль GIY-YIG, имеющий длину 70-100 остатков и содержащий четыре или пять консервативных мотивов последовательности с четырьмя инвариантными остатками, два из которых необходимы для активности. См. Van Roey *et al.*, *Nature Struct. Biol.* (2002) 9:806-811. Мегануклеазы семейства His-Cys характеризуются высококонсервативной серией гистидинов и цистеинов в области, охватывающей несколько сотен аминокислотных остатков. См. Chevalier *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18): 3757-3774. Представители семейства NHN определяются наличием мотивов, содержащих две пары консервативных гистидинов, окруженных остатками аспарагина. См. Chevalier *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18): 3757-3774.

[001075] Поскольку шансы идентифицировать природную мегануклеазу для конкретной целевой последовательности ДНК низки вследствие высоких требований к специфичности, для создания вариантов мегануклеаз, которые распознают уникальные последовательности, использовали различные способы, включая мутагенез и высокопроизводительный скрининг. Стратегии для конструирования мегануклеазы с измененной ДНК-связывающей специфичностью, например, для связывания с предопределенной последовательностью нуклеиновой кислоты, известны в данной области техники. Смотрите, например, Chevalier *et al.*, *Mol. Cell.* (2002) 10:895-905; Epinat *et al.*, *Nucleic Acids Res* (2003) 31:2952-2962; Silva *et al.*, *J Mol. Biol.* (2006) 361:744-754; Seligman *et al.*, *Nucleic Acids Res* (2002) 30:3870-3879; Sussman *et al.*, *J Mol Biol* (2004) 342:31-41; Doyon *et al.*, *J Am Chem Soc* (2006) 128:2477-2484; Chen *et al.*, *Protein Eng Des Sel* (2009) 22:249-256; Arnould *et al.*, *J Mol Biol.* (2006) 355:443-458; Smith *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (2006) 363(2):283-294.

[001076] Как ZFN и TALEN, мегануклеазы могут создавать ДЦР в геномной ДНК, которые могут создавать мутацию со сдвигом рамки при ненадлежащей репарации, например, посредством НГСК, что приводит к снижению экспрессии целевого гена в клетке. В альтернативном варианте чужеродную ДНК можно вносить в клетку вместе с мегануклеазой. В зависимости от последовательностей чужеродной ДНК и хромосомной последовательности этот процесс можно использовать для модификации целевого гена. См. Silva *et al.*, *Current Gene Therapy* (2011) 11:11-27.

4. Транспозазы

[001077] Транспозазы представляют собой ферменты, которые связываются с

концом транспозона и катализируют его перемещение в другую часть генома посредством механизма вырезания и вставки или механизма репликативной транспозиции. Путем связывания транспозаз с другими системами, такими как система CRISPER/Cas, можно разработать новые инструменты редактирования генов для обеспечения возможности сайт-специфических вставок или манипуляций с геномной ДНК. Существует два известных способа интеграции ДНК с использованием транспозонов, в которых используют каталитически инактивный эффекторный белок Cas и Tn7-подобные транспозоны. Транспозазо-зависимая интеграция ДНК не приводит к созданию ДЦР в геноме, что может гарантировать более безопасную и более специфическую интеграцию ДНК.

5. Системы CRISPR/Cas

[001078] Система CRISPR изначально была обнаружена в прокариотических организмах (например бактериях и простейших) как система, участвующая в защите от инвазивных фагов и плазмид, которая обеспечивает форму приобретенного иммунитета. В настоящее время ее адаптировали и используют как популярный инструмент редактирования генов в исследованиях и клинических применениях.

[001079] Системы CRISPR/Cas в общем случае содержат по меньшей мере два компонента: одну или более направляющих РНК (нРНК) и белок Cas. Белок Cas представляет собой нуклеазу, которая вносит ДЦР в целевой сайт. Системы CRISPR/Cas можно разделить на два основных класса: в системах класса 1 используется комплекс из нескольких белков Cas для разрушения нуклеиновых кислот; в системах класса 2 с той же целью используется один крупный белок Cas. Класс 1 делится на типы I, III и IV; класс 2 делится на типы II, V и VI. Разные белки Cas, адаптированные для применения в редактировании генов, включают в себя, 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. Наиболее широко используемый Cas9 описан в настоящем документе как иллюстративный. Эти белки Cas могут происходить из разных исходных организмов. Например, Cas9 может быть получен из *S. pyogenes* или *S. aureus*.

[001080] В оригинальном микробном геноме система CRISPR типа II содержит последовательности из вставляемой ДНК между последовательностями повторов CRISPR, кодируемые как матрицы в геноме-хозяине. Транскрипты из матриц повторов CRISPR процессируются в РНК CRISPR (crРНК), каждая из которых несет вариабельную последовательность, транскрибируемую из вставляемой ДНК, известную как последовательность «протоспейсера», а также часть повтора CRISPR. Каждая crРНК гибридизируется со второй трансактивирующей РНК CRISPR (tracrРНК), и эти две РНК образуют комплекс с нуклеазой Cas9. Кодируемая протоспейсером часть crРНК направляет комплекс Cas9 для расщепления целевых комплементарных последовательностей ДНК при условии, что они являются смежными с короткими

последовательностями, известными как «прилегающие к протоспейсеру мотивы» (protospacer adjacent motifs - PAM).

[001081] Со времени открытия система CRISPR была адаптирована для индукции специфических в отношении последовательности ДЦР и направленного редактирования генома в широком диапазоне клеток и организмов, от бактерий до эукариотических клеток, включая клетки человека. При использовании в применениях, связанных с редактированием генов, искусственно сконструированные синтетические нРНК заменили оригинальный комплекс crРНК:tracrРНК. Например, нРНК могут представлять собой одиночные направляющие РНК (онРНК), состоящие из crРНК, тетрапетли и tracrРНК. crРНК обычно содержит комплементарную область (также называемую спейсером, обычно длиной около 20 нуклеотидов), которая конструируется пользователем для распознавания представляющей интерес целевой ДНК. Последовательность tracrРНК содержит каркасную область для связывания Cas-нуклеазы. Последовательность crРНК и последовательность tracrРНК связаны тетрапетлей, и каждая из них имеет короткую последовательность повтора для гибридизации друг с другом с образованием, таким образом, химерной онРНК. Можно менять геномную мишень Cas-нуклеазы просто изменяя спейсер или последовательность комплементарной области, присутствующую в нРНК. Комплементарная область будет направлять Cas-нуклеазу к сайту целевой ДНК согласно стандартным правилам спаривания комплементарных оснований РНК-ДНК.

[001082] Чтобы Cas-нуклеаза функционировала, непосредственно ниже целевой последовательности в геномной ДНК должен располагаться PAM. Считается, что распознавание PAM белком Cas дестабилизирует смежную геномную последовательность, что позволяет нРНК исследовать последовательность и приводит к спариванию нРНК-ДНК при наличии совпадающей последовательности. Конкретная последовательность PAM варьируется в зависимости от вида гена Cas. Например, наиболее часто используемая нуклеаза Cas9, полученная из *S. pyogenes*,, распознает последовательность PAM 5’-NGG-3’ или, менее эффективно, 5’-NAG-3’, где «N» может представлять собой любой нуклеотид. Другие варианты нуклеазы Cas с альтернативными PAM также были охарактеризованы и успешно использованы для редактирования генома, которые приведены в **таблице 19** ниже.

Таблица 19. Иллюстративные варианты нуклеазы Cas и их последовательностей 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

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

6. Никазы

[001083] Нуклеазные домены Cas, в частности Cas9, можно независимо мутировать с созданием ферментов, называемых ДНК-«никазами». Никазы способны осуществлять одноцепочечный разрез с такой же специфичностью, как и обычная нуклеазная система CRISPR/Cas, включая, например, CRISPR/Cas9. Никазы можно применять для создания двухцепочечных разрывов, что может найти применение в системах редактирования генов (Mali *et al.*, *Nat Biotech*, 31(9):833-838 (2013); Mali *et al. Nature Methods,* 10:957-963 (2013); Mali *et al.*, *Science*, 339(6121):823-826 (2013)). В некоторых случаях, когда используют две никазы Cas, на каждом из расщепленных концов образуются длинные выступы вместо тупых концов, что позволяет осуществлять дополнительный контроль для точной интеграции и вставки генов (Mali *et al.*, *Nat Biotech*, 31(9):833-838 (2013); Mali *et al. Nature Methods,* 10:957-963 (2013); Mali *et al.*, *Science*, 339(6121):823-826 (2013)). Поскольку оба никирующих фермента Cas должны эффективно создавать одноцепочечный разрыв в своей целевой ДНК, спаренные никазы могут иметь меньше нецелевых эффектов по сравнению с системами двухцепочечного расщепления на основе Cas (Ran *et al.*, *Cell*, 155(2):479-480(2013); Mali *et al.*, *Nat Biotech*, 31(9):833-838 (2013); Mali *et al. Nature Methods,* 10:957-963 (2013); Mali *et al.*, *Science*, 339(6121):823-826 (2013)).

[001084] Прайм-редактирование - это универсальный и точный метод редактирования генома, который напрямую записывает новую генетическую информацию в указанный участок ДНК с использованием каталитически нарушенной эндонуклеазы Cas9, слитой с сконструированной обратной транскриптазой, запрограммированной с помощью направляющей РНК прайм-редактирования (pegРНК), которая одновременно определяет целевой сайт и кодирует желаемое редактирование. См., например, Anzalone et al., Nature, 576:149-157 (2019); WO2021072328; WO2022067130, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Cas9 и обратная транскриптаза

также могут использоваться для вставки сайта интеразы в геном для вставки интересующей нуклеиновой кислоты в процессе, называемом программируемым добавлением посредством редактирования сайт-специфических нацеливающих элементов (PASTE). См., например, Ioannidi et al., bioRxiv 2021.11.01.466786; doi.org/10.1101/2021.11.01.466786.

Способы рекомбинантной экспрессии толерогенных факторов и/или химерных антигенных рецепторов

[001085] В случае всех этих технологий используют хорошо известные рекомбинантные технологии для создания рекомбинантных нуклеиновых кислот, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие толерогенный фактор или химерный антигенный рецептор, могут быть функционально связаны с одной или большим количеством регуляторных нуклеотидных последовательностей в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности в общем случае соответствуют клетке-хозяину и подлежащему лечению субъекту-реципиенту. 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 представлять собой встречающиеся в природе промоторы, гибридные промоторы, в которых объединены элементы более чем одного промотора, или синтетические промоторы. Экспрессионная конструкция может присутствовать в клетке в эписоме, такой как плазмида, или экспрессионная конструкция может быть вставлена в хромосому, например, в локусе гена. В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор содержит ген селективного маркера, позволяющий осуществлять отбор трансформированных клеток-хозяев. Некоторые варианты осуществления включают в себя экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности для применения в настоящем документе включают в себя 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 и/или экспрессии любого другого белка, кодируемого вектором, например, антибиотических маркеров.

[001086] Примеры подходящих промоторов млекопитающих включают в себя,

например, промоторы из следующих генов: промотор фактора элонгации 1 альфа (EF1α), промотор CAG, 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 (CMV) человека. Примеры других гетерологичных промоторов млекопитающих включают в себя 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.

[001087] В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор представляет собой бицистронный или мультицистронный экспрессионный вектор. Бицистронные или мультицистронные векторы могут содержать (1) несколько промоторов, слитых с каждой из открытых рамок считывания; (2) вставку сигналов сплайсинга между генами; (3) слияние генов, чья экспрессия находится под управлением одного промотора; и (4) вставку сайтов протеолитического расщепления между генами (саморасщепляющие пептид) или вставку сайтов внутренней посадки рибосомы (IRES) между генами.

[001088] Процесс внесения описанных в данном документе полинуклеотидов в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие способы включают в себя опосредованную фосфатом кальция или липидами трансфекцию, электропорацию, фузогены и трансдукцию или инфицирование с помощью вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды вносят в клетку посредством вирусной трансдукции (*например*, трансдукции AAV, лентивирусной трансдукции) или иным образом доставляют в вирусном векторе (*например*, фузоген-опосредованная доставка). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды вводят в клетку, используя фузоген-опосредованную доставку или систему на основе транспозазы, выбранную из группы, состоящей из кондициональных или индуцибельных транспозаз, кондициональных или индуцибельных транспозонов PiggyBac, кондициональных или индуцибельных транспозонов Sleeping Beauty (SB11),

кондициональных или индуцибельных транспозонов Mos1 и кондициональных или индуцибельных транспозонов Tol2.

[001089] В некоторых вариантах осуществления предложенные в настоящем документе клетки генетически модифицируют так, чтобы они содержали один или большее количество экзогенных полинуклеотидов, вставленных в один или большее количество геномных локусов гипоиммуногенной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид кодирует представляющий интерес белок, *например*, химерный антигенный рецептор. Любой подходящий способ можно использовать для вставки экзогенного полинуклеотида в геномный локус гипоиммуногенной клетки, включая описанные в настоящем документе методы генного редактирования (*например*, систему CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид вставлен в по меньшей мере один аллель клетки с использованием вирусной трансдукции, например, с помощью вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой псевдотипированный самоинактивирующийся лентивирусный вектор, который несет экзогенный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой самоинактивирующийся лентивирусный вектор, псевдотипированный с оболочкой VSV-G вируса везикулярного стоматита, и который несет экзогенный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид вставлен в по меньшей мере один аллель клетки с использованием вирусной трансдукции. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид вставлен в по меньшей мере один аллель клетки с использованием вирусного вектора на основе лентивируса.

[001090] В отличие от определенных способов внесения описанных в настоящем документе полинуклеотидов в клетки, которые обычно включают в себя активацию клеток, например, активацию Т-клеток (*например*, $CD8^+$ Т-клеток), можно использовать подходящие способы для внесения полинуклеотидов в неактивированные Т-клетки. Подходящие способы включают в себя, помимо прочего, активацию Т-клеток, таких как $CD8^+$ Т-клетки, с помощью одного или большего количества антител, которые связываются с CD3, CD8 и/или CD28, или их фрагментами или частями (*например*, scFv и VHH), которые могут быть связаны или не связаны с гранулами. Неожиданно фузоген-опосредованное внесение полинуклеотидов в Т-клетки выполняют в неактивированные Т-клетки (*например*, $CD8^+$ Т-клетки), которые ранее не приводили в контакт с одним или большим количеством активирующих антител или их фрагментов или частей (*например*, CD3, CD8 и/или CD28). В некоторых вариантах осуществления фузоген-опосредованное внесение полинуклеотидов в Т-клетки выполняют in vivo (*например*, после введения Т-клеток субъекту). В некоторых вариантах осуществления фузоген-опосредованное внесение полинуклеотидов в Т-клетки выполняют in vitro (*например*, до введения Т-клеток субъекту).

[001091] В данном документе предложены неактивированные Т-клетки, содержащие регулируемую сниженную экспрессию HLA-A, HLA-B, HLA-C, CIITA, TCR-

альфа и/или TCR-бета по сравнению с Т-клеткой дикого типа, при этом неактивированная Т-клетка дополнительно содержит первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более регулируемых толерогенных факторов.

[001092] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка не была обработана антителом к CD3, антителом к CD28, активирующим Т-клетки цитокином или растворимой Т-клеточной костимулирующей молекулой. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка не экспрессирует маркеры активации. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка экспрессирует CD3 и CD28 и при этом CD3 и/или CD28 являются неактивными.

[001093] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 представляет собой OKT3. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28 представляет собой CD28.2. В некоторых вариантах осуществления активирующий Т-клетки цитокин выбран из группы активирующих Т-клетки цитокинов, состоящей из IL-2, IL-7, IL-15 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления растворимая Т-клеточная костимулирующая молекула выбрана из группы растворимых Т-клеточных костимулирующих молекул, состоящей из антитела к CD28, антитела к CD80, антитела к CD86, антитела к CD137L и антитела к ICOS-L.

[001094] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку. В других вариантах осуществления неактивированная Т-клетка дифференцирована из гипоиммуногенных клеток по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

[001095] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий регулируемый химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR выбран из группы, состоящей из CD19-специфического CAR и CD22-специфического CAR.

[001096] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид несет вирусный вектор, включая лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид несет лентивирусный вектор, который содержит CD8-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вносят в клетки, используя фузоген-опосредованную доставку или систему на основе транспозазы, выбранную из группы, состоящей из кондициональных или индуцибельных транспозаз, кондициональных или индуцибельных транспозонов PiggyBac, кондициональных или индуцибельных транспозонов Sleeping Beauty (SB11), кондициональных или индуцибельных транспозонов Mos1 и кондициональных или индуцибельных транспозонов Tol2.

[001097] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47. В

некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенные полинуклеотиды вставлены в конкретный локус по меньшей мере одного аллеля Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления конкретный локус выбран из группы, состоящей из безопасного локуса или целевого локуса, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*. В некоторых вариантах осуществления второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, вставлен в специфический локус, выбранный из группы, состоящей из безопасного локуса или целевого локуса, целевого локуса, локуса B2M, локуса CIITA, локуса TRAC и локуса TRB. В некоторых вариантах осуществления первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CAR, вставлен в конкретный локус, выбранный из группы, состоящей из безопасного локуса, целевого локуса, целевого локуса, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*. В некоторых вариантах осуществления первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, вставлен в конкретный локус, выбранный из группы, состоящей из безопасного локуса, целевого локуса, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*. В некоторых вариантах осуществления второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий CAR, и первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, вставлены в разные локусы. В некоторых вариантах осуществления второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий CAR, и первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставлены в один и тот же локус. В некоторых вариантах осуществления второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий CAR, и первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставлены в локус *B2M*. В некоторых вариантах осуществления второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий CAR, и первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставлены в локус *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий CAR, и первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставлены в локус *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий CAR, и первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставлены в локус *TRB*. В некоторых вариантах осуществления второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий CAR, и первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставлены в безопасный локус или целевой локус. В некоторых вариантах осуществления безопасный или целевой локус выбран из группы, состоящей из локуса гена CCR5, локуса гена CXCR4, локуса гена PPP1R12C, локуса гена альбумина, локуса гена SHS231, локуса гена CLYBL, локуса гена Rosa, локуса гена F3 (CD142), локуса гена MICA, локуса гена MICB, локуса гена LRP1 (CD91), локуса гена HMGB1, локуса гена ABO, локуса гена RHD, локуса гена FUT1 и локуса гена KDM5D.

[001098] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка не экспрессирует антигены HLA-A, HLA-B и/или HLA-C. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка не экспрессирует B2M. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка не экспрессирует антигены HLA-

DP, HLA-DQ и/или HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка не экспрессирует CIITA. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка не экспрессирует TCR-бета. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа и TCR-бета.

[001099] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус TRAC. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенные полинуклеотиды вставлены в по меньшей мере один аллель клетки с использованием вирусной трансдукции. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенные полинуклеотиды вставлены в по меньшей мере один аллель клетки с использованием вирусного вектора на основе лентивируса. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус TRAC. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус TRB. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус TRB. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус B2M. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус B2M. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус CIITA. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус *CIITA*.

[001100] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRB^{индел/индел}$, содержащую первый

регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус TRAC. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRB^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус TRAC. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRB^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус TRB. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRB^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус TRB. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRB^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус B2M. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRB^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус B2M. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRB^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус CIITA. В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRB^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус *CIITA*.

[001101] В данном документе предложены сконструированные Т-клетки, содержащие регулируемую сниженную экспрессию HLA-A, HLA-B, HLA-C, CIITA, TCR-альфа и/или TCR-бета по сравнению с Т-клеткой дикого типа, причем сконструированная Т-клетка дополнительно содержит первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более регулируемых толерогенных факторов, переносимых лентивирусным вектором, который содержит агент, связывающий CD8.

[001102] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка первичную Т-клетку. В других вариантах осуществления сконструированная Т-клетка дифференцирована из гипоиммуногенной клетки по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой $CD4^+$ Т-клетку.

[001103] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка не экспрессирует маркеры активации. В некоторых вариантах осуществления

сконструированная Т-клетка экспрессирует CD3 и CD28 и при этом CD3 и/или CD28 являются неактивными.

[001104] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка не была обработана антителом к CD3, антителом к CD28, активирующим Т-клетки цитокином или растворимой Т-клеточной костимулирующей молекулой. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 представляет собой OKT3, при этом антитело к CD28 представляет собой CD28.2, при этом активирующий Т-клетки цитокин выбран из группы активирующих Т-клетки цитокинов, состоящей из IL-2, IL-7, IL-15 и IL-21, а растворимая Т-клеточная костимулирующая молекула выбрана из группы растворимых Т-клеточных костимулирующих молекул, состоящей из антитела к CD28, антитела к CD80, антитела к CD86, антитела к CD137L и антитела к ICOS-L. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка не была обработана одним или большим количеством активирующих Т-клетки цитокинов, выбранных з группы, состоящей из IL-2, IL-7, IL-15 и IL-21. В некоторых случаях цитокин представляет собой IL-2. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество цитокинов представляют собой IL-2, а другие выбраны из группы, состоящей из IL-7, IL-15 и IL-21.

[001105] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий регулируемый химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR выбран из группы, состоящей из CD19-специфического CAR и CD22-специфического CAR.

[001106] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий регулируемый химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенные полинуклеотиды вставлены в конкретный локус по меньшей мере одного аллеля Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления конкретный локус выбран из группы, состоящей из безопасного локуса, целевого локуса, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*. В некоторых вариантах осуществления первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, вставлен в конкретный локус, выбранный из безопасного локуса, целевого локуса, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*. В некоторых вариантах осуществления второй регулируемый ген, кодирующий CAR, вставлен в конкретный локус, выбранный из безопасного локуса, целевого локуса, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*. В некоторых вариантах осуществления первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, вставлены в разные локусы. В некоторых вариантах осуществления первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, вставлены в один и тот же локус. В некоторых вариантах осуществления первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и второй регулируемый ген, кодирующий CAR, вставлены в локус *B2M*, локус

CIITA, локус *TRAC*, локус *TRB* или безопасный или целевой локус. В некоторых вариантах осуществления безопасный или целевой локус выбран из группы, состоящей из локуса гена CCR5, локуса гена CXCR4, локуса гена PPP1R12C, локуса гена альбумина, локуса гена SHS231, локуса гена CLYBL, локуса гена Rosa, локуса гена F3 (CD142), локуса гена MICA, локуса гена MICB, локуса гена LRP1 (CD91), локуса гена HMGB1, локуса гена ABO, локуса гена RHD, локуса гена FUT1 и локуса гена KDM5D.

[001107] В некоторых вариантах осуществления CAR выбран из группы, состоящей из CD19-специфического CAR и CD22-специфического CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CD19-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CD22-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с любым, выбранным из группы, состоящей из CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA.

[001108] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка не экспрессирует антигены HLA-A, HLA-B и/или HLA-C, при этом сконструированная Т-клетка не экспрессирует B2M, при этом сконструированная Т-клетка не экспрессирует антигены HLA-DP, HLA-DQ и/или HLA-DR, при этом сконструированная Т-клетка не экспрессирует CIITA и/или при этом сконструированная Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа и TCR-бета.

[001109] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRAC^{индел/индел}$, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, встроенный в локус*TRAC*, в локус *TRB*, в локус *B2M* или в локус *CIITA*. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка представляет собой $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, $TRB^{индел/индел}$ клетку, содержащую первый регулируемый ген, кодирующий один или более толерогенных факторов, и/или второй регулируемый ген, кодирующий CAR, вставленные в локус TRAC, *в локус* TRB, *в локус* B2M *или в локус* CIITA.

[001110] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка и/или сконструированная Т-клетка по настоящему изобретению находятся в организме субъекта. В других вариантах осуществления неактивированная Т-клетка и/или сконструированная Т-клетка по настоящему изобретению находятся in vitro.

[001111] В некоторых вариантах осуществления неактивированная Т-клетка и/или сконструированная Т-клетка по настоящему изобретению экспрессируют CD8-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления CD8-связывающий агент представляет собой антитело к CD8. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD8 выбрано из группы, состоящей из мышиного антитела к CD8, кроличьего антитела к CD8, человеческого антитела к CD8, гуманизированного антитела к CD8, верблюжьего (*например*, ламы, альпаки, верблюда) антитела к CD8 и их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления их фрагмент представляет собой scFv или VHH. В некоторых

вариантах осуществления CD8-связывающий агент связывается с альфа-цепью CD8 и/или бета-цепью CD8.

[001112] В некоторых вариантах осуществления CD8-связывающий агент слит с трансмембранным доменом, включенным в вирусную оболочку. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор является псевдотипированным с вирусным слитым белком. В некоторых вариантах осуществления вирусный слитый белок содержит одну или более модификаций для снижения связывания со своим нативным рецептором.

[001113] В некоторых вариантах осуществления вирусный слитый белок слит с CD8-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления вирусный слитый белок содержит гликопротеин вируса Нипах F и гликопротеин вируса Нипах G, слитые с CD8-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор не содержит активирующую Т-клетки молекулу или Т-клеточную костимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор кодирует первый экзогенный полинуклеотид и/или второй экзогенный полинуклеотид.

[001114] В некоторых вариантах осуществления после переноса в организм первого субъекта неактивированная Т-клетка или сконструированная Т-клетка демонстрирует один или большее количество ответов, выбранных из группы, состоящей из (a) ответа Т-клеток, (b) ответа NK-клеток и (c) ответа макрофагов, которые снижены по сравнению с клеткой дикого типа после переноса в организм второго субъекта. В некоторых вариантах осуществления первый субъект и второй субъект представляют собой разных субъектов. В некоторых вариантах осуществления ответ макрофагов представляет собой поглощение.

[001115] В некоторых вариантах осуществления после переноса в организм субъекта неактивированная Т-клетка или сконструированная Т-клетка демонстрирует одно или более, выбранное из группы, состоящей из (a) снижения активации TH1 в организме субъекта, (b) снижение уничтожения NK-клетками в организме субъекта и (c) и снижение уничтожения цельными МКПК в организме субъекта по сравнению с клеткой дикого типа после переноса в организм субъекта.

[001116] В некоторых вариантах осуществления после переноса в организм субъекта неактивированная Т-клетка или сконструированная Т-клетка демонстрирует одно или более, выбранное из группы, состоящей из (a) уменьшения количества донор-специфических антител в организме субъекта, (b) уменьшение количества антител IgM или IgG в организме субъекта и (c) снижение комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) в организме субъекта по сравнению с клеткой дикого типа после переноса в организм субъекта.

[001117] В некоторых вариантах осуществления неактивированную Т-клетку или сконструированную Т-клетку трансдуцируют лентивирусным вектором, содержащим CD8-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор несет ген, кодирующий CAR и/или CD47.

[001118] В некоторых вариантах осуществления после переноса в организм первого субъекта описанная в данном документе клетка демонстрирует один или более ответов, выбранных из группы, состоящей из (a) ответа Т-клеток, (b) ответа NK-клеток и (c) ответа макрофагов, которые снижены по сравнению с клеткой дикого типа после переноса в организм второго субъекта. В некоторых вариантах осуществления первый субъект и второй субъект представляют собой разных субъектов. В некоторых вариантах осуществления ответ макрофагов представляет собой поглощение.

[001119] В некоторых вариантах осуществления после переноса в организм субъекта описанная в данном документе клетка демонстрирует одно или большее количество, выбранные из группы, состоящей из (a) снижения активации TH1 в организме субъекта, (b) снижения уничтожения NK-клетками в организме субъекта и (c) снижения уничтожения цельными МКПК в организме субъекта по сравнению с клеткой дикого типа после переноса в организм субъекта.

[001120] В некоторых вариантах осуществления после переноса в организм субъекта описанная в данном документе клетка демонстрирует одно или большее количество, выбранные из группы, состоящей из (a) уменьшения количества донор-специфических антител в организме субъекта, (b) уменьшения количества антител IgM или IgG в организме субъекта и (c) снижения комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) в организме субъекта по сравнению с клеткой дикого типа после переноса в организм субъекта.

[001121] В некоторых вариантах осуществления клетка, описанная в данном документе, трансдуцируется лентивирусным вектором, содержащим CD8-связывающий агент, внутри организма субъекта. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор несет ген, кодирующий CAR и/или CD47.

[001122] В некоторых вариантах осуществления ген, кодирующий CAR и/или CD47, вводят в клетки с использованием вектора генной терапии или транспозазной системы, выбранной из группы, состоящей из условных или индуцируемых транспозаз, условных или индуцируемых транспозонов PiggyBac, условных или индуцируемых транспозонов Sleeping Beauty (SB11), условных или индуцируемых транспозонов Mos1 и условных или индуцируемых транспозонов Tol2. В некоторых вариантах осуществления вектор генной терапии представляет собой ретровирус или фузосому.

[001123] В настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие популяцию неактивированных Т-клеток и/или сконструированных Т-клеток по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемые добавку, носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

[001124] В настоящем документе предложены способы, включающие введения субъекту композиции, содержащей популяцию неактивированных Т-клеток и/или сконструированных Т-клеток по настоящему изобретению, или одной или большего количество фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

[001125] В некоторых вариантах осуществления субъекту не назначают

активирующее Т-клетки лечение до, после и/или одновременно с введением композиции. В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетки лечение включает лимфодеплецию.

[001126] В настоящем документе предложены способы лечения субъекта, имеющего рак, включающие введение субъекту композиции, содержащей популяцию неактивированных Т-клеток и/или сконструированных Т-клеток по настоящему изобретению, или одной или большего количества фармацевтических композиций по настоящему изобретению, при этом субъекту не назначают активирующее Т-клетки лечение до, после и/или одновременно с введением композиции. В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетки лечение включает лимфодеплецию.

[001127] В настоящем документе предложены способы размножения Т-клеток, способных распознавать и уничтожать опухолевые клетки у нуждающегося в этом субъекта, в организме субъекта, включающие введение субъекту композиции, содержащей популяцию неактивированных Т-клеток и/или сконструированных Т-клеток по настоящему изобретению, или одной или большего количества фармацевтических композиций по настоящему изобретению, при этом субъекту не назначают активирующее Т-клетки лечение до, после и/или одновременно с введением композиции. В некоторых вариантах осуществления активирующее Т-клетки лечение включает лимфодеплецию.

[001128] В настоящем документе предложены схемы введения для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение фармацевтической композиции, содержащей популяцию неактивированных Т-клеток и/или сконструированных Т-клеток по настоящему изобретению, или одной или большего количества фармацевтических композиций по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемые добавку, носитель, разбавитель или вспомогательное вещество, при этом фармацевтическую композицию вводят в количестве около 1-3 терапевтически эффективных доз. В данном документе предложены схемы дозирования для лечения состояния, заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение фармацевтической композиции, содержащей популяцию клеток по данному изобретению или одну или более фармацевтических композиций по данному изобретению, и фармацевтически приемлемую добавку, носитель, разбавитель или ексципиент, при этом фармацевтическую композицию вводят примерно в 1-3 клинически эффективных дозах.

[001129] После изменения наличие экспрессии любой молекулы, описанной в настоящем документе, можно анализировать, используя известные методики, такие как вестерн-блот, анализ ИФА, анализ FACS, другие иммуноанализы, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) и т. п.

Создание индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

[001130] В технологии предложены способы получения гипоиммуногенных плюрипотентных клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает создание плюрипотентных стволовых клеток. Создание мышиных и человеческих плюрипотентных стволовых клеток (обычно называемых iPSC; miPSC в случае мышиных

клеток или hiPSC в случае человеческих клеток) в общем случае известно в данной области техники. Как понятно специалистам в данной области техники, существует множество разных способов создания iPSC. Первоначальную индукцию проводили из эмбриональных или взрослых фибробластов мышей, используя вирусное внесение четырех факторов транскрипции: Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4; см. Takahashi and Yamanaka Cell 126:663-676 (2006), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, в частности, в отношении описанных в ней методик. С тех пор был разработан ряд методов; смотрите обзор в Seki et al, World J. Stem Cells 7(1): 116-125 (2015), и Lakshmipathy and Vermuri, editors, Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013, содержание которых явным образом в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки, в частности, в отношении методов создания hiPSC (смотрите, например, главу 3 последней ссылки).

[001131] В общем случае iPSC создают посредством временной экспрессии одного или большего количества перепрограммирующих факторов в клетке-хозяине, обычно вносимых с помощью эписомальных векторов. В этих условиях происходит индукция небольшого количества клеток, которые становятся iPSC (в целом, эффективность этого этапа является низкой, поскольку на нем не используют селекционные маркеры). Как только клетки «перепрограммированы» и становятся плюрипотентными, они утрачивают эписомальный(-е) вектор(-ы) и вырабатывают факторы, используя эндогенные гены.

[001132] Как также понятно специалистам в данной области техники, количество перепрограммирующих факторов, которые можно использовать или которые используют, может варьироваться. Обычно при использовании меньшего количества перепрограммирующих факторов снижается эффективность трансформации клеток в плюрипотентное состояние, а также «плюрипотентность», например, меньшее количество перепрограммирующих факторов может приводить к тому, что клетки не становятся полностью плюрипотентными и могут быть способны дифференцироваться только в меньшее количество типов клеток.

[001133] В некоторых вариантах осуществления используют один перепрограммирующий фактор: OCT4. В других вариантах осуществления используют два перепрограммирующих фактора, OCT4 и KLF4. В других вариантах осуществления используют три перепрограммирующих фактора, OCT4, KLF4 и SOX2. В других вариантах осуществления используют четыре перепрограммирующих фактора, OCT4, KLF4, SOX2 и c-Myc. В других вариантах осуществления можно использовать 5, 6 или 7 перепрограммирующих факторов, выбранных из SOKMNLT; SOX2, OCT4 (POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28 и Т-антигена SV40L. В общем случае гены этих перепрограммирующих факторов предоставлены в эписомальных векторах, таких как известные в данной области техники и коммерчески доступные.

[001134] В общем случае, как известно в данной области техники, iPSC получают из неплюрипотентных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, клетки крови, фибробласты и т. д., посредством временной экспрессии перепрограммирующих

факторов, как описано в данном документе.

Анализы фенотипов гипоиммуногенности и сохранения плюрипотентности

[001135] После получения гипоиммуногенных клеток их можно анализировать в отношении их гипоиммуногенности и/или сохранения плюрипотентности, как описано в WO2016183041 и WO2018132783.

[001136] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенность анализируют, используя ряд методик, проиллюстрированных на Фиг. 13 и Фиг. 15 в WO2018132783. Эти методики включают в себя трансплантацию аллогенным хозяевам и наблюдение за ростом гипоиммуногенных плюрипотентных клеток (*например*, тератом), которые ускользнули от иммунной системы хозяина. В некоторых случаях производные гипоиммуногенных плюрипотентных клеток трансдуцируют для экспрессии люциферазы, после чего их можно исследовать, используя биолюминесцентную визуализацию. Аналогично исследуют Т-клеточный и/или В-клеточный ответ животного-хозяина на такие клетки, чтобы подтвердить, что клетки не вызывают иммунную реакцию у животного-хозяина. Т-клеточные ответы можно оценивать методами Elispot, ELISA, FACS, ПЦР или масс-цитометрии (CYTOF). В-клеточные ответы или ответы антител оценивают, используя FACS или Luminex. В дополнительном или альтернативном варианте клетки можно анализировать в отношении их способности избегать ответов врожденного иммунитета, *например*, уничтожения NK-клетками, как в целом проиллюстрировано на Фиг. 14 и 15 в WO2018132783.

[001137] В некоторых вариантах осуществления иммуногенность клеток оценивают, используя иммуноанализы Т-клеток, такие как анализы пролиферации Т-клеток, анализы активации Т-клеток и анализы уничтожения Т-клетками, известные специалистам в данной области техники. В некоторых случаях анализ пролиферации Т-клеток включает предварительную обработку клеток гамма-интерфероном, и совместное культивирование клеток с мечеными Т-клетками, и анализ присутствия популяции Т-клеток (или популяции пролиферирующих Т-клеток) через предварительно выбранный промежуток времени. В некоторых случаях анализ активации Т-клеток включает совместное культивирование Т-клеток с описанными в настоящем документе клетками и определение уровней экспрессии маркеров активации Т-клеток в Т-клетках.

[001138] Для оценки иммуногенности описанных в настоящем документе клеток можно проводить анализы in vivo. В некоторых вариантах осуществления выживаемость и иммуногенность гипоиммуногенных клеток определяют, используя модель аллогенных гуманизированных мышей с ослабленным иммунитетом. В некоторых случаях гипоиммуногенные плюрипотентные стволовые клетки трансплантируют аллогенным гуманизированным мышам NSG-SGM3 и анализируют в отношении отторжения клеток, выживаемости клеток и образования тератом. В некоторых случаях привитые гипоиммуногенные плюрипотентные стволовые клетки или их дифференцированные клетки демонстрируют долгосрочную выживаемость в мышиной модели.

[001139] 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.

[001140] Аналогично, сохранение плюрипотентности исследуют рядом способов. В одном варианте осуществления плюрипотентность оценивают по экспрессии определенных факторов, специфичных для плюрипотентности, как в целом описано в настоящем документе и проиллюстрировано на Фиг. 29 в WO2018132783. В дополнительном или альтернативном варианте плюрипотентные клетки дифференцируют в один или большее количество типов клеток, что свидетельствует о плюрипотентности.

[001141] Как будет понятно специалистам в данной области техники, успешное снижение функции ГКГС I (HLA I, когда клетки получены из человеческих клеток) в плюрипотентных клетках можно определять, используя методики, известные в данной области техники и описанные ниже; например, методику FACS с использованием меченых антител, которые связывают комплекс HLA; например, используя коммерчески доступные антитела к HLA-A, HLA-B и HLA-C, которые связываются с альфа-цепью антигена HLA класса I главного комплекса гистосовместимости человека.

[001142] 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.

[001143] Успешное снижение функции ГКГС II (HLA II, когда клетки получены из человеческих клеток) в плюрипотентных клетках или их производных можно определять, используя методики, известные в данной области техники, такие как вестерн-блоттинг с использованием антител к белку, методики FACS, методики ОТ-ПЦР и т. д.

[001144] Кроме того, клетки можно исследовать, чтобы подтвердить, что комплекс HLA II не экспрессируется на клеточной поверхности. Опять же, этот анализ проводят так, как известно в данной области техники (см., например, Фиг. 21 в WO2018132783), и в общем случае проводят, используя вестерн-блоттинг или анализ FACS на основе коммерческих антител, которые связываются с HLA-антигенами человека класса II, HLA-DR, DP и большинством DQ.

[001145] В дополнение к снижению одной или более молекул HLA I и II (или ГКГС I и II), гипоиммуногенные клетки по этой технологии имеют сниженную восприимчивость к фагоцитозу макрофагами и уничтожению NK-клетками. Образующиеся гипоиммуногенные клетки «избегают» иммунных макрофагов и врожденных путей из-за снижения или отсутствия комплекса TCR и экспрессии одного или более трансгенов толерогенных факторов.

Экзогенные полинуклеотиды

[001146] В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе гипоиммуногенные клетки в общем случае модифицируют для содержания

одного или более экзогенных полинуклеотидов, вставленных в один или более геномных локусов гипоиммуногенной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид кодирует представляющий интерес белок, *например*, химерный антигенный рецептор. Любой подходящий способ можно использовать для вставки экзогенного полинуклеотида в геномный локус гипоиммуногенной клетки, включая описанные в настоящем документе методы генного редактирования (*например*, систему CRISPR/Cas).

[001147] Экзогенный полинуклеотид можно вставлять в любые подходящие геномные локусы гипоиммуногенной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид вставлен в безопасный или целевой локус, как описано в настоящем документе. Подходящие безопасные и целевые локусы включают в себя, помимо прочего, ген CCR5, ген CXCR4, ген PPP1R12C (также известный как AAVS1), ген альбумина, локус SHS231, ген CLYBL, ген Rosa (*например*, ROSA26), ген F3 (также известный как CD142), ген MICA, ген MICB, ген LRP1 (также известный как CD91), ген HMGB1, ген ABO, ген RHD, ген FUT1, ген PDGFRa, ген OLIG2, ген GFAP и ген KDM5D (также известный как HY). В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид вставлен в область интрона, экзона или кодирующей последовательности в безопасном или целевом локусе гена. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид вставлен в эндогенный ген, при этом вставка приводит к сайленсингу или снижению экспрессии эндогенного гена. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вставлен в локус гена B2M, CIITA, TRAC, TRB, PD-1 или CTLA-4. Типовые геномные локусы для вставки экзогенного полинуклеотида приведены в таблицах 16 и 17.

Таблица 16. Типовые геномные локусы для вставки экзогенных полинуклеотидов

Номер	вид	название	Ensembl ID	Целевая область для расщепления	Также известен как
1	человек	B2M	ENSG00000166710	CDS	
2	человек	CIITA	ENSG00000179583	CDS	
3	человек	TRAC	ENSG00000277734	CDS	
4	человек	PPP1R12C	ENSG00000125503	Интрон 1 и 2	AAVS1
5	человек	CLYBL	ENSG00000125246	Интрон 2	
6	человек	CCR5	ENSG00000160791	Экзоны 1-3, интроны 1-2 и CDS	
7	человек	THUMPD3-AS1	ENSG00000206573	Интрон 1	ROSA26

8	человек	Ch- 4:58,976,613		500 п. о. окно	SHS231
9	человек	F3	ENSG00000117525	CDS	CD142
10	человек	MICA	ENSG00000204520	CDS	
11	человек	MICB	ENSG00000204516	CDS	
12	человек	LRP1	ENSG00000123384	CDS	
13	человек	HMGB1	ENSG00000189403	CDS	
14	человек	ABO	ENSG00000175164	CDS	
15	человек	RHD	ENSG00000187010	CDS	
16	человек	FUT1	ENSG00000174951	CDS	
17	человек	KDM5D	ENSG00000012817	CDS	HY

Таблица 17. Неограничивающие примеры направляющих РНК Cas9

Ген	SEQ ID NO:	гидовая последовательность	PAM	Целевой сайт	положение разреза нРНК
ABO	1	UCUCUCCAUGUGCAGUAGGA	AGG	Экзон 7	chr9:133,257,541
FUT1	2	CUGGAUGUCGGAGGAGUACG	CGG	Экзон 4	chr19:48,750,822
OB	3	GUCUCCGGAAACUCGAGGUG	AGG	Экзон 2	chr1:25,284,622
F3 (CD142)	4	ACAGUGUAGACUUGAUUGAC	GGG	Экзон 2	chr1:94,540,281
B2M	5	CGUGAGUAAACCUGAAUCUU	TGG	Экзон 2	chr15:44,715,434
CIITA	6	GAUAUUGGCAUAAGCCUCCC	TGG	Экзон 3	chr16:10,895,747
TRAC	7	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	CGG	Экзон 1	chr14:22,5547,533

[001148] В случае направляющих Cas9 спейсерная последовательность для всех направляющих Cas9 приведена в таблице 18 с описанием, что 20 нт последовательность соответствует уникальной гидовой последовательности и может представлять собой любую из описанных в данном документе, включая, например, перечисленные в таблице 18.

Таблица 18. Направляющие РНК Cas9

Описание	SEQ ID NO:	Последовательность
20 нт направляющая последовательность*	8	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
12 нт последовательность повтора crРНК	9	GUUUUAGAGCUA

4 нт последовательность тетрапетли	10	GAAA
64 нт последовательность tracrРНК	11	UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU
Типовая полная последовательность	12	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU

[001149] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка, которая содержит экзогенный полинуклеотид, получена из гипоиммуногенной индуцированной плюрипотентной клетки (HIP), например, как описано в настоящем документе. Такие гипоиммуногенные клетки включают, например, кардиальные клетки, нейральные клетки, церебральные эндотелиальные клетки, дофаминергические нейроны, глиальные клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, островковые клетки поджелудочной железы (бета-клетки), клетки пигментного эпителия сетчатки, NK-клетки и Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка, которая включает экзогенный полинуклеотид, представляет собой бета-клетку, Т-клетку (*например*, первичную Т-клетку) или глиальную клетку.

[001150] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид кодирует экзогенный полипептид CD47 (например, человеческий полипептид CD47) и при этом экзогенный полипептид вставлен в безопасные или целевой генный локус или безопасный или целевой сайт, как описано в данном документе, или в геномный локус, который приводит к сайленсингу или снижению экспрессии эндогенного гена. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вставлен в генный локус B2M, CIITA, TRAC, TRB, PD1 или CTLA4.

[001151] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка, которая содержит экзогенный полинуклеотид, представляет собой первичную Т-клетку или Т-клетку, полученную из гипоиммуногенной плюрипотентной клетки (*например*, гипоиммуногенной iPSC). В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид представляет собой химерный антигенный рецептор (*например*, любой из CAR, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором для экспрессии экзогенного полинуклеотида в гипоиммуногенной клетке.

Фармацевтически приемлемые носители

[001152] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, дополнительно включает в себя фармацевтически приемлемый носитель. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и

концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (*например*, комплексы Zn-белок); соли, такие как хлорид натрия; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (TWEEN™), полоксамеры (PLURONICS™) или полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый буфер (*например*, нейтральный солевой буфер или фосфатно-солевой буфер).

[001153] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или большее количество базовых растворов электролитов, выбранных из группы, состоящей из лактата CryoStor®, раствора Рингера, PlasmaLyte-A™, среды Дульбекко в модификации Искова, Normosol-R™, Veen-D™, Polysal® и сбалансированного солевого раствора Хенкса (не содержащего феноловый красный). Такие базовые растворы наиболее близко соответствуют составу внеклеточных физиологических жидкостей млекопитающих.

[001154] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или большее количество криозащитных агентов, выбранных из группы, состоящей из арабиногалактана, глицерина, поливинилпирролидона (ПВП), декстрозы, декстрана, трегалозы, сахарозы, рафинозы, гидроксиэтилкрахмала (HES), пропиленгликоля, сывороточного альбумина человека (HSA) и диметилсульфоксида (ДМСО). В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый буфер представляет собой нейтральный солевой буфер или фосфатно-солевой буфер. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, предложенная в настоящем документе, содержит одно или большее количество из CryoStor® CSB, Plasma-Lyte-A™, HSA, ДМСО и трегалозы.

[001155] CryoStor® представляет собой внутриклеточный оптимизированный раствор, содержащий осмотические/онкотические средства, поглотители свободных радикалов и источники энергии для минимизации апоптоза, минимизации ишемии/реперфузионного поражения и максимизации восстановления после оттаивания наибольшего количества жизнеспособных, функциональных клеток. CryoStor® не содержит сыворотки и белков и является неиммуногенным. CryoStor® изготавливают в соответствии с принципами cGMP из сырьевых материалов класса USP или выше.

CryoStor® представляет собой семейство растворов, предварительно приготовленных с 0%, 2%, 5% или 10% ДМСО. CryoStor® CSB представляет собой версию CryoStor®, не содержащую ДМСО. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит базовый раствор CryoStor® CSB в концентрации около 0-100%, 5-95%, 10-90%, 15-85%, 20-80%, 30-80%, 40-80%, 50-80%, 60-80%, 70-80%, 25-75%, 30-70%, 35-65%, 40-60% или 45-55% масс./масс. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит базовый раствор CryoStor® CSB в концентрации около 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% масс./масс.

[001156] PlasmaLyte-A™ представляет собой неполимерный плазмозаменитель, который содержит незаменимые соли и питательные вещества, аналогичные обнаруживаемым в культуральной среде, но не содержит дополнительные компоненты, обнаруживаемые в культуральной среде ткани, которые не одобрены для инфузии человеку, например, феноловый красный, или недоступны в классе U.S.P. PlasmaLyte-A™ содержит около 140 мгЭкв/л натрия (Na), около 5 мгЭкв/л калия (K), около 3 мгЭкв/л магния (Mg), около 98 мгЭкв/л хлорида (Cl), около 27 мгЭкв/л ацетата и около 23 мгЭкв/л глюконата. (PlasmaLyte-A™коммерчески доступен от компании Baxter, Hyland Division, г. Глендейл, штат Калифорния, № продукта 2B2543). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит базовый раствор PlasmaLyte-A™ в концентрации около 0-100%, 5-95%, 10-90%, 15-85%, 15-80%, 15-75%, 15-70%, 15-65%, 15-60%, 15-55%, 15-50%, 15-45%, 15-40%, 15-35%, 15-30%, 15-25%, 20-80%, 20-75%, 20-70%, 20-65%, 20-60%, 20-55%, 20-50%, 20-45%, 20-40%, 20-35%, 20-30%, 25-75%, 30-70%, 35-65%, 40-60% или 45-55% масс./масс. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит базовый раствор PlasmaLyte-A™ в концентрации около 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% масс./масс.

[001157] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит сывороточный альбумин человека (HSA) в концентрации около 0-10%, 0,3-9,3%, 0,3-8,3%, 0,3-7,3%, 0,3-6,3%, 0,3-5,3%, 0,3-4,3%, 0,3-3,3%, 0,3-2,3%, 0,3-1,3%, 0,6-8,3%, 0,9-7,3%, 1,2-6,3%, 1,5-5,3%, 1,8-4,3% или 2,1-3,3% масс./об. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HSA в концентрации около 0%, 0,3%, 0,6%, 0,9%, 1,2%, 1,5%, 1,8%, 2,1%, 2,4%, 2,7%, 3,0%, 3,3%, 3,6%, 3,9%, 4,3%, 4,6%, 4,9%, 5,3%, 5,6%, 5,9%, 6,3%, 6,6%, 6,9%, 7,3%, 7,6%, 7,9%, 8,3%, 8,6%, 8,9%, 9,3%, 9,6%, 9,9% или 10% масс./об.

[001158] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации около 0-10%, 0,5-9,5%, 1-9%, 1,5-8,5%, 2-8%, 3-8%, 4-8%, 5-8%, 6-8%, 7-8%, 2,5-7,5%, 3-7%, 3,5-6,5%, 4-6% или 4,5-5,5% об./об. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HSA в концентрации около 0%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1,0%,1,25%, 1,5%, 1,75%, 2,0%, 2,25%, 2,5%, 2,75%, 3,0%, 3,25%, 3,5%, 3,75%, 4,0%, 4,25%, 4,5%, 4,75%, 5,0%, 5,25%,

5,5%, 5,75%, 6,0%, 6,25%, 6,5%, 6,75%, 7,0%, 7,25%, 7,5%, 7,75%, 8,0%, 8,25%, 8,5%, 8,75%, 9,0%, 9,25%, 9,5%, 9,75% или 10,0% об./об.

[001159] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит трегалозу в концентрации около 0-500 мМ, 50-450 мМ, 100-400 мМ, 150-350 мМ или 200-300 мМ. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит трегалозу в концентрации около 0 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 125 мМ, 150 мМ, 175 мМ, 200 мМ, 225 мМ, 250 мМ, 275 мМ, 300 мМ, 325 мМ, 350 мМ, 375 мМ, 400 мМ, 425 мМ, 450 мМ, 475 мМ или 500 мМ.

[001160] Типичные компоненты фармацевтических композиций представлены в таблице 34.

Таблица 34. Типичные компоненты фармацевтических композиций.

Состав	Базовый раствор	с[ДМСО]	Дополнительный с[HSA]*	с[трегалоза]
A	75% CroStor® CSB+25% PlasmaLyte A™ + 1,2% HSA	7,5%	0,3%	
B		3,75%	0,3%	
C			5,3%	
D			0,3%	250 мМ
E	100% PlasmaLyte A™ + 1,2% HSA	7,5%	0,3%	
F		7,5%	5,3%	
G		7,5%	5,3%	250 мМ

* Дополнительный HSA в дополнение к PlasmaLyte.

[001161] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит гипоиммуногенные клетки, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель, содержащий 31,25% (об./об.) Plasma-Lyte A, 31,25% (об./об.) 5% декстрозы/0,45% хлорида натрия, 10% декстрана 40 (LMD)/5% декстрозы, 20% (об./об.) 25% сывороточного альбумина человека (HSA) и 7,5% (об./об.) диметилсульфоксида (ДМСО).

Составы и схемы введения

[001162] Любое терапевтически эффективное количество клеток, описанных в настоящем документе, можно включить в фармацевтическую композицию в зависимости от показания, которое лечится. Неограничивающие примеры клеток включают в себя первичные Т-клетки, Т-клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, и другие клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере около 1×10^2, 5×10^2, 1×10^3, 5×10^3, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8,

1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10} или 5×10^{10} клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит не более чем около 1×10^2, 5×10^2, 1×10^3, 5×10^3, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10} или 5×10^{10} клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит не более чем около $6{,}0\times10^8$ клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит не более чем около $8{,}0\times10^8$ клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере около 1×10^2-5×10^2, 5×10^2-1×10^3, 1×10^3-5×10^3, 5×10^3-1×10^4, 1×10^4-5×10^4, 5×10^4-1×10^5, 1×10^5-5×10^5, 5×10^5-1×10^6, 1×10^6-5×10^6, 5×10^6-1×10^7, 1×10^7-5×10^7, 5×10^7-1×10^8, 1×10^8-5×10^8, 5×10^8-1×10^9, 1×10^9-5×10^9, 5×10^9-1×10^{10} или 1×10^{10}-5×10^{10} клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит примерно от $1{,}0\times10^6$ до примерно $2{,}5\times10^8$ клеток. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от около $2{,}0\times10^6$ до около $2{,}0\times10^8$ клеток, таких как, помимо прочего, первичные Т-клетки, Т-клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

[001163] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет объем по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет объем не более чем около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет объем около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет объем около 1-50 мл, 50-100 мл, 100-150 мл, 150-200 мл, 200-250 мл, 250-300 мл, 300-350 мл, 350-400 мл, 400-450 мл или 450-500 мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет объем около 1-50 мл, 50-100 мл, 100-150 мл, 150-200 мл, 200-250 мл, 250-300 мл, 300-350 мл, 350-400 мл, 400-450 мл или 450-500 мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет объем около 1-10 мл, 10-20 мл, 20-30 мл, 30-40 мл, 40-50 мл, 50-60 мл, 60-70 мл, 70-80 мл, 70-80 мл, 80-90 мл или 90-100 мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет объем, который варьируется от около 5 мл до около 80 мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет объем, который варьируется от около 10 мл до около 70 мл. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет объем, который варьируется от около 10 мл до около 50 мл.

[001164] Конкретные количество/схема введения будут варьироваться в зависимости от массы тела, пола, возраста и состояния здоровья индивидуума; состава, биохимической природы, биоактивности, биодоступности и побочных эффектов клеток, а также количества и идентичности клеток в полной терапевтической схеме.

[001165] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза фармацевтической композиции содержит от около $1,0\times10^5$ до около $2,5\times10^8$ клеток в объеме от около 10 мл до около 50 мл, и фармацевтическую композицию вводят в виде однократной терапевтически эффективной дозы или клинически эффективной дозы. В некоторых случаях терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза содержит от около $1,0\times10^5$ до около $2,5\times10^8$ первичных Т-клеток, описанных в настоящем документе, в объеме от около 10 мл до 50 мл. В некоторых случаях терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза содержит от около $1,0\times10^5$ до около $2,5\times10^8$ первичных Т-клеток, которые были описаны выше, в объеме от около 10 мл до 50 мл. В различных случаях терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза содержит от около $1,0\times10^5$ до около $2,5\times10^8$ описанных в настоящем документе Т-клеток, дифференцированных из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в объеме от около 10 мл до 50 мл. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза составляет 1,0×105, 1,1×105, 1,2×105, 1,3×105, 1,4×105, 1,5×105, 1,6×105, 1,7×105, 1,8×105, 1,9. x 105, 2,0 x 105, 2,1 x 105, 2,2 x 105, 2,3 x 105, 2,4 x 105, 2,5 x 105, 1,0 x 106, 1,1 x 106, 1,2 x 106, 1,3 x 106, 1,4 x 106, 1,5 x 106, 1,6 x 106, 1,7 x 106, 1,8 x 106, 1,9 x 106, 2,0 x 106, 2,1 x 106, 2,2 x 106, 2,3 x 106, 2,4 x 106, 2,5 x 106, 1,0 x 107, 1,1 x 107, 1,2 x 107, 1,3 x 107, 1,4 x 107, 1,5 x 107, 1,6 x 107, 1,7 x 107, 1,8 x 107, 1,9 x 107, 2,0 x 107, 2,1 x 107, 2,2 x 107, 2,3 x 107, 2,4 x 107, 2,5 x 107, 1,0 x 108, 1,1 x 108, 1,2 x 108, 1,3 x 108, 1,4 x 108, 1,5 x 108, 1,6 x 108, 1,7 x 108, 1,8 x 108, 1,9 x 108, 2,0 x 108, 2,1×108, 2,2×108, 2,3×108, 2,4×108 или 2,5×108 Т-клеток, дифференцированных из гипоиммуногенно-индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, описанных в данном документе, в объеме примерно от 10 мл до 50 мл. В других случаях терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза находится в диапазоне, который составляет меньше чем от около $1,0\times10^5$ до около $2,5\times10^8$ Т-клеток, включая первичные Т-клетки или Т-клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В других случаях терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза находится в диапазоне, который составляет больше чем от около $1,0\times10^5$ до около $2,5\times10^8$ Т-клеток, включая первичные Т-клетки и Т-клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

[001166] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде однократной терапевтически эффективной дозы или клинически эффективной дозы от около $1,0\times10^5$ до около $1,0\times10^7$ клеток (таких как первичные Т-клетки и Т-клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) на кг массы тела для субъектов с массой тела 50 кг или менее. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде однократной терапевтически эффективной дозы или клинически эффективной дозы

от около $0,5\times10^5$ до около $1,0\times10^7$, от около $1,0\times10^5$ до около $1,0\times10^7$, от около $1,0\times10^5$ до около $1,0\times10^7$, от около $5,0\times10^5$ до около 1×10^7, от около $1,0\times10^6$ до около 1×10^7, от около $5,0\times10^6$ до около $1,0\times10^7$, от около $1,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$, от около $1,0\times10^5$ до около $1,0\times10^6$, от около $1,0\times10^5$ до около $5,0\times10^5$, от около $1,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$, от около $2,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$, от около $3,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$, от около $4,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$, от около $5,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$, от около $6,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$, от около $7,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$, от около $8,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$ или от около $9,0\times10^5$ до около $5,0\times10^6$ клеток на кг массы тела для субъектов с массой тела 50 кг или менее. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза составляет от около $0,2\times10^6$ до около $5,0\times10^6$ клеток на кг массы тела для субъектов с массой тела 50 кг или менее. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза находится в диапазоне ниже, чем примерно от $0,2\times10^6$ до примерно $5,0\times10^6$ клеток на кг массы тела для субъектов массой 50 кг или меньше. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза составляет $0,5\times10^5$, $0,6\times10^5$, $0,7\times10^5$, $0,8\times10^5$, $0,9\times10^5$, $1,0\times10^5$, $1,1\times10^5$, $1,2\times10^5$, $1,3\times10^5$, $1,4\times10^5$, $1,5\times10^5$, $1,6\times10^5$, $1,7\times10^5$, $1,8\times10^5$, $1,9\times10^5$, $2,0\times10^5$, $2,1\times10^5$, $2,2\times10^5$, $2,3\times10^5$, $2,4\times10^5$, $2,5\times10^5$, $2,6\times10^5$, $2,7\times10^5$, $2,8\times10^5$, $2,9\times10^5$, $3,0\times10^5$, $3,1\times10^5$, $3,2\times10^5$, $3,3\times10^5$, $3,4\times10^5$, $3,5\times10^5$, $3,6\times10^5$, $3,7\times10^5$, $3,8\times10^5$, $3,9\times10^5$, $4,0\times10^5$, $4,1\times10^5$, $4,2\times10^5$, $4,3\times10^5$, $4,4\times10^5$, $4,5\times10^5$, $4,6\times10^5$, $4,7\times10^5$, $4,8\times10^5$, $4,9\times10^5$, $5,0\times10^5$, $0,5\times10^6$, $0,6\times10^6$, $0,7\times10^6$, $0,8\times10^6$, $0,9\times10^6$, $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, $2,0\times10^6$, $2,1\times10^6$, $2,2\times10^6$, $2,3\times10^6$, $2,4\times10^6$, $2,5\times10^6$, $2,6\times10^6$, $2,7\times10^6$, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, $3,0\times10^6$, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, $4,0\times10^6$, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$, $4,5\times10^6$, $4,6\times10^6$, $4,7\times10^6$, $4,8\times10^6$, $4,9\times10^6$, $5,0\times10^6$, $5,1\times10^6$, $5,2\times10^6$, $5,3\times10^6$, $5,4\times10^6$, $5,5\times10^6$, $5,6\times10^6$, $5,7\times10^6$, $5,8\times10^6$, $5,9\times10^6$, $6,0\times10^6$, $6,1\times10^6$, $6,2\times10^6$, $6,3\times10^6$, $6,4\times10^6$, $6,5\times10^6$, $6,6\times10^6$, $6,7\times10^6$, $6,8\times10^6$, $6,9\times10^6$, $7,0\times10^6$, $7,1\times10^6$, $7,2\times10^6$, $7,3\times10^6$, $7,4\times10^6$, $7,5\times10^6$, $7,6\times10^6$, $7,7\times10^6$, $7,8\times10^6$, $7,9\times10^6$, $8,0\times10^6$, $8,1\times10^6$, $8,2\times10^6$, $8,3\times10^6$, $8,4\times10^6$, $8,5\times10^6$, $8,6\times10^6$, $8,7\times10^6$, $8,8\times10^6$, $8,9\times10^6$, $9,0\times10^6$, $9,1\times10^6$, $9,2\times10^6$, $9,3\times10^6$, $9,4\times10^6$, $9,5\times10^6$, $9,6\times10^6$, $9,7\times10^6$, $9,8\times10^6$, $9,9\times10^6$, $0,5\times10^7$, $0,6\times10^7$, $0,7\times10^7$, $0,8\times10^7$, $0,9\times10^7$ или $1,0\times10^7$ клеток на кг массы тела для субъектов с массой тела 50 кг или менее. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза составляет от около $0,2\times10^6$ до около $5,0\times10^6$ клеток на кг массы тела для субъектов с массой тела 50 кг или менее. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза находится в диапазоне примерно от $0,2\times10^6$ до примерно $5,0\times10^6$ клеток на кг массы тела для субъектов массой 50 кг или меньше. В некоторых вариантах осуществления однократная терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза имеет объем от около 10 мл до 50 мл. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективную дозу или клинически эффективную дозу вводят внутривенно.

[001167] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в одной

терапевтически эффективной дозе или клинически эффективной дозе примерно от $1,0\times10^6$ до примерно $5,0\times10^8$ клеток (таких как первичные Т-клетки и Т-клетки, дифференцированные из гипоиммуногенно-индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) субъектам весом более 50 кг. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде однократной терапевтически эффективной дозы или клинически эффективной дозы от около $0,5\times10^6$ до около $1,0\times10^9$, от около $1,0\times10^6$ до около $1,0\times10^9$, от около $1,0\times10^6$ до около $1,0\times10^9$, от около $5,0\times10^6$ до около $1,0\times10^9$, от около $1,0\times10^7$ до около $1,0\times10^9$, от около $5,0\times10^7$ до около $1,0\times10^9$, от около $1,0\times10^6$ до около $5,0\times10^7$, от около $1,0\times10^6$ до около $1,0\times10^7$, от около $1,0\times10^6$ до около $5,0\times10^7$, от около $1,0\times10^7$ до около $5,0\times10^8$, от около $2,0\times10^7$ до около $5,0\times10^8$, от около $3,0\times10^7$ до около $5,0\times10^8$, от около $4,0\times10^7$ до около $5,0\times10^8$, от около $5,0\times10^7$ до около $5,0\times10^8$, от около $6,0\times10^7$ до около $5,0\times10^8$, от около $7,0\times10^7$ до около $5,0\times10^8$, от около $8,0\times10^7$ до около $5,0\times10^8$ или от около $9,0\times10^7$ до около $5,0\times10^8$ клеток на кг массы тела для субъектов с массой тела 50 кг или менее. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза составляет $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, $2,0\times10^6$, $2,1\times10^6$, $2,2\times10^6$, $2,3\times10^6$, $2,4\times10^6$, $2,5\times10^6$, $2,6\times10^6$, $2,7\times10^6$, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, $3,0\times10^6$, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, $4,0\times10^6$, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$, $4,5\times10^6$, $4,6\times10^6$, $4,7\times10^6$, $4,8\times10^6$, $4,9\times10^6$, $5,0\times10^6$, $5,1\times10^6$, $5,2\times10^6$, $5,3\times10^6$, $5,4\times10^6$, $5,5\times10^6$, $5,6\times10^6$, $5,7\times10^6$, $5,8\times10^6$, $5,9\times10^6$, $6,0\times10^6$, $6,1\times10^6$, $6,2\times10^6$, $6,3\times10^6$, $6,4\times10^6$, $6,5\times10^6$, $6,6\times10^6$, $6,7\times10^6$, $6,8\times10^6$, $6,9\times10^6$, $7,0\times10^6$, $7,1\times10^6$, $7,2\times10^6$, $7,3\times10^6$, $7,4\times10^6$, $7,5\times10^6$, $7,6\times10^6$, $7,7\times10^6$, $7,8\times10^6$, $7,9\times10^6$, $8,0\times10^6$, $8,1\times10^6$, $8,2\times10^6$, $8,3\times10^6$, $8,4\times10^6$, $8,5\times10^6$, $8,6\times10^6$, $8,7\times10^6$, $8,8\times10^6$, $8,9\times10^6$, $9,0\times10^6$, $9,1\times10^6$, $9,2\times10^6$, $9,3\times10^6$, $9,4\times10^6$, $9,5\times10^6$, $9,6\times10^6$, $9,7\times10^6$, $9,8\times10^6$, $9,9\times10^6$, $1,0\times10^7$, $1,1\times10^7$, $1,2\times10^7$, $1,3\times10^7$, $1,4\times10^7$, $1,5\times10^7$, $1,6\times10^7$, $1,7\times10^7$, $1,8\times10^7$, $1,9\times10^7$, $2,0\times10^7$, $2,1\times10^7$, $2,2\times10^7$, $2,3\times10^7$, $2,4\times10^7$, $2,5\times10^7$, $2,6\times10^7$, $2,7\times10^7$, $2,8\times10^7$, $2,9\times10^7$, $3,0\times10^7$, $3,1\times10^7$, $3,2\times10^7$, $3,3\times10^7$, $3,4\times10^7$, $3,5\times10^7$, $3,6\times10^7$, $3,7\times10^7$, $3,8\times10^7$, $3,9\times10^7$, $4,0\times10^7$, $4,1\times10^7$, $4,2\times10^7$, $4,3\times10^7$, $4,4\times10^7$, $4,5\times10^7$, $4,6\times10^7$, $4,7\times10^7$, $4,8\times10^7$, $4,9\times10^7$, $5,0\times10^7$, $5,1\times10^7$, $5,2\times10^7$, $5,3\times10^7$, $5,4\times10^7$, $5,5\times10^7$, $5,6\times10^7$, $5,7\times10^7$, $5,8\times10^7$, $5,9\times10^7$, $6,0\times10^7$, $6,1\times10^7$, $6,2\times10^7$, $6,3\times10^7$, $6,4\times10^7$, $6,5\times10^7$, $6,6\times10^7$, $6,7\times10^7$, $6,8\times10^7$, $6,9\times10^7$, $7,0\times10^7$, $7,1\times10^7$, $7,2\times10^7$, $7,3\times10^7$, $7,4\times10^7$, $7,5\times10^7$, $7,6\times10^7$, $7,7\times10^7$, $7,8\times10^7$, $7,9\times10^7$, $8,0\times10^7$, $8,1\times10^7$, $8,2\times10^7$, $8,3\times10^7$, $8,4\times10^7$, $8,5\times10^7$, $8,6\times10^7$, $8,7\times10^7$, $8,8\times10^7$, $8,9\times10^7$, $9,0\times10^7$, $9,1\times10^7$, $9,2\times10^7$, $9,3\times10^7$, $9,4\times10^7$, $9,5\times10^7$, $9,6\times10^7$, $9,7\times10^7$, $9,8\times10^7$, $9,9\times10^7$, $1,0\times10^8$, $1,1\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,3\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,7\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, $2,0\times10^8$, $2,1\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,3\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,7\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, $3,0\times10^8$, $3,1\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,3\times10^8$, $3,4\times10^8$, $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, $4,0\times10^8$, $4,1\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,3\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,7\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$или $5,0\times10^8$ клеток на кг массы тела для субъектов массой 50 кг и менее. В определенных вариантах осуществления клетки вводят в виде однократной терапевтически эффективной дозы или клинически эффективной дозы от около $1,0\times10^7$ до около $2,5\times10^8$ клеток субъектам с

массой тела более 50 кг. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в виде однократной терапевтически эффективной дозы или клинически эффективной дозы в диапазоне, который составляет менее чем от около $1,0\times10^7$ до около $2,5\times10^8$ клеток, субъектам с массой тела более 50 кг. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в виде однократной терапевтически эффективной дозы или клинически эффективной дозы в диапазоне, который составляет более чем от около $1,0\times10^7$ до около $2,5\times10^8$ клеток, субъектам с массой тела более 50 кг. В некоторых вариантах осуществления дозу вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления однократная терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза имеет объем от около 10 мл до 50 мл. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективную дозу или клинически эффективную дозу вводят внутривенно.

[001168] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективную дозу или клинически эффективную дозу вводят внутривенно со скоростью от около 1 до 50 мл в минуту, от 1 до 40 мл в минуту, от 1 до 30 мл в минуту, от 1 до 20 мл в минуту, от 10 до 20 мл в минуту, от 10 до 30 мл в минуту, от 10 до 40 мл в минуту, от 10 до 50 мл в минуту, от 20 до 50 мл в минуту, от 30 до 50 мл в минуту, от 40 до 50 мл в минуту. Во многих вариантах осуществления фармацевтическую композицию хранят в одном или большем количестве инфузионных мешков для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления дозу полностью вводят не более чем за 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут, 30 минут, 35 минут, 40 минут, 45 минут, 50 минут, 55 минут, 60 минут, 70 минут, 80 минут, 90 минут, 120 минут, 150 минут, 180 минут, 240 минут или 300 минут.

[001169] В некоторых вариантах осуществления однократная терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза фармацевтической композиции находится в одном инфузионном мешке. В других вариантах осуществления однократная терапевтически эффективная доза или клинически эффективная доза фармацевтической композиции разделена на 2, 3, 4 или 5 отдельных инфузионных мешков.

[001170] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в настоящем документе, вводят в виде множества доз, например, 2, 3, 4, 5, 6 или более доз, причем это множество доз вместе составляет схему терапевтически эффективной дозы или клинически эффективной дозы. В некоторых вариантах осуществления каждую дозу из множества доз вводят субъекту с интервалом в диапазоне от 1 до 24 часов. В некоторых случаях последующую дозу вводят с интервалом от около 1 часа до около 24 часов (*например*, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или около 24 часов) после начальной или предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления каждую дозу из множества доз вводят субъекту с интервалом в диапазоне от 1 дня до 28 дней. В некоторых случаях последующую дозу вводят с интервалом от около 1 дня до около 28 дней (*например*, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или около 28 дней) после начальной или предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления каждую дозу из множества доз вводят субъекту с интервалом в диапазоне от 1 недели до около 6 недель. В

определенных случаях последующую дозу вводят с интервалом от около 1 недели до около 6 недель (*например*, около 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель) после начальной или предшествующей дозы. В нескольких вариантах осуществления каждую дозу из множества доз вводят субъекту с интервалом в диапазоне от около 1 месяца до около 12 месяцев. В нескольких случаях последующую дозу вводят с интервалом от около 1 месяца до около 12 месяцев (*например*, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев) после начальной или предшествующей дозы.

[001171] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят первую схему введения в первый момент времени, а затем вводят вторую схему введения во второй момент времени. В некоторых вариантах осуществления первая схема введения является такой же, как и вторая схема введения. В других вариантах осуществления первая схема введения отличается от второй схемы введения. В некоторых случаях количество клеток в первой схеме введения и второй схеме введения является одинаковым. В некоторых случаях количество клеток в первой схеме введения и второй схеме введения является разным. В некоторых случаях количество доз в первой схеме введения и второй схеме введения является одинаковым. В некоторых случаях количество доз в первой схеме введения и второй схеме введения является разным.

[001172] В некоторых вариантах осуществления первая схема введения включает в себя гипоиммунные (HIP) Т-клетки или первичные Т-клетки, экспрессирующие первый CAR, а вторая схема введения включает в себя гипоиммунные (HIP) Т-клетки или первичные Т-клетки, экспрессирующие второй CAR, так что первый CAR и второй CAR являются разными. Например, первый CAR и второй CAR связывают разные антигены-мишени. В некоторых случаях первый CAR содержит scFv, который связывается с одним антигеном, а второй CAR содержит scFv, который связывается с другим антигеном. В некоторых вариантах осуществления первая схема введения включает в себя гипоиммунные (HIP) Т-клетки или первичные Т-клетки, экспрессирующие первый CAR, а вторая схема введения включает в себя гипоиммунные (HIP) Т-клетки или первичные Т-клетки, экспрессирующие второй CAR, так что первый CAR и второй CAR являются одинаковыми. Первую схему введения могут вводить субъекту с интервалом по меньшей мере 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 1-3 месяца, 1-6 месяцев, 4-6 месяцев, 3-9 месяцев, 3-12 месяцев или более по отношению ко второй схеме введения. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят множество схем введения в ходе течения заболевания (*например*, рака), и по меньшей мере две из схем введения содержат один и тот же тип гипоиммунных (HIP) Т-клеток или первичных Т-клеток, описанных в настоящем документе. В других вариантах осуществления по меньшей мере две из множества схем введения содержат разные типы гипоиммунных (HIP) Т-клеток или первичных Т-клеток, описанных в настоящем документе.

[001173] В некоторых вариантах осуществления CD19-специфические (CD19) CAR-Т-клетки, описанные в настоящем документе, вводят субъекту в дозе от около

50×10^6 до около 110×10^6 (например, 50×10^6, 51×10^6, 52×10^6, 53×10^6, 54×10^6, 55×10^6, 56×10^6, 57×10^6, 58×10^6, 59×10^6, 60×10^6, 61×10^6, 62×10^6, 63×10^6, 64×10^6, 65×10^6, 66×10^6, 67×10^6, 68×10^6, 69×10^6, 70×10^6, 71×10^6, 72×10^6, 73×10^6, 74×10^6, 75×10^6, 76×10^6, 77×10^6, 78×10^6, 79×10^6, 80×10^6, 81×10^6, 82×10^6, 83×10^6, 84×10^6, 85×10^6, 86×10^6, 87×10^6, 88×10^6, 89×10^6, 90×10^6, 91×10^6, 92×10^6, 93×10^6, 94×10^6, 95×10^6, 96×10^6, 97×10^6, 98×10^6, 99×10^6, 100×10^6, 101×10^6, 102×10^6, 103×10^6, 104×10^6, 105×10^6, 106×10^6, 107×10^6, 108×10^6, 109×10^6 или 110×10^6) жизнеспособных CD19-специфических CAR-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-Т-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособные CD19-специфические CAR-Т-клетки включают в себя CD19-специфические CAR-экспрессирующие CD4+ Т-клетки и CD19-специфические CAR-экспрессирующие CD8+ Т-клетки в соотношении около 1:1. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR клеток представляет собой лизокабтаген маралейцел (BREYANZI®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001174] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят от около 50×10^6 до около 110×10^6 (например, 50×10^6, 51×10^6, 52×10^6, 53×10^6, 54×10^6, 55×10^6, 56×10^6, 57×10^6, 58×10^6, 59×10^6, 60×10^6, 61×10^6, 62×10^6, 63×10^6, 64×10^6, 65×10^6, 66×10^6, 67×10^6, 68×10^6, 69×10^6, 70×10^6, 71×10^6, 72×10^6, 73×10^6, 74×10^6, 75×10^6, 76×10^6, 77×10^6, 78×10^6, 79×10^6, 80×10^6, 81×10^6, 82×10^6, 83×10^6, 84×10^6, 85×10^6, 86×10^6, 87×10^6, 88×10^6, 89×10^6, 90×10^6, 91×10^6, 92×10^6, 93×10^6, 94×10^6, 95×10^6, 96×10^6, 97×10^6, 98×10^6, 99×10^6, 100×10^6, 101×10^6, 102×10^6, 103×10^6, 104×10^6, 105×10^6, 106×10^6, 107×10^6, 108×10^6, 109×10^6 или 110×10^6) жизнеспособных CD19-специфических CAR-Т-клеток, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-Т-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-Т-клеток. В некоторых случаях 50% жизнеспособных CD19-специфических CAR-Т-клеток представляют собой CD19-специфические CAR-экспрессирующие CD4+ Т-клетки, а 50% жизнеспособных CD19-специфических CAR-Т-клеток представляют собой CD19-специфические CAR-экспрессирующие CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR клеток представляет собой лизокабтаген маралейцел (BREYANZI®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001175] В некоторых вариантах осуществления CD19-специфические CAR-Т-клетки, описанные в настоящем документе, вводят субъекту в дозе около 2×10^6 на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления максимальная вводимая доза составляет около 2×10^8 жизнеспособных CD19-специфических CAR-Т-клеток. В

некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR клеток представляет собой такой же CD19-специфический CAR, как и аксикабтаген цилолейцел (YESCARTA®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001176] В некоторых вариантах осуществления CD19-специфические CAR-T-клетки, описанные в настоящем документе, вводят субъекту в дозе около 2×10^6 на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления максимальную дозу около 2×10^8 жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток вводят пациенту с массой тела около 100 кг и более. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR клеток представляет собой такой же CD19-специфический CAR, как и брексукабтаген аутолейцел (TECARTUS®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001177] В некоторых вариантах осуществления CD19-специфические CAR-T-клетки, описанные в настоящем документе, вводят субъекту в дозе не более чем около 2×10^8 жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят от около $0{,}2\times10^6$ до около $5{,}0\times10^6$ (например, около $0{,}2\times10^6$, $0{,}4\times10^6$, $0{,}5\times10^6$, $0{,}6\times10^6$, $0{,}8\times10^6$, $0{,}9\times10^6$, $1{,}0\times10^6$, $1{,}2\times10^6$, $1{,}4\times10^6$, $1{,}5\times10^6$, $1{,}6\times10^6$, $1{,}8\times10^6$, $1{,}9\times10^6$, $2{,}0\times10^6$, $2{,}2\times10^6$, $2{,}4\times10^6$, $2{,}5\times10^6$, $2{,}6\times10^6$, $2{,}8\times10^6$, $2{,}9\times10^6$, $3{,}0\times10^6$, $3{,}2\times10^6$, $3{,}4\times10^6$, $3{,}5\times10^6$, $3{,}6\times10^6$, $3{,}8\times10^6$, $3{,}9\times10^6$, $4{,}0\times10^6$, $4{,}2\times10^6$, $4{,}4\times10^6$, $4{,}5\times10^6$, $4{,}6\times10^6$, $4{,}8\times10^6$, $4{,}9\times10^6$ или $5{,}0\times10^6$) жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток на кг массы тела для субъекта с массой тела около 50 кг или менее, В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят от около $0{,}1\times10^8$ до около $2{,}5\times10^8$ (например, около $0{,}1\times10^6$, $0{,}2\times10^6$, $0{,}4\times10^6$, $0{,}5\times10^6$, $0{,}6\times10^6$, $0{,}8\times10^6$, $0{,}9\times10^6$, $1{,}0\times10^6$, $1{,}2\times10^6$, $1{,}4\times10^6$, $1{,}5\times10^6$, $1{,}6\times10^6$, $1{,}8\times10^6$, $1{,}9\times10^6$, $2{,}0\times10^6$, $2{,}2\times10^6$, $2{,}4\times10^6$ или $2{,}5\times10^6$) жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток субъекту с массой тела более чем около 50 кг, В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят от около $0{,}6\times10^8$ до около $6{,}0\times10^8$ (например, около $0{,}6\times10^8$, $0{,}8\times10^8$, $0{,}9\times10^8$, $1{,}0\times10^8$, $1{,}2\times10^8$, $1{,}4\times10^8$, $1{,}5\times10^8$, $1{,}6\times10^8$, $1{,}8\times10^8$, $1{,}9\times10^8$, $2{,}0\times10^8$, $2{,}2\times10^8$, $2{,}4\times10^8$, $2{,}5\times10^8$, $2{,}6\times10^8$, $2{,}8\times10^8$, $2{,}9\times10^8$, $3{,}0\times10^8$, $3{,}2\times10^8$, $3{,}4\times10^8$, $3{,}5\times10^8$, $3{,}6\times10^8$, $3{,}8\times10^8$, $3{,}9\times10^8$, $4{,}0\times10^8$, $4{,}2\times10^8$, $4{,}4\times10^8$, $4{,}5\times10^8$, $4{,}6\times10^8$, $4{,}8\times10^8$, $4{,}9\times10^8$, $5{,}0\times10^8$, $5{,}2\times10^8$, $5{,}4\times10^8$, $5{,}5\times10^8$, $5{,}6\times10^8$, $5{,}8\times10^8$, $5{,}9\times10^8$ или $6{,}0\times10^8$) жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество

жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR клеток представляет собой такой же CD19-специфический CAR, как и тисагенлеклейцел (KYMRIAH®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001178] В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых из CD19-специфических CAR-T-клеток, описанных в настоящем документе, включает в себя от около 50×10^6 до около 110×10^6 (например, 50×10^6, 51×10^6, 52×10^6, 53×10^6, 54×10^6, 55×10^6, 56×10^6, 57×10^6, 58×10^6, 59×10^6, 60×10^6, 61×10^6, 62×10^6, 63×10^6, 64×10^6, 65×10^6, 66×10^6, 67×10^6, 68×10^6, 69×10^6, 70×10^6, 71×10^6, 72×10^6, 73×10^6, 74×10^6, 75×10^6, 76×10^6, 77×10^6, 78×10^6, 79×10^6, 80×10^6, 81×10^6, 82×10^6, 83×10^6, 84×10^6, 85×10^6, 86×10^6, 87×10^6, 88×10^6, 89×10^6, 90×10^6, 91×10^6, 92×10^6, 93×10^6, 94×10^6, 95×10^6, 96×10^6, 97×10^6, 98×10^6, 99×10^6, 100×10^6, 101×10^6, 102×10^6, 103×10^6, 104×10^6, 105×10^6, 106×10^6, 107×10^6, 108×10^6, 109×10^6 или 110×10^6) жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособные CD19-специфичные CAR-T-клетки включают CD19-специфические CAR, экспрессирующие CD4+ T-клетки, и CD19-специфические CAR, экспрессирующие CD8+ T-клетки в соотношении примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфичный CAR представляет собой тот же CD19-специфичный CAR, что и лизокабтаген маралеуцел (BREYANZI®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001179] В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых из CD19-специфических CAR-T-клеток, описанных в настоящем документе, включает в себя около 2×10^8 жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления один инфузионный мешок любых из CD19-специфических CAR-T-клеток, описанных в настоящем документе, включает в себя около 2×10^8 жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток в клеточной суспензии около 68 мл. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR представляет собой такой же CD19-специфический CAR, как и аксикабтаген цилолейцел (YESCARTA®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001180] В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых из CD19-специфических CAR-T-клеток, описанных в настоящем документе, включает в себя около 2×10^8 жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления один инфузионный мешок любых из CD19-специфических CAR-T-клеток, описанных в настоящем документе, включает в себя около 2×10^8 жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток в клеточной суспензии около 68 мл. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR представляет собой такой же CD19-специфический CAR, как и брексукабтаген аутолейцел (TECARTUS®), его структурный

эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001181] В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых из CD19-специфических CAR-T-клеток, описанных в настоящем документе, включает в себя от около $0,2\times10^6$ до около $5,0\times10^6$ (например, около $0,2\times10^6$, $0,3\times10^6$, $0,4\times10^6$, $0,5\times10^6$, $0,6\times10^6$, $0,7\times10^6$, $0,8\times10^6$, $0,9\times10^6$, $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, $2,0\times10^6$, $2,1\times10^6$, $2,2\times10^6$, $2,3\times10^6$, $2,4\times10^6$, $2,5\times10^6$, $2,6\times10^6$, $2,7\times10^6$, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, $3,0\times10^6$, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, $4,0\times10^6$, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$, $4,5\times10^6$, $4,6\times10^6$, $4,7\times10^6$, $4,8\times10^6$, $4,9\times10^6$, $5,0\times10^6$) жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток на кг массы тела для субъекта с массой тела 50 кг или менее. В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых из CD19-специфических CAR-T-клеток, описанных в настоящем документе, включает в себя от около $0,1\times10^8$ до около $2,5\times10^8$ (например, около $0,1\times10^6$, $0,2\times10^6$, $0,3\times10^6$, $0,4\times10^6$, $0,5\times10^6$, $0,6\times10^6$, $0,7\times10^6$, $0,8\times10^6$, $0,9\times10^6$, $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, $2,0\times10^6$, $2,1\times10^6$, $2,2\times10^6$, $2,3\times10^6$, $2,4\times10^6$ или $2,5\times10^6$) жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток на кг массы тела для субъекта с массой тела более чем около 50 кг. В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых из CD19-специфических CAR-T-клеток, описанных в настоящем документе, включает в себя от около $0,6\times10^8$ до около $6,0\times10^8$ (например, около $0,6\times10^8$, $0,7\times10^8$, $0,8\times10^8$, $0,9\times10^8$, $1,0\times10^8$, $1,1\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,3\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,7\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, $2,0\times10^8$, $2,1\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,3\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,7\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, $3,0\times10^8$, $3,1\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,3\times10^8$, $3,4\times10^8$, $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, $4,0\times10^8$, $4,1\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,3\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,7\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$, $5,0\times10^8$, $5,1\times10^8$, $5,2\times10^8$, $5,3\times10^8$, $5,4\times10^8$, $5,5\times10^8$, $5,6\times10^8$, $5,7\times10^8$, $5,8\times10^8$, $5,9\times10^8$ или $6,0\times10^8$) жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления один инфузионный мешок любых из CD19-специфических CAR-T-клеток, описанных в настоящем документе, включает в себя от около $0,6\times10^8$ до около $6,0\times10^8$ (например, около $0,6\times10^8$, $0,7\times10^8$, $0,8\times10^8$, $0,9\times10^8$, $1,0\times10^8$, $1,1\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,3\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,7\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, $2,0\times10^8$, $2,1\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,3\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,7\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, $3,0\times10^8$, $3,1\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,3\times10^8$, $3,4\times10^8$, $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, $4,0\times10^8$, $4,1\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,3\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,7\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$, $5,0\times10^8$, $5,1\times10^8$, $5,2\times10^8$, $5,3\times10^8$, $5,4\times10^8$, $5,5\times10^8$, $5,6\times10^8$, $5,7\times10^8$, $5,8\times10^8$, $5,9\times10^8$ или $6,0\times10^8$) жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток в клеточной суспензии от около 10 мл до около 50 мл. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных CD19-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR клеток представляет собой такой же CD19-специфический CAR, как и тисагенлеклейцел (KYMRIAH®), его структурный эквивалент

или его функциональный эквивалент.

[001182] В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфичные (BCMA) CAR-T-клетки, описанные в данном документе, вводят субъекту в дозе примерно 250×10^6 до примерно 500×10^6 (например, 250×10^6, 255×10^6, 260×10^6, 265×10^6, 270×10^6, 275×10^6, 280×10^6, 285×10^6, 290×10^6, 295×10^6, 300×10^6, 305×10^6, 310×10^6, 315×10^6, 320×10^6, 325×10^6, 330×10^6, 335×10^6, 340×10^6, 345×10^6, 350×10^6, 355×10^6, 360×10^6, 365×10^6, 370×10^6, 375×10^6, 380×10^6, 385×10^6, 390×10^6, 395×10^6, 400×10^6, 405×10^6, 410×10^6, 415×10^6, 420×10^6, 425×10^6, 430×10^6, 435×10^6, 440×10^6, 445×10^6, 450×10^6, 455×10^6, 460×10^6, 465×10^6, 470×10^6, 475×10^6, 480×10^6, 485×10^6, 490×10^6, 495×10^6или 500×10^6) жизнеспособных BCMA-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособные BCMA-специфические CAR-T-клетки включают BCMA-специфические CAR, экспрессирующие CD4+ T-клетки, и BCMA-специфические CAR, экспрессирующие CD8+ T-клетки в соотношении примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический CAR клеток представляет собой идекабтаген виклеуцел (ABECEMA®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001183] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят примерно от 250×10^6 до примерно 500×10^6 (например, 250×10^6, 255×10^6, 260×10^6, 265×10^6, 270×10^6, 275×10^6, 280×10^6, 285×10^6, 290×10^6, 295×10^6, 300×10^6, 305×10^6, 310×10^6, 315×10^6, 320×10^6, 325×10^6, 330×10^6, 335×10^6, 340×10^6, 345×10^6, 350×10^6, 355×10^6, 360×10^6, 365×10^6, 370×10^6, 375×10^6, 380×10^6, 385×10^6, 390×10^6, 395×10^6, 400×10^6, 405×10^6, 410×10^6, 415×10^6, 420×10^6, 425×10^6, 430×10^6, 435×10^6, 440×10^6, 445×10^6, 450×10^6, 455×10^6, 460×10^6, 465×10^6, 470×10^6, 475×10^6, 480×10^6, 485×10^6, 490×10^6, 495×10^6или 500×10^6) жизнеспособных BCMA-специфических CAR-T-клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В некоторых случаях 50% жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток представляют собой BCMA-специфические экспрессирующие CAR CD4+ T-клетки, а 50% жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток представляют собой BCMA-специфические экспрессирующие CAR CD8+ T-клетки. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический CAR клеток представляет собой идекабтаген виклеуцел (ABECEMA®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001184] В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфичные CAR-T-клетки, описанные в данном документе, вводят субъекту в дозе примерно до 5×10^8 жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В некоторых вариантах

осуществления субъекту вводят от около $2,5\times10^8$ до около $5,0\times10^8$ (например, $0,2\times10^8$, $0,4\times10^8$, $0,5\times10^8$, $0,6\times10^8$, $0,8\times10^8$, $0,9\times10^8$, $1,0\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, $2,0\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, $3,0\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,4\times10^8$, $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, $4,0\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$ или $5,0\times10^8$) жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфичный CAR клеток представляет собой тот же BCMA-специфичный CAR, что и идекабтаген виклеуцел (АВЕСЕМА®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001185] В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых BCMA-специфичных CAR-T-клеток, описанных в данном документе, включает примерно от 250×10^6 до примерно 500×10^6 (например, 250×10^6, 255×10^6, 260×10^6, 265×10^6, 270×10^6, 275×10^6, 280×10^6, 285×10^6, 290×10^6, 295×10^6, 300×10^6, 305×10^6, 310×10^6, 315×10^6, 320×10^6, 325×10^6, 330×10^6, 335×10^6, 340×10^6, 345×10^6, 350×10^6, 355×10^6, 360×10^6, 365×10^6, 370×10^6, 375×10^6, 380×10^6, 385×10^6, 390×10^6, 395×10^6, 400×10^6, 405×10^6, 410×10^6, 415×10^6, 420×10^6, 425×10^6, 430×10^6, 435×10^6, 440×10^6, 445×10^6, 450×10^6, 455×10^6, 460×10^6, 465×10^6, 470×10^6, 475×10^6, 480×10^6, 485×10^6, 490×10^6, 495×10^6или 500×10^6) жизнеспособных BCMA-специфических CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособные BCMA-специфические CAR-T-клетки включают BCMA-специфические CAR, экспрессирующие CD4+ Т-клетки, и BCMA-специфические CAR, экспрессирующие CD8+ Т-клетки в соотношении примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфичный CAR представляет собой тот же BCMA-специфичный CAR, что и идекабтагеновый виклеуцел (АВЕСЕМА®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

[001186] В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых BCMA-специфичных CAR-T-клеток, описанных в данном документе, включает примерно от 250×10^6 до примерно 500×10^6 (например, 250×10^6, 255×10^6, 260×10^6, 265×10^6, 270×10^6, 275×10^6, 280×10^6, 285×10^6, 290×10^6, 295×10^6, 300×10^6, 305×10^6, 310×10^6, 315×10^6, 320×10^6, 325×10^6, 330×10^6, 335×10^6, 340×10^6, 345×10^6, 350×10^6, 355×10^6, 360×10^6, 365×10^6, 370×10^6, 375×10^6, 380×10^6, 385×10^6, 390×10^6, 395×10^6, 400×10^6, 405×10^6, 410×10^6, 415×10^6, 420×10^6, 425×10^6, 430×10^6, 435×10^6, 440×10^6, 445×10^6, 450×10^6, 455×10^6, 460×10^6, 465×10^6, 470×10^6, 475×10^6, 480×10^6, 485×10^6, 490×10^6, 495×10^6или 500×10^6) жизнеспособных BCMA-специфических CAR-T-клеток на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых BCMA-специфичных CAR-T-клеток, описанных в данном

документе, включает примерно от $2,5\times10^8$ до примерно $5,0\times10^8$ (например, $0,2\times10^8$, $0,4\times10^8$, $0,5\times10^8$, $0,6\times10^8$, $0,8\times10^8$, $0,9\times10^8$, $1,0\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, $2,0\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, $3,0\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,4\times10^8$, $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, $4,0\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$ или $5,0\times10^8$) жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления однократная доза любых BCMA-специфичных CAR-T-клеток, описанных в данном документе, включает примерно от $2,5\times10^8$ до примерно $5,0\times10^8$ (например, $0,2\times10^8$, $0,4\times10^8$, $0,5\times10^8$, $0,6\times10^8$, $0,8\times10^8$, $0,9\times10^8$, $1,0\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, $2,0\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, $3,0\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,4\times10^8$, $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, $4,0\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$ или $5,0\times10^8$) жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления один пакет для инфузии любых BCMA-специфичных CAR-T-клеток, описанных в данном документе, включает от примерно $2,5\times10^8$ до примерно $5,0\times10^8$ (например, $0,2\times10^8$, $0,4\times10^8$, $0,5\times10^8$, $0,6\times10^8$, $0,8\times10^8$, $0,9\times10^8$, $1,0\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, $2,0\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, $3,0\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,4\times10^8$, $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, $4,0\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$ или $5,0\times10^8$) жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток в клеточной суспензии объемом от примерно 10 мл до примерно 500 мл. В некоторых вариантах осуществления клеточная суспензия составляет около 50 мл, 250 мл или около 500 мл. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой терапевтически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В других вариантах осуществления доза представляет собой клинически эффективное количество жизнеспособных BCMA-специфичных CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфичный CAR клеток представляет собой тот же BCMA-специфичный CAR, что и идекабтаген виклеуцел (АВЕСЕМА®), его структурный эквивалент или его функциональный эквивалент.

Способы введения гипоиммуногенных клеток, включая Т-клетки

[001187] Как более подробно описано в настоящем документе, в настоящем документе предложены способы лечения пациента с патологическим состоянием, нарушением или расстройством путем введения гипоиммуногенных клеток, в частности, гипоиммуногенных Т-клеток. Как будет понятно, для всего множества описанных в настоящем документе вариантов осуществления, связанных с временными рамками и/или комбинациями вариантов терапии, введение клеток осуществляют способом или путем, который приводит к по меньшей мере частичной локализации вносимых клеток в необходимом участке. Клетки можно инфузировать, имплантировать или трансплантировать 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.

[001188] В настоящем документе предложены способы лечения пациента с патологическим состоянием, нарушением или расстройством, включающие введение популяции гипоиммуногенных клеток (*например*, первичных Т-клеток, Т-клеток, дифференцированных из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, или других клеток, дифференцированных из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, описанных в настоящем документе) субъекту, *например*, пациенту-человеку. Например, популяцию гипоиммуногенных первичных Т-клеток, таких как, помимо прочего, CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, наивные Т-клетки, регуляторные Т-клетки (Treg), нерегуляторные Т-клетки, Th1-клетки, Th2-клетки, Th9-клетки, Th17-клетки, фолликулярные Т-хелперы (Tfh), цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), эффекторные Т-клетки (Teff), центральные Т-клетки памяти (Tcm), эффекторные Т-клетки памяти (Tem), эффекторные Т-клетки памяти, которые экспрессируют CD45RA (клетки TEMRA), резидентные клетки памяти (Trm), Т-клетки виртуальной памяти, Т-клетки врожденной памяти, стволовые клетки памяти (Tsc), γδ Т-клетки и любые другие подтипы Т-клеток, вводят пациенту для лечения патологического состояния, нарушения или расстройства. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент (такой как, помимо прочего, лимфодеплетирующий агент) не вводят пациенту перед введением популяции гипоиммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более перед введением клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более перед введением клеток. Во многочисленных вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту после введения клеток или вводят по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более после введения клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после введения клеток. В некоторых вариантах осуществления, когда иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после введения клеток, введение осуществляется в более низкой дозе, чем требовалось бы для клеток с экспрессией одной или более молекул ГКГС I и/или ГКГС II и без экзогенной экспрессии CD47.

[001189] Неограничивающие примеры иммуносупрессивного и/или иммуномодулирующего агента (такого как, помимо прочего, лимфодеплетирующий агент) включают в себя циклоспорин, азатиоприн, микофеноловую кислоту, микофенолата мофетил, кортикостероиды, такие как преднизон, метотрексат, соли золота, сульфасалазин, противомалярийные средства, бреквинар, лефлуномид, мизорибин, 15-

деоксиспергуалин, 6-меркаптопурин, циклофосфамид, рапамицин, такролимус (FK-506), OKT3, антитимоцитарный глобулин, тимопентин, тимозин-α и аналогичные агенты. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент выбран из группы иммуносупрессивных антител, состоящей из антител, связывающихся с p75 рецептора IL-2, антител, связывающихся, например, с ГКГС, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a или CD58, и антител, связывающихся с любыми их лигандами. В некоторых вариантах осуществления такой иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент может быть выбран из растворимых молекул IL-15R, IL-10, B7 (*например*, B7-1, B7-2, их вариантов и их фрагментов), ICOS и OX40, ингибитора негативного Т-клеточного регулятора (такого как антитело к CTLA-4) и сходных агентов.

[001190] В некоторых вариантах осуществления, когда иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после введения клеток, введение осуществляется в более низкой дозе, чем требовалось бы для клеток с экспрессией одной или более молекул ГКГС I и/или ГКГС II, экспрессией TCR и без экзогенной экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после первого введения клеток, введение осуществляют в более низкой дозировке, чем потребовалась бы для клеток с экспрессией одной или более молекул ГКГС I и ГКГС II, экспрессией TCR и без экзогенной экспрессии CD47.

[001191] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки совместно вводят с терапевтическим агентом, который связывается и/или взаимодействует с одним или большим количеством рецепторов, выбранных из группы, состоящей из CD94, KIR2DL4, PD-1, ингибирующего рецептора NK-клеток и активирующего рецептора NK-клеток. В некоторых случаях терапевтический агент связывается с рецептором на поверхности NK-клетки, включая одну или большее количество субпопуляций NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент выбран из группы, состоящей из антитела и его фрагментов и вариантов, миметика антитела, малой молекулы, блокирующего пептида и антагониста рецептора.

[001192] Для терапевтических применений клетки, полученные в соответствии с описанными способами, как правило, могут быть предоставлены в форме фармацевтической композиции, содержащей изотонический эксципиент, и получены в условиях, которые являются в достаточной степени стерильными для применения человеком. Общие принципы медицинских составов клеточных композиций см. в "Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy," by Morstyn & Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; and "Hematopoietic Stem Cell Therapy," E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000. Клетки могут быть упакованы в устройстве или контейнере, подходящих для распределения или клинического применения.

[001193] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе

клетки противопоказаны пациентам с известной гиперчувствительностью I типа или анафилактическими реакциями на мышиные белки, белки клеток яичника китайского хомячка (CHO) или на любой компонент описанных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки противопоказаны пациентам, которые страдают или имели прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию (ПМЛ). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки не рекомендуется использовать для пациентов с тяжелыми активными инфекциями.

[001194] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки вводят субъекту с аутоиммунным заболеванием/расстройством и/или воспалительным заболеванием/расстройством, который ранее лечился ритуксимабом (РИТУКСАН®). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки вводят субъекту с аутоиммунным заболеванием/расстройством и/или воспалительным заболеванием/расстройством, который ранее лечился ритуксимабом (РИТУКСАН®) и не прошел и/или не ответил на лечение ритуксимабом. В некоторых вариантах осуществления у пациента ревматоидный артрит (РА). В некоторых вариантах осуществления у пациента РА, и лечение ритуксимабом проводится в сочетании с метотрексатом. В некоторых вариантах осуществления пациентом является взрослый пациент с активным РА от умеренной до тяжелой степени. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой взрослого пациента с активным РА от умеренной до тяжелой степени, и лечение ритуксимабом проводится в сочетании с метотрексатом. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой взрослого пациента с активным РА от умеренной до тяжелой степени, у которого наблюдается неадекватный ответ на один или более видов терапии антагонистами TNF, и лечение ритуксимабом проводится в сочетании с метотрексатом. В некоторых вариантах осуществления доза ритуксимаба при РА в сочетании с метотрексатом составляет две внутривенные инфузии по 1000 мг с интервалом в 2 недели (один курс) каждые 24 недели и/или на основании клинической оценки, но не раньше, чем каждые 16 недель. В некоторых вариантах осуществления метилпреднизолон в дозе 100 мг внутривенно или эквивалентный глюкокортикоид рекомендуется вводить за 30 минут до каждой инфузии.

[001195] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки вводят субъекту с аутоиммунным заболеванием/расстройством и/или воспалительным заболеванием/расстройством, который ранее лечился ритуксимабом (РИТУКСАН®). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки вводят субъекту с аутоиммунным заболеванием/расстройством и/или воспалительным заболеванием/расстройством, который ранее лечился ритуксимабом (РИТУКСАН®) и не прошел и/или не ответил на лечение ритуксимабом. В некоторых вариантах осуществления у пациента гранулематоз с полиангиитом (ГПА) (гранулематоз Вегенера). В некоторых вариантах у пациента микроскопический полиангиит (МПА) у взрослых пациентов в сочетании с глюкокортикоидами. В некоторых вариантах

осуществления доза ритуксимаба для ГПА и МПА в сочетании с глюкокортикоидами составляет 375 мг/м^2 один раз в неделю в течение 4 недель. В некоторых вариантах осуществления ритуксимаб вводят в виде раствора 100 мг/10 мл в одноразовом флаконе. В некоторых вариантах осуществления ритуксимаб вводят в виде раствора 500 мг/50 мл в одноразовом флаконе.

[001196] *Иммуносупрессивный агент*

[001197] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту перед первым введением популяции сконструированных первичных клеток или содержащей их композиции.

[001198] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент можно вводить пациенту, получившему введение сконструированных первичных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят до введения сконструированных первичных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят перед введением первого и/или второго введения сконструированных первичных клеток.

[001199] Неограничивающие примеры иммуносупрессивного и/или иммуномодулирующего агента включают циклоспорин, азатиоприн, микофеноловую кислоту, микофенолата мофетил, кортикостероиды, такие как преднизон, метотрексат, соли золота, сульфасалазин, противомалярийные средства, бреквинар, лефлуномид, мизорибин, 15-деоксиспергуалин, 6-меркаптопурин, циклофосфамид, рапамицин, такролимус (FK-506), OKT3, антитимоцитарный глобулин, тимопентин, тимозин-α и аналогичные агенты. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент выбран из группы иммуносупрессивных антител, состоящей из антител, связывающихся с p75 рецептора IL-2, антител, связывающихся, например, с ГКГС, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a или CD58, и антител, связывающихся с любыми их лигандами. В некоторых вариантах осуществления, когда иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после первого введения клеток, введение осуществляется в более низкой дозе, чем требовалось бы для клеток с экспрессией одной или более молекул ГКГС класса I и/или экспрессии одной или более молекул ГКГС класса II, и без экзогенной экспрессии CD47.

[001200] В одном варианте осуществления такой иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент может быть выбран из растворимых молекул IL-15R, IL-10, B7 (например, B7-1, B7-2, их вариантов и их фрагментов), ICOS и OX40, ингибитора негативного Т-клеточного регулятора (такого как антитело к CTLA-4) и сходных агентов.

[001201] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент можно вводить пациенту перед первым введением популяции сконструированных первичных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более перед первым введением клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более перед первым введением нейральных клеток.

[001202] В конкретных вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту после первого введения клеток или вводят по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более после первого введения клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после введения клеток.

[001203] Во многих вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту перед введением популяции сконструированных клеток. Во многих вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту перед первым и/или вторым введением популяции сконструированных первичных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более перед введением клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более перед первым и/или вторым введением клеток. В конкретных вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более после введения клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после первого и/или второго введения клеток.

[001204] В некоторых вариантах осуществления, когда иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после введения клеток, введение осуществляется в более низкой дозе, чем требовалось бы для иммуногенных клеток (например, популяции клеток того же или сходного типа клеток или фенотипа, но которые не содержат модификаций, например генетических модификаций, сконструированных первичных клеток, например, с экспрессией одной или более молекул ГКГС класса I и/или одной или более экспрессией молекул ГКГС класса II, и без экзогенной экспрессии CD47.

Дополнительные варианты осуществления

[001205] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого

лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов, относительно клетки того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001206] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена гипоиммуногенная клетка, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов, относительно клетки того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001207] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации включают регулируемый нокаут одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II.

[001208] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации включают регулируемое снижение экспрессии одной или более мишеней, выбранных из B2M и CIITA, по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001209] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации включают регулируемое выведение одной или более мишеней, выбранных из B2M и CIITA.

[001210] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из бета-2-микроглобулина (B2M) и трансактиватора ГКГС класса II (CIITA), и ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с клетками того же типа клеток, которые не содержат модификаций.

[001211] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена агипоиммуногенная клетка, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из бета-2-микроглобулина (B2M) и трансактиватора ГКГС класса II (CIITA), и ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001212] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые снижают или нокаутируют экспрессию одного или более генов Y-хромосомы.

[001213] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемые модификации, которые снижают или нокаутируют экспрессию одной или более мишеней, выбранных из Y-сцепленного протокадгерина-11 и Y-сцепленного нейролигина-4, относительно клетки того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001214] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый компонент на основе РНК для снижения или

нокаута экспрессии одной или более мишеней по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001215] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый компонент на основе РНК выбран из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi).

[001216] В некоторых вариантах осуществления условный компонент на основе РНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[001217] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый компонент на основе РНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001218] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации включают условный или индуцируемый компонент на основе ДНК для снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001219] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый компонент на основе ДНК представляет собой нокаут с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцибельных мегануклеаз.

[001220] В некоторых вариантах осуществления условный компонент на основе ДНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[001221] В некоторых вариантах осуществления условный компонент на основе ДНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001222] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый белковый компонент для снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001223] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый белковый компонент представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[001224] В некоторых вариантах осуществления способ условного или индуцируемого дегрона выбран из группы, состоящей из индуцированной лигандом

деградации (LID) с использованием метки SMASH, LID с использованием Shield-1, LID с использованием ауксина, LID с использованием рапамицина, условных или индуцируемых пептидных дегронов (*например*, дегронов на основе IKZF3) и условных или индуцируемых химер, нацеленных на протеолиз (PROTAC).

[001225] В некоторых вариантах осуществления условный белковый компонент находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[001226] В некоторых вариантах осуществления условный белковый компонент находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001227] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит условный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов.

[001228] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий условный промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более толерогенных факторов.

[001229] В некоторых вариантах осуществления условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией.

[001230] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов.

[001231] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий индуцируемый промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более толерогенных факторов.

[001232] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001233] В некоторых вариантах осуществления один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CD47, CI-ингибитора и IL-35.

[001234] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит условный или индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47.

[001235] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид

CD47, последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13.

[001236] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14.

[001237] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует увеличенное количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001238] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001239] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001240] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001241] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые снижают экспрессию B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001242] В некоторых вариантах осуществления клетка не экспрессирует B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

[001243] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые увеличивают экспрессию одного или более из CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001244] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001245] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21,

CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001246] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001247] В некоторых вариантах осуществления клетка получена из клетки человека или клетки животного.

[001248] В некоторых вариантах осуществления клетка человека или клетка животного представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.

[001249] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC).

[001250] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или гипоиммуногенная клетка представляет собой дифференцированную клетку, полученную из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001251] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC).

[001252] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), эндотелиальной клетки, островковой клетки поджелудочной железы, клетки сердечной мышцы, гладкомышечной клетки, клетки скелетных мышц, гепатоцита, глиальной клетки-предшественника, дофаминергического нейрона, клетки пигментного эпителия сетчатки и клетки щитовидной железы.

[001253] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или гипоиммуногенная клетка представляет собой первичную иммунную клетку или ее потомство.

[001254] В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка или ее потомство представляет собой Т-клетку или NK-клетку.

[001255] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка дополнительно характеризуется сниженной экспрессией Т-клеточного рецептора (TCR)-альфа и/или TCR-бета.

[001256] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа и/или TCR-бета.

[001257] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных

рецепторов (CAR).

[001258] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вставлен в первый и/или второй специфический локус по меньшей мере одного аллеля клетки.

[001259] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй специфический локус выбран из группы, состоящей из безопасного локуса, целевого локуса, локуса *RHD*, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*.

[001260] В некоторых вариантах осуществления безопасный локус выбран из группы, состоящей из локуса *CCR5*, локуса *PPP1R12C*, локуса *Rosa* и локуса *CLYBL*.

[001261] В некоторых вариантах осуществления целевой локус выбран из группы, состоящей из локуса *CXCR4*, локуса *ALB*, локуса *SHS231*, локуса *F3* (*CD142*), локуса *MICA*, локуса *MICB*, локуса *LRP1* (*CD91*), локуса *HMGB1*, локуса *ABO*, локуса *FUT1* и локуса *KDM5D*.

[001262] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в сконструированную клетку или гипоиммуногенную клетку с использованием лентивирусного вектора.

[001263] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в сконструированную клетку или гипоиммуногенную клетку, используя фузоген-опосредованную доставку или систему на основе транспозазы, выбранную из группы, состоящей из кондициональных или индуцибельных транспозаз, кондициональных или индуцибельных транспозонов PiggyBac, кондициональных или индуцибельных транспозонов Sleeping Beauty (SB11), кондициональных или индуцибельных транспозонов Mos1 и кондициональных или индуцибельных транспозонов Tol2.

[001264] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство избегают цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту.

[001265] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство защищены от лизиса клеток зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту.

[001266] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство избегают поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту.

[001267] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство не индуцируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[001268] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство не индуцируют основанный на антителах иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[001269] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка, содержащая регулируемые модификации, увеличивающие экспрессию CD47, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001270] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена гипоиммуногенная клетка, содержащая регулируемые модификации, увеличивающие экспрессию CD47, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001271] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит условный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47.

[001272] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий условный промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий карго-полинуклеотид, кодирующий CD47.

[001273] В некоторых вариантах осуществления условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией.

[001274] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47.

[001275] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий индуцируемый промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий CD47.

[001276] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001277] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид клетки содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13.

[001278] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14.

[001279] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует увеличенное количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001280] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество

CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001281] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001282] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001283] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001284] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемый нокаут одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II.

[001285] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации включают регулируемое снижение экспрессии одной или более мишеней, выбранных из B2M и CIITA, по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001286] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации включают регулируемое выведение одной или более мишеней, выбранных из B2M и CIITA.

[001287] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые снижают или нокаутируют экспрессию одного или более генов Y-хромосомы.

[001288] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит регулируемые модификации, которые снижают или нокаутируют экспрессию одной или более мишеней, выбранных из Y-сцепленного протокадгерина-11 и Y-сцепленного нейролигина-4, относительно клетки того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001289] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый компонент на основе РНК для снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001290] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый компонент на основе РНК выбран из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi).

[001291] В некоторых вариантах осуществления условный компонент на основе РНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из

специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[001292] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый компонент на основе РНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001293] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации включают условный или индуцируемый компонент на основе ДНК для снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001294] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый компонент на основе ДНК представляет собой нокаут с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцибельных мегануклеаз.

[001295] В некоторых вариантах осуществления условный компонент на основе ДНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[001296] В некоторых вариантах осуществления условный компонент на основе ДНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001297] В некоторых вариантах осуществления регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый белковый компонент для снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001298] В некоторых вариантах осуществления условный или индуцируемый белковый компонент представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона.

[001299] В некоторых вариантах осуществления способ условного или индуцируемого дегрона выбран из группы, состоящей из индуцированной лигандом деградации (LID) с использованием метки SMASH, LID с использованием Shield-1, LID с использованием ауксина, LID с использованием рапамицина, условных или индуцируемых пептидных дегронов (*например*, дегронов на основе IKZF3) и условных или индуцируемых химер, нацеленных на протеолиз (PROTAC).

[001300] В некоторых вариантах осуществления условный белковый компонент находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

[001301] В некоторых вариантах осуществления условный белковый компонент находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001302] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит условный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более дополнительных толерогенных факторов.

[001303] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий условный промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более дополнительных толерогенных факторов.

[001304] В некоторых вариантах осуществления условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией.

[001305] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более дополнительных толерогенных факторов.

[001306] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий индуцируемый промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более дополнительных толерогенных факторов.

[001307] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001308] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CI-ингибитора и IL-35.

[001309] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые снижают экспрессию B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001310] В некоторых вариантах осуществления клетка не экспрессирует B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

[001311] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые увеличивают экспрессию одного или более из CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой

цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001312] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001313] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001314] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001315] В некоторых вариантах осуществления клетка получена из клетки человека или клетки животного.

[001316] В некоторых вариантах осуществления клетка человека или клетка животного представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.

[001317] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC).

[001318] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или гипоиммуногенная клетка представляет собой дифференцированную клетку, полученную из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001319] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC).

[001320] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), эндотелиальной клетки, островковой клетки поджелудочной железы, клетки сердечной мышцы, гладкомышечной клетки, клетки скелетных мышц, гепатоцита, глиальной клетки-предшественника, дофаминергического нейрона, клетки пигментного эпителия сетчатки и клетки щитовидной железы.

[001321] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка или гипоиммуногенная клетка представляет собой первичную иммунную клетку или ее потомство.

[001322] В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка или ее потомство представляет собой Т-клетку или NK-клетку.

[001323] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка дополнительно характеризуется сниженной экспрессией Т-клеточного рецептора (TCR)-альфа и/или TCR-бета.

[001324] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа и/или TCR-бета.

[001325] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[001326] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вставлен в первый и/или второй специфический локус по меньшей мере одного аллеля клетки.

[001327] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй специфический локус выбран из группы, состоящей из безопасного локуса, целевого локуса, локуса *RHD*, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*.

[001328] В некоторых вариантах осуществления безопасный локус выбран из группы, состоящей из локуса *CCR5*, локуса *PPP1R12C*, локуса *Rosa* и локуса *CLYBL*.

[001329] В некоторых вариантах осуществления целевой локус выбран из группы, состоящей из локуса *CXCR4*, локуса *ALB*, локуса *SHS231*, локуса *F3* (*CD142*), локуса *MICA*, локуса *MICB*, локуса *LRP1* (*CD91*), локуса *HMGB1*, локуса *ABO*, локуса *FUT1* и локуса *KDM5D*.

[001330] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в сконструированную клетку или гипоиммуногенную клетку с использованием лентивирусного вектора.

[001331] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в сконструированную клетку или гипоиммуногенную клетку, используя фузоген-опосредованную доставку или систему на основе транспозазы, выбранную из группы, состоящей из кондициональных или индуцибельных транспозаз, кондициональных или индуцибельных транспозонов PiggyBac, кондициональных или индуцибельных транспозонов Sleeping Beauty (SB11), кондициональных или индуцибельных транспозонов Mos1 и кондициональных или индуцибельных транспозонов Tol2.

[001332] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство избегают цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту.

[001333] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или

ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство защищены от лизиса клеток зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту.

[001334] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство избегают поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту.

[001335] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство не индуцируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[001336] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство не индуцируют основанный на антителах иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[001337] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная эндотелиальная клетка, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с эндотелиальной клеткой, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом эндотелиальная клетка получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001338] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная островковая клетка поджелудочной железы, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с островковой клеткой поджелудочной железы, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом островковая клетка поджелудочной железы получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001339] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка сердечной мышцы, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с клеткой сердечной мышцы, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%,

400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом клетка сердечной мышцы получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001340] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная гладкомышечная клетка, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с гладкомышечной клеткой, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом гладкомышечная клетка получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001341] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка скелетных мышц, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с клеткой скелетных мышц, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом клетка скелетных мышц получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001342] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен сконструированный гепатоцит, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с гепатоцитом, который не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом гепатоцит получен из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001343] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная глиальная клетка-предшественник, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с глиальной клеткой-предшественником, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%,

300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом глиальная клетка-предшественник получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001344] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен сконструированный дофаминергический нейрон, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с дофаминергическим нейроном, который не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом дофаминергический нейрон получен из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001345] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка пигментного эпителия сетчатки, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с клеткой пигментного эпителия сетчатки, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом клетка пигментного эпителия сетчатки получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001346] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная клетка щитовидной железы, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с клеткой щитовидной железы, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом клетка щитовидной железы получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001347] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная Т-клетка, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с Т-клеткой, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%,

900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, при этом Т-клетка необязательно дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR), и при этом Т-клетка получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства, или Т-клетка представляет собой первичную иммунную клетку или ее потомство.

[001348] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная NK-клетка, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с NK-клеткой, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, при этом NK-клетка необязательно дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR), и при этом NK-клетка получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства, или NK-клетка представляет собой первичную иммунную клетку или ее потомство.

[001349] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с клеткой дикого типа или контрольной клеткой того же типа клеток, или которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в клетке дикого типа или контрольной клетке того же типа клеток.

[001350] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с исходной клеткой от донора или пулом исходных клеток от пула доноров, или которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в исходной клетке от донора или пуле исходных клеток от пула доноров.

[001351] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 100%, примерно 200%, примерно 300%, примерно 400%, примерно 500%, примерно 600%, примерно 700%, примерно 800%, примерно 900% или примерно 1000% выше по сравнению с клеткой дикого типа или контрольной клеткой.

[001352] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в клетке дикого типа того же типа клеток.

[001353] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена

Т-клетка, имеющая сниженную экспрессию одного или более HLA ГКГС класса I и/или сниженную экспрессию одного или более HLA ГКГС класса II, и которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с Т-клеткой дикого типа или контрольной Т-клеткой, которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в Т-клетке дикого типа или контрольной Т-клетке, или которая экспрессирует по меньшей мере примерно 170 000 молекул CD47.

[001354] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, которая экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 300% или по меньшей мере примерно на 400% выше по сравнению с Т-клеткой дикого типа или контрольной Т-клеткой.

[001355] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в Т-клетке дикого типа или контрольной Т-клетке.

[001356] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена Т-клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно 170 000 молекул CD47.

[001357] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка экспрессирует по меньшей мере примерно 180 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 190 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 200 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 210 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 220 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 230 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 240 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 250 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 260 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 270 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 280 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 290 000 молекул CD47 или по меньшей мере примерно 300 000 молекул CD47.

[001358] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена Т-клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с исходной Т-клеткой от донора или пулом исходных клеток от пула доноров, или которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в исходной клетке от донора или пуле исходных клеток от пула доноров.

[001359] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную островковую клетку поджелудочной железы которая экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 1000% или по меньшей мере примерно на 2000% выше по сравнению с островковой клеткой поджелудочной железы дикого типа или контрольной островковой клеткой поджелудочной железы.

[001360] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена островковая клетка поджелудочной железы, имеющая сниженную экспрессию одного или более HLA ГКГС класса I и/или сниженную экспрессию одного или более HLA ГКГС

класса II, и которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с островковой клеткой поджелудочной железы дикого типа или контрольной островковой клеткой поджелудочной железы.

[001361] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную островковую бета-клетку, которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в островковой бета-клетке дикого типа или контрольной островковой бета-клетке.

[001362] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит 1, 2, 3, 4 или 5 копий экзогенного полинуклеотида, кодирующего CD47.

[001363] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит конститутивный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47.

[001364] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, доставляется в клетку посредством опосредованной вирусом интеграции.

[001365] В некоторых вариантах осуществления опосредованная вирусом интеграция является опосредованной лентивирусом.

[001366] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрируется в сайт клеточного генома посредством HDR.

[001367] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрирован в локус гена TRAC, локус гена TRBC или их комбинацию.

[001368] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрирован по меньшей мере в один аллель TRAC, по меньшей мере в один аллель TRBC или их комбинацию.

[001369] В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрирован по меньшей мере в два аллеля TRAC, по меньшей мере в два аллеля TRBC или их комбинацию.

[001370] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит экзогенный полинуклеотид, содержащий полипептид CD47, имеющий по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13, по меньшей мере примерно 98% идентичности последовательности с аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, по меньшей мере примерно на 99% идентичную последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

[001371] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит экзогенный полинуклеотид, содержащий полипептид CD47, имеющий по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:14, по меньшей мере примерно 98% идентичности последовательности с

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, по меньшей мере примерно на 99% идентичную последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

[001372] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит сниженную экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) ГКГС класса I и ГКГС класса II, по сравнению с клеткой дикого типа или контрольной клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001373] В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии одного или более из HLA ГКГС класса I и ГКГС класса II вызвано конститутивными модификациями одного или более генов, кодирующих HLA ГКГС класса I и/или класса II.

[001374] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более нокаутов мишеней, выбранных из HLA ГКГС класса I и ГКГС класса II.

[001375] В некоторых вариантах осуществления один или более нокаутов являются конститутивными нокаутами.

[001376] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит пониженную экспрессию одной или более мишеней, выбранных из B2M и CIITA, по сравнению с клеткой дикого типа или контрольной клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001377] В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии B2M и/или CIITA вызвано конститутивными модификациями гена B2M и/или гена CIITA.

[001378] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более нокаутов мишеней, выбранных из B2M и CIITA.

[001379] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нокауты обоих аллелей B2M и/или обоих аллелей CIITA.

[001380] В некоторых вариантах осуществления один или более нокаутов являются конститутивными нокаутами.

[001381] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более дополнительных толерогенных факторов.

[001382] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CI-ингибитора и IL-35.

[001383] В некоторых вариантах осуществления клетка имеет сниженную экспрессию B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с клеткой дикого типа или контрольной клеткой того же типа клеток.

[001384] В некоторых вариантах осуществления клетка не экспрессирует B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

[001385] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.

[001386] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC).

[001387] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой дифференцированную клетку, полученную из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001388] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), эндотелиальной клетки, островковой клетки поджелудочной железы, клетки сердечной мышцы, гладкомышечной клетки, клетки скелетных мышц, гепатоцита, глиальной клетки-предшественника, дофаминергического нейрона, клетки пигментного эпителия сетчатки и клетки щитовидной железы.

[001389] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную клетку или ее потомство.

[001390] В некоторых вариантах осуществления первичная клетка или ее потомство представляет собой Т-клетку или NK-клетку.

[001391] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка дополнительно характеризуется сниженной экспрессией Т-клеточного рецептора (TCR)-альфа и/или TCR-бета.

[001392] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа и/или TCR-бета.

[001393] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[001394] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с контрольной клеткой того же или другого типа клеток, которая не имеет или имеет низкую экспрессию CD47, и сниженную экспрессию одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II по сравнению с контрольной клеткой.

[001395] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 2 раза, примерно в 3 раза, примерно в 4 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контрольной клетке того же или другого типа клеток, которая не имеет или имеет низкую экспрессию CD47, и сниженную экспрессию одной или более молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II по сравнению с контрольной клеткой.

[001396] В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по

меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 4раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контрольной клетке того же типа клеток, которая не имеет экспрессии CD47 или имеет низкую экспрессию CD47.

[001397] В некоторых вариантах осуществления контрольная клетка представляет собой Т-клетку, естественную клетку-киллера (NK), эндотелиальную клетку, островковую клетку поджелудочной железы, клетку сердечной мышцы, гладкомышечную клетку, клетку скелетных мышц, гепатоцит, глиальную клетку-предшественника, дофаминергический нейрон, клетку пигментного эпителия сетчатки или клетку щитовидной железы.

[001398] В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка или ее потомство избегают цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту, защищены от лизиса клеток зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту, избегают лизиса клеток зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту, избегают поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту, не индуцируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту и/или не индуцируют иммунный ответ на основе антител на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[001399] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию сконструированных клеток или гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемую добавку, носитель, разбавитель или эксципиент.

[001400] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту популяции сконструированных клеток или гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе.

[001401] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту популяции дифференцированных клеток, описанных в данном документе.

[001402] В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из Т-клеток, естественных клеток-киллеров (NK), эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток сердечной мышцы, гладкомышечных клеток, клеток скелетных мышц, гепатоцитов, глиальных клеток-предшественников, дофаминергических нейронов, клеток пигментного эпителия сетчатки и клеток щитовидной железы.

[001403] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено применение популяции сконструированных клеток или гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, для лечения нарушения или состояния у пациента-реципиента, которому будет полезна клеточная терапия.

[001404] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ получения сконструированной клетки, включающий регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций, при этом способ включает:

(a) получение выделенной клетки;

(b) введение в клетку условного или индуцируемого компонента на основе РНК для регулируемой сниженной экспрессии одной или более мишеней, условного или индуцируемого компонента на основе ДНК для регулируемого снижения экспрессии одной или более мишеней или условного или индуцируемого белкового компонента для регулируемого снижения экспрессии одной или более мишеней;

(c) воздействие на клетку условий или экзогенного фактора для активации условного или индуцируемого способа, тем самым вызывая снижение экспрессии молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II;

(d) введение в выделенную клетку нуклеиновой кислоты, содержащей условный или индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов; и

(e) воздействие на сконструированную клетку условия или экзогенного фактора для активации условного или индуцируемого промотора, тем самым вызывая экспрессию экзогенного одного или более толерогенных факторов, что позволяет получить сконструированную клетку.

[001405] В некоторых вариантах осуществления этапы (a)-(d) выполняют в любом порядке.

[001406] В некоторых вариантах осуществления один или более этапов (a)-(d) выполняют одновременно.

[001407] В некоторых вариантах осуществления этапы (b) и (c) выполняют перед этапами (d) и (e).

[001408] В некоторых вариантах осуществления этапы (d) и (e) выполняют перед этапами (b) и (c).

[001409] В некоторых вариантах осуществления этапы (c) и (e) выполняют последовательно.

[001410] В некоторых вариантах осуществления этапы (c) и (e) выполняют одновременно.

[001411] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ определения порогового уровня экспрессии CD47, необходимого для уклонения от иммунного ответа гипоиммуногенных клеток, при этом способ включает:

(a) получение сконструированных клеток, содержащих первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47;

(b) сортировку сконструированных клеток на основе уровней экспрессии CD47 для создания пулов клеток, имеющих сходные уровни экспрессии CD47;

(c) оценку иммунного ответа, индуцированного пулами клеток; и

(d) определение порогового уровня экспрессии CD47, необходимого для уклонения от иммунного ответа.

[001412] В некоторых вариантах осуществления стадия (a) способа дополнительно включает конструирование клеток, которые содержат сниженную экспрессию одного или более генов Y-хромосомы и молекул человеческого лейкоцитарного антигена главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I и/или класса II по сравнению с клеткой тот же тип клеток, которая не содержит модификаций.

[001413] В некоторых вариантах осуществления оценку иммунного ответа проводят с использованием анализов in vitro или анализов in vivo.

[001414] В некоторых вариантах осуществления оценку иммунного ответа проводят путем измерения цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, лизиса зрелыми NK-клетками, поглощения макрофагами, иммунного ответа на клетки на основе антител или путем измерения процента клеток, все еще присутствующих у реципиента через определенный период времени после введения пациенту-реципиенту.

[001415]

Примеры

Пример 1. Получение глиальных клеток-предшественников с двойным нокаутом B2M и CIITA, имеющих регулируемую экспрессию экзогенного CD47.

[001416] В данном документе описан типичный способ получения глиальных клеток-предшественников с двойным нокаутом B2M и CIITA, имеющих регулируемую экспрессию экзогенного трансгена CD47. Экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, функционально связанный с условным промотором, вводят в iPSCs с использованием технологии лентивирусной экспрессии, а гены B2M и CIITA инактивируют в iPSCs с использованием технологии CRISPR/Cas9.

[001417] A. Двойной нокаут B2M/CIITA:

[001418] Клетки iPSC редактируются с использованием технологии CRISPR/Cas9 любым способом, признанным специалистами в данной области техники. В одном примере направляющие РНК, нацеленные на каждый из B2M и CIITA, образуют комплекс с sp Cas9 с образованием рибонуклеопротеинов Cas9 (РНП). РНП для каждого из B2M и CIITA образуют комплексы отдельно при определенном соотношении онРНК:Cas9 с последующим образованием смеси двух РНП. Затем смесь РНП смешивают с iPSC и нуклеофицируют в определенных условиях. Нуклеофицированные клетки высевают и культивируют.

[001419] B. Введение трансгена CD47:

[001420] Полинуклеотиды, кодирующие CD47, функционально связанные с различными условными промоторами, которые являются специфичными для клеточного цикла промоторами и специфичными для ткани/дифференциации промоторами, получают

с использованием любого способа, известного специалистам в данной области техники. Используемые промоторы включают, помимо прочего:

Специфичные для клеточного цикла промоторы: промотор циклина B1, промотор Cdc25B, промотор циклина A2, промотор Cdc2, промотор Cdc25C, промотор циклина E, промотор Cdc6, промотор DHFR и промоторы гистонов. Не ограничиваясь теорией, использование специфичного для клеточного цикла промотора вызывает экспрессию функционально связанного трансгена CD47 в iPSC на различных стадиях клеточного цикла.

Специфичными для ткани/дифференциации промоторы: промотор Sox-2 (специфичный для клеток-предшественников нейронов), промотор глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) (специфичный для астроцитов), промотор основного белка миелина (MBP) (специфичный для олигодендроцитов), промотор человеческого миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG) (специфичный для олигодендроцитов), ароматический промотор декарбоксилазы аминокислот (AADC), промотор Ca2+-кальмодулин-зависимой протеинкиназы II-альфа (CamKIIα), энхансер ЦМВ/промотор тромбоцитарного фактора роста-β, промотор DAT, промотор DNMT, промотор энкефалина, промотор ENO2, промотор GnRH, промотор L7, промотор MAP2, промотор гена легкой цепи нейрофиламента, промотор нейрофиламента, промотор NURR1, промотор PITX3, промотор S100, промотор рецептора серотонина, промотор синапсина, промотор Tau, промотор thy-1, промотор TUBA1A, промотор TUJ1, промотор тирозингидроксилазы (TH), промотор VGF, промотор VMAT2, промотор A2B5, промотор BLBP, промотор нейротрофического фактора головного мозга, BDNF, промотор CD105, промотор CD11b, промотор CD11c, промотор CD133, промотор CD140a, промотор CD45, промотор CD9, промотор цилиарного нейротрофического фактора CNTF, промотор коннексина 43, промотор CX3CR1, промотор EGFR, промотор эпидермального фактора роста EGF, промотор FGF8, промотор FOXG1, промотор GalC, промотор GAP-43, промотор GD3, GLAST, промотор глутаминсинтетазы, промотор IBA-1, промотор LNGFR, промотор MBP, промотор Musashi, промотор фактора роста нервов NGF, промотор нестина, нейтротрофин-3, промотор NT-3, промотор NG2, промотор NKX2.2, промотор NT-4, промотор O4, промотор OLIG1, промотор OLIG2, промотор P2RY12, промотор PAX6, промотор PDGFαR, промотор S100β, промотор SOX10, промотор TMEM119 и промотор виментина. Не ограничиваясь теорией, использование специфичного для ткани/дифференциации промотора вызывает экспрессию функционально связанного трансгена CD47 в iPSC на различных стадиях их дифференциации в GPC.

[001421] Лентивирусные векторы получают любым способом, известным специалистам в данной области техники. Например, клеточные линии трансфицируют с использованием стандартных химических трансфекционных комплексов, содержащих вирусную экспрессию и векторы-переносчики, содержащие полинуклеотиды, кодирующие CD47, функционально связанные с условным промотором, *например*,

специфичным для клеточного цикла или специфичным для ткани/дифференциации промотором. Клеточные культуры собирают и осветляют после трансфекции с последующим центрифугированием для концентрирования. Лентивирусный осадок ресуспендируют до получения конечного концентрата.

[001422] Концентрат лентивируса смешивают с iPSC в стандартных культуральных чашках, iPSC подвергают спинфекции и трансдуцируют конструкциями, содержащими полинуклеотиды, кодирующие CD47, функционально связанные с условным промотором.

[001423] Обратите внимание, что этап A может происходить до, одновременно с или после этапа B для получения iPSC с двойным нокаутом B2M/CIITA, имеющих регулируемый экзогенный трансген CD47.

[001424] Дифференциация в GPC:

[001425] Глиальные клетки-предшественники дифференцируют из iPSC любым способом, известным специалистам в данной области техники.

[001426] В некоторых случаях глиальные клетки, их прекурсоры и предшественники получают путем культивирования iPSC с двойным нокаутом B2M/CIITA, содержащих регулируемый экзогенный трансген CD47, в среде, содержащей один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, IL-34, M-CSF, лиганда FLT3, GM-CSF, CCL2, ингибитора TGF-бета, ингибитора передачи сигнала BMP (такого как LDN193189, SB431542 или их комбинации), активатора передачи сигнала SHH, FGF, фактора роста тромбоцитов PDGF, PDGFR-альфа, HGF, IGF-1, ноггина, белка «sonic hedgehog» (SHH), дорсоморфина, ноггина и любой их комбинации. Среда для дифференциации может включать любые конкретные факторы и/или малые молекулы, которые могут облегчать или обеспечивать создание определенного типа глиальных клеток, как известно специалистам в данной области техники.

[001427] Отдельно или дополннительно дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток проводят посредством воздействия на клетки или приведения клеток в контакт со специфическими факторами, которые, как известно, позволяют получить глиальную клетку, такую как микроглиальная клетка (амебоидная, разветвленная, активированная фагоцитарная и активированная нефагоцитарная клетки), макроглиальная клетка (такая как астроцит, олигодендроцит, эпендимная клетка, радиальная глия, шванновская клетка и сателлитная клетка), ее прекурсор и ее предшественник. Применимые способы создания глиальных клеток, их прекурсоров и предшественников из стволовых клеток можно найти, например, в патентах США №№ 7579188; 7595194; 8263402; 8206699; 8227247; 8252586; 9193951; 9709553; и 9862925; и публикациях заявок США №№ 2018/0187148; 2017/0198255; 2017/0183627; 2017/0182097; 2017/253856; 2018/0236004; и публикациях заявок PCT № WO2017/172976 и WO2018/093681, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[001428] Гиальные клетки отбирают или очищают, используя стратегию положительного отбора, стратегию отрицательного отбора или их обе.

[001429] Характеристика GPC:

[001430] В некоторых случаях чтобы проследить за дифференцировкой глиальных клеток, а также оценить фенотип глиальных клеток, можно оценивать экспрессию любого числа молекулярных и генетических маркеров, специфических для глиальных клеток и их предшественников. Например, наличие генетических маркеров определяют различными методами, известными специалистам в данной области техники. Экспрессию молекулярных маркеров определяют с помощью количественных методов, таких как, но не ограничиваясь этим, анализы на основе кПЦР, анализы на основе РНК-секвенирования, протеомные анализы, иммуноанализы, иммуногистохимические анализы, иммуноблоттинг и т. п.

[001431] В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки экспрессируют NKX2.2, PAX6, SOX10, нейротрофический фактор головного мозга BDNF, нейротрофин-3 NT-3, NT-4, эпидермальный фактор роста EGF, цилиарный нейротрофический фактор CNTF, фактор роста нервов NGF, FGF8, EGFR, OLIG1, OLIG2, миелиновый основной белок MBP, GAP-43, LNGFR, нестин, GFAP, CD11b, CD11c, CD105, CX3CR1, P2RY12, IBA-1, TMEM119, CD45 и любую их комбинацию. В некоторых случаях глиальные клетки, включая олигодендроциты, астроциты и их предшественников, экспрессируют один или более маркеров, выбранных из A2B5, CD9, CD133, CD140a, FOXG1, GalC, GD3, GFAP, нестина, NG2, MBP, Musashi, O4, Olig1, Olig2, PDGFαR, S100β, глутаминсинтетазы, коннексина 43, виментина, BLBP, GLAST и т. п. В некоторых случаях глиальные клетки, включая олигодендроциты, астроциты и их предшественников, не экспрессируют один или более маркеров, выбранных из PSA-NCAM, CD9, CD11, CD32, CD36, CD105, CD140a, нестина, PDGFαR и т. п. Любые из этих типовых маркеров используют для характеристики описанных в данном документе глиальных клеток.

[001432] Отдельно или дополнительно глиальные клетки характеризуют по морфологии, определяемой методами иммуноцитохимии и иммуногистохимии. В некоторых случаях глиальные клетки оценивают в соответствии с анализами функциональных характеристик, такими как, но не ограничиваясь этим, анализ совместной культуры нейронов, анализ стимуляции липополисахаридами (ЛПС), in vitro миелинизации, приток АТФ с анализом кальциевых волн и колебаний и т. п.

[001433] Отдельно или дополнительно, чтобы определить, что глиальные клетки обладают специфичными для клеток характеристиками и особенностями, клетки трансплантируют в животную модель. В некоторых случаях глиальные клетки вводят мыши с ослабленным иммунитетом, *например*, мыши с ослабленным иммунитетом shiverer. Глиальные клетки вводят в головной мозг мыши, а привитые клетки оценивают через заданное количество времени. В некоторых случаях привитые клетки в головном мозге визуализируют, используя методы иммуноокрашивания и визуализации. В некоторых случаях в привитых клетках можно определять экспрессию известных биомаркеров глиальных клеток.

[001434] Дополнительные способы определения эффекта трансплантации нервных

клеток на животной модели неврологического нарушения или состояния описаны в следующих ссылках: при травме спинного мозга - Curtis *et al.*, Cell Stem Cell, 2018, 22, 941-950; при болезни Паркинсона - Kikuchi *et al.*, Nature, 2017, 548:592-596; при БАС - Izrael *et al.*, Stem Cell Research, 2018, 9(1):152 и Izrael *et al.*, IntechOpen, DOI: 10. 5772/intechopen. 72862; при эпилепсии - Upadhya *et al.*, PNAS, 2019, 116(1):287-296, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[001435] Эффективность трансплантатов нейральных клеток в случае повреждения спинного мозга оценивают, например, в крысиной модели острого повреждения спинного мозга, как описано в McDonald, *et al.*, Nat. Med., 1999, 5:1410 и Kim, *et al.*, Nature, 2002, 418:50. Например, успешные трансплантаты могут характеризоваться тем, что полученные из трансплантатов клетки присутствуют в пораженном участке через 2-5 недель, дифференцируются в астроциты, олигодендроциты и/или нейроны и мигрируют вдоль спинного мозга от пораженного конца, а также улучшением походки, координации и набором массы. Конкретные животные модели выбирают на основании типа нейральных клеток и неврологического заболевания или состояния, подлежащего лечению.

Пример 2: Иллюстративные варианты осуществления

[001436] Клетки

[001437] Создают сконструированную клетку, содержащую регулируемые модификации, которые: i) регулируемо снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из бета-2-микроглобулина (B2M) и трансактиватора ГКГС класса II (CIITA), по сравнению с неизмененной или немодифицированной клеткой дикого типа, и ii) регулируемо увеличивают сверхэкспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001438] Создают гипоиммуногенную клетку, содержащую регулируемые модификации, которые: i) регулируемо снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из бета-2-микроглобулина (B2M) и трансактиватора ГКГС класса II (CIITA), и ii) регулируемо увеличивают сверхэкспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001439] Создают сконструированную клетку, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001440] Создают гипоиммуногенную клетку, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов, относительно клетки того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001441] Генетические модификации

[001442] Сконструированные клетки или гипоиммуногенные клетки могут быть созданы так, чтобы они содержали регулируемые модификации, содержащие регулируемый нокаут одной или более мишеней в сконструированную клетку или из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II. Необязательно, можно создать сконструированные клетки или гипоиммуногенные клетки, содержащие регулируемые модификации, которые включают регулируемое снижение экспрессии одной или более мишеней, выбранных из B2M и CIITA, по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, можно создать сконструированные клетки или гипоиммуногенные клетки, содержащие регулируемые модификации, которые включают регулируемый нокаут одной или более мишеней, выбранных из B2M и CIITA. Необязательно, можно создать сконструированные клетки или гипоиммуногенные клетки, которые дополнительно содержат регулируемую сниженную экспрессию или регулируемый нокаут одного или более генов Y-хромосомы. Необязательно, можно создать сконструированные клетки или гипоиммуногенные клетки, содержащие сниженную экспрессию или регулируемый нокаут Y-сцепленного протокадгерина-11 и/или Y-сцепленного нейролигина-4.

[001443] Условная или индуцируемая экспрессия

[001444] Сконструированные клетки или гипоиммуногенные клетки могут быть созданы так, чтобы они содержали условный или индуцируемый компонент на основе РНК для регулируемой сниженной экспрессии или нокаута одной или более мишеней по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, условный или индуцируемый компонент на основе РНК выбирают из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). Необязательно, условный компонент на основе РНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфического для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией. Необязательно, индуцируемый компонент на основе РНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001445] Сконструированные клетки или гипоиммуногенные клетки могут быть созданы так, чтобы они содержали условный или индуцируемый компонент на основе ДНК для регулируемого снижения экспрессии нокаута одной или более мишеней по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, условный или индуцируемый компонент на основе ДНК представляет собой нокаут с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-

эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. Необязательно, условный компонент на основе ДНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфического для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией. Необязательно, условный компонент на основе ДНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001446] Сконструированные клетки или гипоиммуногенные клетки могут быть созданы так, чтобы они содержали условный или индуцируемый белковый компонент для регулируемой сниженной экспрессии или нокаута одной или более мишеней по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, условный или индуцируемый белковый компонент представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона. Необязательно, способ условного или индуцируемого дегрона выбран из группы, состоящей из индуцированной лигандом деградации (LID) с использованием метки SMASH, LID с использованием Shield-1, LID с использованием ауксина, LID с использованием рапамицина, условных или индуцируемых пептидных дегронов (*например*, дегронов на основе IKZF3) и условных или индуцируемых химер, нацеленных на протеолиз (PROTAC). Необязательно, условный белковый компонент находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфического для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией. Необязательно, условный белковый компонент находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001447] Необязательно, клетка содержит условный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов. Необязательно, клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий условный промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более толерогенных факторов. Необязательно, условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией.

[001448] Необязательно, клетка содержит индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов. Необязательно, клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий индуцируемый промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более толерогенных факторов. Необязательно, индуцируемый

промотор, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001449] Необязательно, один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CD47, CI-ингибитора и IL-35. Необязательно, сконструированную клетку или гипоиммуногенную клетку конструируют так, чтобы она содержала индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47. Необязательно, клетка содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129. Необязательно, клетка содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:130. Необязательно, клетка экспрессирует увеличенное количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует увеличенное количество CD47 по сравнению с эталоном исходного уровня. В некоторых вариантах осуществления эталон исходного уровня представляет собой фоновый сигнал. В некоторых вариантах осуществления эталон исходного уровня представляет собой контрольный сигнал. В некоторых вариантах осуществления эталон исходного уровня представляет собой изотипический контрольный сигнал. В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество CD47 по сравнению с контролем. В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество CD47 по сравнению с контролем. В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем. В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 2,5 раза, примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз, примерно в 10 раз, примерно в 11 раз, примерно в 12 раз, примерно в 13 раз, примерно в 14 раз, примерно в 15 раз, примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле. В некоторых

вариантах осуществления Т-клетка экспрессирует по меньшей мере примерно 180 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 190 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 200 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 210 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 220 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 230 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 240 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 250 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 260 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 270 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 280 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 290 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 300 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 350 000, по меньшей мере примерно 400 000 молекул CD47 на клетку.

[001450] В рамках данного изобретения можно использовать любой подходящий способ количественного определения молекул, известный специалистам в данной области техники. Примеры способов, которые можно использовать для определения уровня экспрессии, включают, помимо прочего, способы на основе проточной цитометрии, способы на основе биотинилирования клеточной поверхности, способы на основе химотрипсина, способы на основе визуализации, способы на основе мечения антител, способы на основе поверхностного плазмонного резонанса и способы, описанные в Prasad et al., Methods Enzymol. 2010;484:179-95, и Drescher et al., Methods Mol Biol. 2009;493:323-43, оба из которых включены в дагный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии толерогенного фактора или CD47 определяют с использованием метода количественного анализа на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

[001451] Дополнительные модификации

[001452] Необязательно, клетка содержит сниженную экспрессию B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка не экспрессирует B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD. Необязательно, клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые увеличивают экспрессию одного или более экзогенных полинуклеотидов, кодирующих один или более из CD47 DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9. Необязательно, клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой

цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001453] Типы клеток

[001454] Необязательно, клетка получена из клетки человека или клетки животного. Необязательно, клетка человека или клетка животного представляет собой плюрипотентную стволовую клетку. Необязательно, плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC). Необязательно, клетка представляет собой дифференцированную клетку, полученную из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC). Необязательно, дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), эндотелиальной клетки, островковой клетки поджелудочной железы, клетки сердечной мышцы, гладкомышечной клетки, клетки скелетных мышц, гепатоцита, глиальной клетки-предшественника, дофаминергического нейрона, клетки пигментного эпителия сетчатки и клетки щитовидной железы. Необязательно, клетка представляет собой первичную имунную клетку или ее потомство.

[001455] Необязательно, первичная иммунная клетка или ее потомство представляет собой Т-клетку или NK-клетку. Необязательно, Т-клетка дополнительно характеризуется сниженной экспрессией Т-клеточного рецептора (TCR)-альфа и/или TCR-бета. Необязательно, Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа и/или TCR-бета. Необязательно, Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[001456] Сайты интеграции

[001457] Необязательно, первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вставлен в первый и/или второй специфический локус по меньшей мере одного аллеля клетки. Необязательно, первый и/или второй специфический локус выбран из группы, состоящей из безопасного локуса, целевого локуса, локуса RHD, локуса B2M, локуса CIITA, локуса TRAC и локуса TRB. Необязательно, безопасный локус выбран из группы, состоящей из локуса CCR5, локуса PPP1R12C, локуса Rosa и локуса CLYBL. Необязательно, целевой локус выбран из группы, состоящей из локуса CXCR4, локуса ALB, локуса SHS231,

локуса F3 (CD142), локуса MICA, локуса MICB, локуса LRP1 (CD91), локуса HMGB1, локуса ABO, локуса FUT1 и локуса KDM5D.

[001458] Необязательно, первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в сконструированную клетку или гипоиммуногенную клетку с использованием лентивирусного вектора. Необязательно, первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в сконструированную клетку или гипоиммуногенную клетку, используя фузоген-опосредованную доставку или систему на основе транспозазы, выбранную из группы, состоящей из кондициональных или индуцибельных транспозаз, кондициональных или индуцибельных транспозонов PiggyBac, кондициональных или индуцибельных транспозонов Sleeping Beauty (SB11), кондициональных или индуцибельных транспозонов Mos1 и кондициональных или индуцибельных транспозонов Tol2.

[001459] Ответ у пациента

[001460] Необязательно, клетки избегают цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту. Необязательно, клетки защищены от клеточного лизиса зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту. Необязательно, клетки избегают поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту. Необязательно, клетки не индуцируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту. Необязательно, клетки не индуцируют иммунный ответ на основе антител на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[001461] Дополнительные клетки

[001462] Создают сконструированную клетку, содержащую регулируемые модификации, увеличивающие экспрессию CD47, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций

[001463] Создают гипоиммуногенную клетку, содержащую регулируемые модификации, увеличивающие экспрессию CD47, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций

[001464] Необязательно, сконструированная или гипоиммуногенная клетка содержит условный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47. Необязательно, клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий условный промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий карго-полинуклеотид, кодирующий CD47. Необязательно, условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией. Необязательно, клетка содержит индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47. Необязательно, клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий индуцируемый промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий CD47. Необязательно, индуцируемый промотор,

который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером. Необязательно, экзогенный полинуклеотид клетки содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13. Необязательно, клетка содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14.

[001465] Необязательно, клетка экспрессирует увеличенное количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001466] Необязательно, клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка содержит регулируемый нокаут одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II. Необязательно, регулируемые модификации включают регулируемое снижение экспрессии одной или более мишеней, выбранных из B2M и CIITA, по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, регулируемые модификации включают регулируемое выведение одной или более мишеней, выбранных из B2M и CIITA. Необязательно, клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые снижают или нокаутируют экспрессию одного или более генов Y-хромосомы. Необязательно, клетка содержит регулируемые модификации, которые снижают или нокаутируют экспрессию одной или более мишеней, выбранных из Y-сцепленного протокадгерина-11 и Y-сцепленного нейролигина-4, относительно клетки того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001467] Необязательно, регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый компонент на основе РНК для снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, условный или индуцируемый компонент на основе РНК выбирают из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi). Необязательно, условный компонент

на основе РНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфического для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией. Необязательно, индуцируемый компонент на основе РНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001468] Необязательно, регулируемые модификации включают условный или индуцируемый компонент на основе ДНК для снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, условный или индуцируемый компонент на основе ДНК представляет собой нокаут с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз и условных или индуцируемых мегануклеаз. Необязательно, условный компонент на основе ДНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфического для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией. Необязательно, условный компонент на основе ДНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001469] Необязательно, регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый белковый компонент для снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по отношению к клетке того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, условный или индуцируемый белковый компонент представляет собой способ условного или индуцируемого дегрона. Необязательно, способ условного или индуцируемого дегрона выбран из группы, состоящей из индуцированной лигандом деградации (LID) с использованием метки SMASH, LID с использованием Shield-1, LID с использованием ауксина, LID с использованием рапамицина, условных или индуцируемых пептидных дегронов (*например*, дегронов на основе IKZF3) и условных или индуцируемых химер, нацеленных на протеолиз (PROTAC). Необязательно, условный белковый компонент находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфического для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией. Необязательно, условный белковый компонент находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

[001470] Необязательно, клетка дополнительно содержит условный промотор,

функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более дополнительных толерогенных факторов. Необязательно, клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий условный промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более дополнительных толерогенных факторов. Необязательно, условный промотор представляет собой специфичный для клеточного цикла промотор, тканеспецифичный промотор, специфичный для линии промотор или промотор, индуцируемый дифференциацией. Необязательно, клетка содержит индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более дополнительных толерогенных факторов. Необязательно, клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий индуцируемый промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более дополнительных толерогенных факторов. Необязательно, индуцируемый промотор, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером. Необязательно, один или более дополнительных толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CI-ингибитора и IL-35.

[001471] Необязательно, клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые снижают экспрессию B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка не экспрессирует B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

[001472] Необязательно, клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые увеличивают экспрессию одного или более из CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9, по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, Fc-рецептора CD16, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 100%, 200%,

300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, клетка экспрессирует количество CD47, DUX4, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитора C1, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, CD16, CD52, H2-M3, CD16 Fc-рецептора, IL15-RF и/или Serpinb9 по меньшей мере примерно на 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которая не содержит модификаций.

[001473] Необязательно, клетка получена из клетки человека или клетки животного. Необязательно, клетка человека или клетка животного представляет собой плюрипотентную стволовую клетку. Необязательно, плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC). Необязательно, сконструированная клетка или гипоиммуногенная клетка представляет собой дифференцированную клетку, полученную из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства. Необязательно, плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC). Необязательно, дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), эндотелиальной клетки, островковой клетки поджелудочной железы, клетки сердечной мышцы, гладкомышечной клетки, клетки скелетных мышц, гепатоцита, глиальной клетки-предшественника, дофаминергического нейрона, клетки пигментного эпителия сетчатки и клетки щитовидной железы. Необязательно, сконструированная клетка или гипоиммуногенная клетка представляет собой первичную иммунную клетку или ее потомство. Необязательно, первичная иммунная клетка или ее потомство представляет собой Т-клетку или NK-клетку. Необязательно, Т-клетка дополнительно характеризуется сниженной экспрессией Т-клеточного рецептора (TCR)-альфа и/или TCR-бета. Необязательно, Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа и/или TCR-бета. Необязательно, Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR). Необязательно, первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вставлен в первый и/или второй специфический локус по меньшей мере одного аллеля клетки.

[001474] Необязательно, первый и/или второй специфический локус выбран из группы, состоящей из безопасного локуса, целевого локуса, локуса *RHD*, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*. Необязательно, безопасный локус выбран из группы, состоящей из локуса *CCR5*, локуса *PPP1R12C*, локуса *Rosa* и локуса *CLYBL*. Необязательно, целевой локус выбран из группы, состоящей из локуса *CXCR4*, локуса *ALB*, локуса *SHS231*, локуса *F3* (*CD142*), локуса *MICA*, локуса *MICB*, локуса *LRP1* (*CD91*), локуса *HMGB1*, локуса *ABO*, локуса *FUT1* и локуса *KDM5D*. Необязательно, первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в сконструированную клетку или гипоиммуногенную клетку с использованием лентивирусного вектора. Необязательно,

первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в сконструированную клетку или гипоиммуногенную клетку, используя фузоген-опосредованную доставку или систему на основе транспозазы, выбранную из группы, состоящей из кондициональных или индуцибельных транспозаз, кондициональных или индуцибельных транспозонов PiggyBac, кондициональных или индуцибельных транспозонов Sleeping Beauty (SB11), кондициональных или индуцибельных транспозонов Mos1 и кондициональных или индуцибельных транспозонов Tol2.

[001475] Необязательно, дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство избегают цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту. Необязательно, дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство защищены от лизиса клеток зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту. Необязательно, дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство избегают поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту. Необязательно, дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство не индуцируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту. Необязательно, дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка, или ее потомство не индуцируют основанный на антителах иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту.

[001476] Создают сконструированную эндотелиальную клетку, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с эндотелиальной клеткой, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом эндотелиальная клетка получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001477] Создают сконструированную островковую клетку поджелудочной железы, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с островковой клеткой поджелудочной железы, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом островковая клетка поджелудочной железы получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001478] Создают сконструированную клетку сердечной мышцы, содержащую

регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с клеткой сердечной мышцы, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом клетка сердечной мышцы получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001479] Создают сконструированную гладкомышечную клетку, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с гладкомышечной клеткой, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом гладкомышечная клетка получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001480] Создают сконструированную клетку скелетных мышц, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с клеткой скелетных мышц, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом клетка скелетных мышц получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001481] Создают сконструированный гепатоцит, содержащий регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с гепатоцитом, который не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом гепатоцит получен из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001482] Создают сконструированную глиальную клетку-предшественника, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с глиальной клеткой-предшественником, которая не содержит модификаций, при этом

клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом глиальная клетка-предшественник получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001483] Создают сконструированный дофаминергический нейрон, содержащий регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с дофаминергическим нейроном, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом дофаминергический нейрон получен из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001484] Создают сконструированную клетку пигментного эпителия сетчатки, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с клеткой пигментного эпителия сетчатки, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом клетка пигментного эпителия сетчатки получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001485] Создают сконструированную клетку щитовидной железы, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с клеткой щитовидной железы, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, и при этом клетка щитовидной железы получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства.

[001486] Создают сконструированную Т-клетку, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с Т-клеткой, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%,

500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, при этом Т-клетка необязательно дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR), и при этом Т-клетка получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства, или Т-клетка представляет собой первичную иммунную клетку или ее потомство.

[001487] Сконструированная NK-клетка, содержащая регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и ГКГС класса II, и/или ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с NK-клеткой, которая не содержит модификаций, при этом клетка экспрессирует количество CD47 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% выше по сравнению с клеткой того же типа клеток, которые не содержат модификации, при этом NK-клетка необязательно дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR), и при этом NK-клетка получена из плюрипотентной стволовой клетки или ее потомства, или NK-клетка представляет собой первичную иммунную клетку или ее потомство.

[001488] Фармацевтические композиции

[001489] Клетки могут быть включены в фармацевтическую композицию. Необязательно, фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток или гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемую добавку, носитель, разбавитель или эксципиент.

[001490] Способы лечения

[001491] Клетки можно использовать в способах лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия. Необязательно, способ включает введение пациенту популяции сконструированных клеток или гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе. Необязательно, способ включает введение пациенту популяции дифференцированный клеток, описанных в данном документе. Необязательно, дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из Т-клеток, естественных клеток-киллеров (NK), эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток сердечной мышцы, гладкомышечных клеток, клеток скелетных мышц, гепатоцитов, глиальных клеток-предшественников, дофаминергических нейронов, клеток пигментного эпителия сетчатки и клеток щитовидной железы.

[001492] Методы получения клеток

[001493] Сконструированную клетку, содержащую регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с

клеткой тот же типа клеток, которая не содержит модификаций, создают путем:

(a) получение выделенной клетки;

(b) введение в клетку условного или индуцируемого компонента на основе РНК для регулируемой сниженной экспрессии одной или более мишеней, условного или индуцируемого компонента на основе ДНК для регулируемого снижения экспрессии одной или более мишеней или условного или индуцируемого белкового компонента для регулируемого снижения экспрессии одной или более мишеней;

(c) воздействие на клетку условий или экзогенного фактора для активации условного или индуцируемого способа, тем самым вызывая снижение экспрессии молекул человеческого лейкоцитарного антигена ГКГС класса I и/или ГКГС класса II;

(d) введение в выделенную клетку нуклеиновой кислоты, содержащей условный или индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов; и

(e) воздействие на сконструированную клетку условия или экзогенного фактора для активации условного или индуцируемого промотора, тем самым вызывая экспрессию экзогенного одного или более толерогенных факторов, что позволяет получить сконструированную клетку.

[001494] Необязательно, этапы (a)-(d) выполняют в любом порядке. Необязательно, один или более этапов (a)-(d) выполняют одновременно. Необязательно, этапы (b) и (c) выполняют перед этапами (d) и (e). Необязательно, этапы (d) и (e) выполняют перед этапами (b) и (c). Необязательно, этапы (c) и (e) выполняют последовательно. Необязательно, этапы (c) и (e) выполняют одновременно.

[001495] Способы определения пороговых уровней CD47

[001496] Осуществляется способ определения порогового уровня экспрессии CD47, необходимого для уклонения от иммунного ответа гипоиммуногенных клеток, включающий:

(a) получение сконструированных клеток, содержащих первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47;

(b) сортировку сконструированных клеток на основе уровней экспрессии CD47 для создания пулов клеток, имеющих сходные уровни экспрессии CD47;

(c) оценку иммунного ответа, индуцированного пулами клеток; и

(d) определение порогового уровня экспрессии CD47, необходимого для уклонения от иммунного ответа.

[001497] Необязательно, стадия (a) способа дополнительно включает конструирование клеток, которые содержат сниженную экспрессию одного или более генов Y-хромосомы и молекул человеческого лейкоцитарного антигена главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I и/или класса II по сравнению с клеткой тот же тип клеток, которая не содержит модификаций. Необязательно, оценку иммунного ответа проводят с использованием анализов in vitro или анализов in vivo, включая, помимо прочего, способы на основе проточной цитометрии, способы на основе антител

(обнаружение донор-специфических антител, ИФА, анализ вестерн-блоттинг, стандартные способы обнаружения антител), анализы на основе уничтожения клеток, анализы на основе активации иммунных клеток. Необязательно, оценку иммунного ответа проводят путем измерения цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, лизиса зрелыми NK-клетками, поглощения макрофагами, иммунного ответа на клетки на основе антител или путем измерения процента клеток, все еще присутствующих у реципиента через определенный период времени после введения пациенту-реципиенту.

Пример 3: Снижение экспрессии ГКГС-II и увеличение экспрессии CD47 в первичных островковых клетках поджелудочной железы

[001498] Первичные островковые бета-клетки мышей C57BL/6 (B6) с нокаутом B2M (гаплотип ГКГС $H2^b$) трансдуцировали лентивирусным вектором, содержащим трансген CD47, для получения первичных островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg*. Диапазон MOI был протестирован на частицах лентивируса, несущих трансгены кДНК CD47. Через 24 часа вирус был удален и произведена полная замена среды. Клетки подвергали сортировке с использованием флуоресцентно-меченного антитела к CD47 с использованием стандартной системы FACS.

[001499] Первичные островковые клетки $B2M^{-/-}$, выделенные от мышей C57BL/6 (B6), не экспрессируют в природе молекулы ГКГС-II, и молекулы ГКГС-II не активируются после стимуляции. Поверхностная экспрессия одного или более ГКГС-I, ГКГС-II и CD47 на первичных островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg* оценивали способои на овнове проточной цитометрии с использованием реагентов, специфичных для антител. В качестве контроля использовали изотипические антитела. Оценивали эффект изменения уровней белка CD47 в островковых бета-клетках $B2M^{-/-}$; CD47*tg* и способность клеток уклоняться от иммунных ответов.

[001500] Чтобы определить пороговые уровни CD47, необходимые первичным островковым бета-клеткам для предотвращения опосредованного NK-клетками уничтожения клеток, уровни экспрессии CD47 в островковковых бета-клетках $B2M^{-/-}$; CD47*tg* по сравнению с изотипическим контролем анализировали параллельно с уничтожением NK-клетками мыши. Островковые бета-клетки $B2M^{-/-}$; CD47*tg* анализировали методом проточной цитометрии (с использованием стандартных методов). Клетки блокировали антителами к Fc-рецептору и окрашивали антителом к CD47, концентрация которого соответствовала изотипическому контролю. Как показано на Фиг. 1A-1N, островковые бета-клетки $B2M^{-/-}$; CD47*tg* экспрессировали различные уровни CD47 по сравнению с исходным уровнем. Анализы уничтожения NK-клеткками с использованием NK-клеток мыши проводили на платформе XCelligence MP (ACEA BioSciences, Сан-Диего, Калифорния). Как показано на Фиг. 1A-1N, уничтожение NK-клетками наблюдалась для островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg*, экспрессирующих CD47 в 6,2 раза, 8,9 раз, 11,7 раз или 15,3 раза выше исходного уровня. Напротив, уничтожения NK-клетками не наблюдалось для островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg*, экспрессирующих CD47 в 19,1 раз, 38,4 раза или 72,5 раза выше исходного уровня.

Данные показывают, что мышиные первичные островковые бета-клетки B2M$^{-/-}$; CD47*tg*, которые экспрессируют CD47 на пороговом или более высоком уровне, уклоняются от иммунного ответа NK-клеток. Такие первичные мышиные островковые бета-клетки, имеющие экспрессию CD47 ниже в 15,3 раза или менее по сравнению с исходным уровнем, были уничтожены NK-клетками мыши, в то время как первичные мышиные островковые клетки, имеющие экспрессию CD47 выше в 19,1 раз или более по сравнению с исходным уровнем, не были уничтожены NK-клетками мыши.

Пример 4: Снижение экспрессии ГКГС-I/II и увеличение экспрессии CD47 в Т-клетках

[001501] Гранулы BD Quantibrite™ использовали для оценки общего количества молекул CD47 в первичных Т-клетках человека B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg*. Оценивали влияние различных уровней белка CD47 в первичных Т-клетках человека B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg* на способность клеток уклоняться от иммунных ответов.

[001502] Чтобы определить пороговые уровни CD47, необходимые Т-клеткам для уклонения от опосредованного NK-клетками уничтожения клеток, анализы уничтожения NK-клетками и макрофагаим проводили на платформе XCelligence MP (ACEA BioSciences, Сан-Диего, Калифорния) с модифицированными первичными Т-клетками, содержащими различное количество молекул CD47 на клетку. Как показано на Фиг. 2A-2AB, уничтожение NK-клетками и макрофагами наблюдалось для Т-клеток B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$, экспрессирующих эндогенные уровни CD47 в количестве 53 118 или 64 778 молекул на клетку, а также для Т-клеток B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg*, экспрессирующих уровни CD47 в количестве 131 534 молекулы на клетку (примерно в 2-2,5 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 100-150% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 95 893 молекулы на клетку (примерно в 1,5-1,8 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 50-80% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками),135 284 молекул на клетку (примерно в 2,1-2,5 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 110-150% большее количества CD47 по сравнению с контрольными клетками), 168 751 молекула на клетку (примерно в 2,6-3,2 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 160-220% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), или 179 236 молекул на клетку (примерно в 2,8-3,4 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 180-240% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками). Напротив, уничтожение NK-клетками не наблюдалось для Т-клеток B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$;CD47*tg*, экспрессирующих уровни CD47 в количестве 222 777 молекул на клетку (примерно в 3,4-4,2 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 240-320% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 290 942 молекулы на клетку (примерно в 4,5-5,5 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или

примерно на 350-450% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 369 671 молекула на клетку (примерно в 5,7-7 раз выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 470-600% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 415 996 молекул на клетку (примерно в 6,4-7,8 раз выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 540-680% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 439 189 молекул на клетку (примерно в 6,8-8,3 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 580-730% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 585 377 молекул на клетку (примерно в 9-11 раз выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 800-1000% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), или 689 168 молекул на клетку (примерно в 10,6-13 раз выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 960-1200% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками).

[001503] Данные показывают, что первичные Т-клетки $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$;CD47*tg*, которые экспрессируют CD47 на пороговом или более высоком уровне, уклоняются от иммунного ответа NK-клеток. Такие Т-клетки, имеющие 179 236 или менее молекул CD47 на клетку, были уничтожены NK-клетками и макрофагами, в то время как Т-клетки, имеющие 222 777 или более молекул CD47 на клетку не были уничтожены NK-клетками или макрофагами.

Пример 5: Снижение экспрессии ГКГС-II и увеличение экспрессии CD47 в первичных островковых клетках поджелудочной железы человека

[001504] Гранулы BD Quantibrite™ использовали для оценки общего количества молекул CD47 в первичных островковых бета-клетках человека $B2M^{-/-}$; CD47*tg*. Оценивали влияние различных уровней белка CD47 на способность первичных островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg* уклоняться от иммунных ответов.

[001505] Чтобы определить пороговые уровни CD47, необходимые островковым клеткам для уклонения от опосредованного NK-клетками уничтожения клеток, анализы уничтожения NK-клетками проводили на платформе XCelligence MP (ACEA BioSciences, Сан-Диего, Калифорния) с модифицированными первичными островковыми клетками, содержащими различное количество молекул CD47 на клетку.

[001506] Как показано на Фиг. 3A-3L, уничтожение NK-клетками наблюдалось для первичных островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg*, экспрессирующих эндогенные уровни CD47 в количестве 53 174 или 60 410 молекул на клетку, а также для первичных островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg*, экспрессирующих 91 558 молекул на клетку (примерно в 1,7 или 1,5 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 70% или 50% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 109 366 молекул на клетку (примерно в 2 или 1,8 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или

примерно на 100% или 80% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 152 475 молекул на клетку (примерно в 3 или 2,5 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 200% или 150% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками) и 184 773 молекулы на клетку (примерно в 3,5 или 3 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 250% или 200% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками). Напротив, уничтожение NK-клетками не наблюдалось для первичных островковых бета-клеток $B2M^{-/-}$; CD47*tg*, экспрессирующих уровни CD47 в количестве 203 853 молекул на клетку (приблизительно в 3,8 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 280% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 226 566 молекул на клетку (примерно в 4,3 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 330% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 271 191 молекула на клетку (примерно в 5 раз выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 400% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 297 154 молекулы на клетку (примерно в 5,6 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 460% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками), 572 920 молекул на клетку (примерно в 10,8 раз выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 980% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками) или 802 429 молекул на клетку (примерно в 15,1 раза выше эндогенного уровня CD47, экспрессируемого в контрольных клетках, или примерно на 1410% большее количество CD47 по сравнению с контрольными клетками).

[001507] Данные показывают, что первичные островковые бета-клетки человека $B2M^{-/-}$; CD47*tg*, которые экспрессируют CD47 на пороговом или более высоком уровне, уклоняются от иммунного ответа NK-клеток. Такие островковые клетки, имеющие 184 773 или менее молекул CD47 на клетку, были уничтожены NK-клетками, в то время как островковые клетки, имеющие 203 853 или более молекул CD47 на клетку не были уничтожены NK-клетками.

Пример 6: Редактирование первичных клеток RPE человека

[001508] Немодифицированные первичные клетки пигментного эпителия сетчатки человека (RPE) экспрессируют HLA-I, не экспрессируют HLA-II и имеют низкий уровень CD47 (см., например, Фиг. 4A-4C).

[001509] Первичные клетки RPE человека трансдуцировали лентивирусным вектором, содержащим трансген CD47, для получения первичных клеток RPE $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; CD47*tg*. Диапазон MOI был протестирован на частицах лентивируса, несущих трансгены кДНК CD47. Через 24 часа вирус был удален и произведена полная замена среды. Клетки подвергали сортировке с использованием флуоресцентно-меченного антитела к CD47 с использованием стандартной системы FACS.

[001510] Поверхностную экспрессию одного или более HLA-I, HLA-II и CD47 на первичных RPE $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; CD47*tg* оценивали методом проточной цитометрии с использованием специфичных для антител реагентов. В качестве контроля использовали изотипические антитела. См. Фиг. 5A-5D.

[001511] Оценивали влияние изменения уровня белка CD47 в клетках RPE $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; CD47*tg* и способность клеток уклоняться от иммунного ответа.

[001512] Уровни экспрессии CD47 в немодифицированных, первичных клетках RPE $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$ (dKO) и $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; CD47*tg* (HIP) по сравнению с изотипическим контролем анализировали параллельно с оценкой уничтожения NK-клетками и макрофагами. Клетки RPE анализировали методом проточной цитометрии (с использованием стандартных методов). Клетки блокировали антителами к Fc-рецептору и окрашивали антителом к CD47, концентрация которого соответствовала изотипическому контролю. Как показано на Фиг. 6A-6I, клетки RPE $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$ (dKO) экспрессируют уровени, примерно в 1,8 раз превышающие уровени CD47 по сравнению с исходным уровнем, а клетки RPE $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; CD47*tg* (HIP) экспрессируют уровни, примерно в 20 раз превышающие уровени CD47 по сравнению с исходным уровнем. Анализы уничтожения NK-клетками и макрофагами проводили на платформе XCelligence MP (ACEA BioSciences, Сан-Диего, Калифорния). Как показано на Фиг. 7A-7I, уничтожение NK и макрофагами наблюдалось для RPE dKO, но не для RPE HIP.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

2. Сконструированная клетка, содержащая регулируемые модификации, которые увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем.

3. Сконструированная клетка по п. 1 или п. 2, причем сконструированная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки (PSC), индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC), мезенхимальной стволовой клетки (MSC), гемопоэтической стволовой клетки (HSC), эмбриональной стволовой клетки (ESC), островковой клетки поджелудочной железы, островковой бета-клетки, иммунной клетки, B-клетки, T-клетки, естественной клетки-киллера (NK), естественной T-клетки-киллера (NKT), макрофагальной клетки, иммунопривилегированной клетки, зрительной клетки, клетки пигментированного эпителия сетчатки (RPE), гепатоцита, клетки щитовидной железы, эндотелиальной клетки, клетки кожи, глиальной клетки-предшественника, нейрональной клетки, мышечной клетки, сердечной клетки и клетки крови.

4. Сконструированная островковая клетка поджелудочной железы, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

5. Сконструированная островковая клетка поджелудочной железы по п. 4, причем островковая клетка поджелудочной железы представляет собой островковую бета-клетку.

6. Сконструированная эндотелиальная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

7. Сконструированная клетка сердечной мышцы, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

8. Сконструированная гладкомышечная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

9. Сконструированная клетка скелетных мышц, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом

сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

10. Сконструированный гепатоцит, содержащий модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

11. Сконструированная глиальная клетка-предшественник, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

12. Сконструированный дофаминергический нейрон, содержащий модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

13. Сконструированная иммуннопривилегированная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

14. Сконструированная клетка пигментного эпителия сетчатки, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

15. Сконструированная клетка щитовидной железы, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

16. Сконструированная иммунная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

17. Сконструированная иммунная клетка по п. 16, причем сконструированная иммунная клетка содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

18. Сконструированная Т-клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

19. Сконструированная Т-клетка по п. 18, причем сконструированная Т-клетка

содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

20. Сконструированная NK-клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

21. Сконструированная Т-клетка по п. 20, причем сконструированная Т-клетка содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

22. Сконструированная макрофагальная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует CD47 на пороговом или более высоком уровне.

23. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-22, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно одинаковое количество CD47 по сравнению с контролем.

24. Сконструированная островковая клетка поджелудочной железы по п. 23, причем клетка представляет собой иммуннопривилегированную клетку.

25. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

26. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-25, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

27. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-26, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

28. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-27, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

29. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

30. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24 или 29, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

31. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24, 29 или 30, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз или примерно в 5,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

32. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24 или 29-31, причем клетка

экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

33. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24 или 29-32, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

34. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24 или 29-33, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

35. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24 или 29-34, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 5,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

36. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24 или 29-35, опричем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

37. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-36, причем контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

38. Сконструированная клетка по п. 37, причем контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

39. Сконструированная клетка по п. 37 или п. 38, причем контрольная клетка представляют собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

40. Сконструированная клетка по п. 37, причем эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

41. Сконструированная клетка по п. 37 или п. 40, причем исходный уровень представляет собой изотипический контроль, при этом необязательно уровень CD47 определяют с помощью анализа на основе антител.

42. Сконструированная клетка по п. 41, причем уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

43. Сконструированная клетка по любому из пп. 40-42, отличающаяся тем, чтопричем сконструированная клетка представляет собой островковую бета-клетку, которая экспрессирует по меньшей мере около 200 000, 250 000, 300 000, 350 000 или 400 000 молекул CD47 на клетку.

44. Сконструированная клетка по любому из пп. 40-42, причем сконструированная клетка представляет собой клетку пигментного эпителия сетчатки, которая экспрессирует по меньшей мере примерно в 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7

раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 12 раз, 14 раз, 16 раз, 18 раз, 20 раз или более высокое увеличение экспрессии CD47 по сравнению с исходным уровнем.

45. Сконструированная клетка по любому из пп. 40-42, причем сконструированная клетка представляет собой Т-клетку, которая экспрессирует по меньшей мере примерно 180 000, 190 000, 200 000, 210 000, 220 000, 230 000, 240 000, 250 000, 260 000, 270 000, 280 000, 290 000, 300 000, 350 000, 400 000, 450 000, 500 000, 550 000, 600 000, 650 000 или 700 000 молекул CD47 на клетку.

46. Сконструированная клетка, содержащая модификации, которые i) снижают экспрессию одного или более антигенов человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и/или ГКГС класса II и ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с контролем, при этом сконструированная клетка экспрессирует толерогенный фактор на пороговом уровне или более высоком уровне.

47. Сконструированная клетка по п. 46, причем сконструированная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки (PSC), индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC), мезенхимальной стволовой клетки (MSC), гемопоэтической стволовой клетки (HSC), эмбриональной стволовой клетки (ESC), островковой клетки поджелудочной железы, островковой бета-клетки, иммунной клетки, В-клетки, Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), естественной Т-клетки-киллера (NKT), макрофагальной клетки, иммунопривилегированной клетки, зрительной клетки, клетки пигментированного эпителия сетчатки (RPE), гепатоцита, клетки щитовидной железы, эндотелиальной клетки, клетки кожи, глиальной клетки-предшественника, нейрональной клетки, мышечной клетки, сердечной клетки и клетки крови.

48. Сконструированная клетка по п. 46 или п. 47, причем контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

49. Сконструированная клетка по п. 48, причем контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

50. Сконструированная клетка по п. 48 или п. 49, причем контрольная клетка представляют собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

51. Сконструированная клетка по п. 48, причем эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

52. Сконструированная клетка по п. 48 или п. 51, причем исходный уровень представляет собой изотипический контроль, необязательно при этом количество толерогенного фактора определяют с помощью анализа на основе антител.

53. Сконструированная клетка по п. 52, причем количество толерогенного фактора определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

54. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-53, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно одинаковое количество толерогенного фактора по сравнению с контролем.

55. Сконструированная островковая клетка поджелудочной железы по п. 54, причем клетка представляет собой иммунноприви легированную клетку.

56. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-55, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество толерогенного фактора по сравнению с контролем.

57. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-56, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% более высокий уровень толерогенного фактора по сравнению с контролем.

58. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-57, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% более высокий уровень толерогенного фактора по сравнению с контролем.

59. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-58, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество толерогенного фактора по сравнению с контролем.

60. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-55, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

61. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-55 или 60, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

62. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-55, 60 или 61, причем клетка экспрессирует уровень по меньшей мере примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз или примерно в 5,5 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

63. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-55 или 60-62, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

64. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-55 или 60-63, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 4,5 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

65. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-55 или 60-64, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 5 раза превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

66. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-55 или 60-65, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 5,5 раза превышающий уровень

толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

67. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-55 или 60-66, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень толерогенного фактора, экспрессируемый в контроле.

68. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-67, отличающаяся тем, что модификации снижают экспрессию:

молекулы ГКГС класса I;

молекулы ГКГС класса II; или

молекулы ГКГС класса I и молекула ГКГС класса II.

69. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-68, отличающаяся тем, что модификации снижают экспрессию одного или более из B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B и/или NFY-C по сравнению с контролем.

70. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-66, причем клетка не экспрессирует молекулу ГКГС класса I и/или молекулу ГКГС класса II.

71. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-70, причем клетка не экспрессирует один или более из B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B и/или NFY-C по сравнению с контролем.

72. Сконструированная клетка по п. 71, отличающаяся тем, что модификации включают нокаут одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA. -DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B и/или NFY-C.

73. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-72, отличающаяся тем, что модификации снижают экспрессию одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M, TAP1, NLRC5 и/или CIITA.

74. Сконструированная клетка по п. 73, отличающаяся тем, что модификации включают нокаут одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M, TAP1, NLRC5 и/или CIITA.

75. Сконструированная клетка по п. 72 или п. 74, отличающаяся тем, что нокаут происходит в обоих аллелях.

76. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-75, причем клетка дополнительно содержит одну или более модификаций, которые снижают экспрессию CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, белка, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с контролем.

77. Сконструированная клетка по п. 76, отличающаяся тем, что белок, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, выбран из группы, состоящей из белка, взаимодействующего с тиоредоксином (TXNIP), PKR-подобной ЭПР-киназы (PERK),

инозитол-требующего фермента 1α (IRE1α) и DJ-1 (PARK7).

78. Сконструированная клетка по п. 76 или п. 77, отличающаяся тем, что модификации включают нокаут одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, белка, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

79. Сконструированная клетка по п. 78, отличающаяся тем, что нокаут происходит в обоих аллелях.

80. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-79, отличающаяся тем, что модификации снижают экспрессию B2M.

81. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-79, отличающаяся тем, что модификации снижают экспрессию CIITA.

82. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-79, отличающаяся тем, что модификации снижают экспрессию B2M и CIITA.

83. Сконструированная клетка по любому из пп. 80-82, отличающаяся тем, что модификации включают нокаут B2M и/или CIITA.

84. Сконструированная клетка по п. 83, отличающаяся тем, что нокаут B2M и/или CIITA происходит в обоих аллелях.

85. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-84, отличающаяся тем, что модификации снижают экспрессию лиганда NK-клетки, необязательно MIC-A и/или MIC-B.

86. Сконструированная клетка по п. 85, отличающаяся тем, что модификации включают нокаут MIC-A и/или MIC-B.

87. Сконструированная клетка по п. 86, отличающаяся тем, что нокаут MIC-A и/или MIC-B происходит в обоих аллелях.

88. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-87, причем клетка дополнительно содержит модификацию, которая снижает экспрессию одного или более генов Y-хромосомы по сравнению с контролем.

89. Сконструированная клетка по п. 88, отличающаяся тем, что один или более генов Y-хромосомы выбраны из группы, состоящей из Y-сцепленного протокадгерина-11 и Y-сцепленного нейролигина-4.

90. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-89, отличающаяся тем, что модификации снижают экспрессию TXNIP.

91. Сконструированная клетка по п. 90, отличающаяся тем, что модификации включают нокаут TXNIP.

92. Сконструированная клетка по п. 91, отличающаяся тем, что нокаут TXNIP происходит в обоих аллелях.

93. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-92, причем клетка дополнительно содержит модификации, которые снижают экспрессию B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-

DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, белка, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

94. Сконструированная клетка по п. 92, причем клетка не экспрессирует B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, белок, который участвует в окислительном или ЭПР-стрессе, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

95. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-92, причем клетка дополнительно содержит модификации, которые снижают экспрессию B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с контролем.

96. Сконструированная клетка по п. 95, причем клетка не экспрессирует B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

97. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-45, причем клетка содержит дополнительные модификации, которые снижают экспрессию одного или более толерогенных факторов.

98. Сконструированная клетка по п. 97, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из A20/TNFAIP3, C1-ингибитора, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9.

99. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из A20/TNFAIP3, C1-ингибитора, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9.

100. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 99, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат CD47.

101. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-100, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат HLA-E.

102. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-101, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат CD24.

103. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-102, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат PD-L1.

104. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-103, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат CD46.

105. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-104, отличающаяся

тем, что один или более толерогенных факторов содержат CD55.

106. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-105, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат CD59.

107. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-106, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат CR1.

108. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-107, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат MANF.

109. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-108, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат A20/TNFAIP3.

110. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-109, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат HLA-E и CD47.

111. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-110, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат один или более из CD24, CD47 и/или PDL1.

112. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-111, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат один или более из HLA-E, CD24, CD47 и/или PDL1.

113. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-112, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат один или более из CD46, CD55, CD59 и/или CR1.

114. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-113, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат один или более из HLA-E, CD46, CD55, CD59 и/или CR1.

115. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-114, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат один или более из HLA-E, CD24, CD47, PDL1, CD46, CD55, CD59 и/или CR1.

116. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-115, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат HLA-E и PDL1.

117. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-116, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат один или более из HLA-E, PDL1 и/или A20/TNFAIP.

118. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-117, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат один или более из HLA-E, PDL1 и/или MANF.

119. Сконструированная клетка по любому из пп. 46-67 и 97-118, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов содержат один или более из HLA-E, PDL1, A20/TNFAIP и/или MANF.

120. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-99, отличающаяся тем, что модификации:

снижают экспрессию молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II;

снижают экспрессию MIC-A и/или MIC-B;

увеличивают экспрессию CD47 и, необязательно, CD24 и PD-L1; и

увеличивают экспрессию CD46, CD55, CD59 и CR1.

121. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-99, отличающаяся тем, что модификация:

снижает экспрессию молекулы ГКГС класса I;

снижают экспрессию MIC-A и/или MIC-B;

снижает экспрессию TXNIP; и

увеличивает экспрессию PD-L1 и HLA-E.

122. Сконструированная клетка по п. 121, отличающаяся тем, что модификации дополнительно увеличивают экспрессию A20/TNFAIP3 и MANF.

123. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-122, причем клетка получена из клетки человека или клетки животного.

124. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-123, причем клетка представляет собой дифференцированную клетку, полученную из стволовой клетки или ее потомства.

125. Сконструированная клетка по п. 124, отличающаяся тем, что стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC), мезенхимальной стволовой клетки (MSC), гемопоэтической стволовой клетки (HSC) и эмбриональной стволовой клетки (ESC).

126. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-125, причем клетка получена из первичной клетки или ее потомства.

127. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-126, причем клетка избегает цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту.

128. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-127, причем клетка защищена от клеточного лизиса зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту.

129. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-128, причем клетка избегает поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту.

130. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-129, причем клетка не индуцирует врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту.

131. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-130, причем клетка не индуцирует иммунный ответ на основе антител на клетку при введении пациенту-реципиенту.

132. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-131, отличающаяся тем, что одна или более модификаций представляют собой регулируемую модификацию.

133. Сконструированная клетка, содержащая одну или более регулируемых модификаций для изменения экспрессии одной или более мишеней в сконструированной клетке по сравнению с контролем, необязательно при этом одна или более регулируемых модификаций увеличивают экспрессию CD47 по сравнению с контролем.

134. Сконструированная клетка по п. 132 или п. 133, отличающаяся тем, что одна или более регулируемых модификаций содержат условный или индуцируемый компонент на основе РНК для i) увеличения или ii) снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по сравнению с контролем.

135. Сконструированная клетка по п. 134, отличающаяся тем, что условный или индуцируемый компонент на основе РНК выбран из группы, состоящей из условных или индуцируемых кшРНК, условных или индуцируемых миРНК, условных или индуцируемых микроРНК и условной или индуцируемой интерференции CRISPR (CRISPRi).

136. Сконструированная клетка по п. 134 или п. 135, отличающаяся тем, что условный компонент на основе РНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

137. Сконструированная клетка по п. 134 или п. 135, отличающаяся тем, что индуцируемый компонент на основе РНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

138. Сконструированная клетка по п. 132 или п. 133, отличающаяся тем, что регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый компонент на основе ДНК для i) увеличения или ii) снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по сравнению с контролем.

139. Сконструированная клетка по п. 138, отличающаяся тем, что условный или индуцируемый компонент на основе ДНК выбран из группы, состоящей из условных или индуцируемых CRISPR, условных или индуцируемых TALEN, условных или индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, условных или индуцируемых хоминг-эндонуклеаз, условного или индуцируемого прайм-редактирования, условного или индуцируемое редактирование PASTE и условных или индуцируемых мегануклеаз.

140. Сконструированная клетка по п. 138 или п. 139, отличающаяся тем, что условный компонент на основе ДНК находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

141. Сконструированная клетка по п. 138 или п. 139, отличающаяся тем, что условный компонент на основе ДНК находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

142. Сконструированная клетка по п. 138 или п. 139, отличающаяся тем, что

регулируемые модификации содержат условный или индуцируемый белковый компонент для i) увеличения или ii) снижения или нокаута экспрессии одной или более мишеней по сравнению с контролем.

143. Сконструированная клетка по п. 142, отличающаяся тем, что условный или индуцируемый белковый компонент представляет собой условный или индуцируемый компонент дегрон.

144. Сконструированная клетка по п. 143, отличающаяся тем, что условный или индуцируемый компонент дегрон выбран из группы, состоящей из индуцированной лигандом деградации (LID) с использованием метки SMASH, LID с использованием Shield-1, LID с использованием ауксина, LID с использованием рапамицина, условных или индуцируемых пептидных дегронов (*например*, дегронов на основе IKZF3) и условных или индуцируемых химер, нацеленных на протеолиз (PROTAC).

145. Сконструированная клетка по любому из пп. 142-144, отличающаяся тем, что условный белковый компонент находится под контролем условного промотора, выбранного из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

146. Сконструированная клетка по любому из пп. 142-144, отличающаяся тем, что белковый компонент находится под контролем индуцируемого промотора, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

147. Сконструированная клетка по любому из пп. 142-146, причем клетка содержит условный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов или CD47.

148. Сконструированная клетка по любому из пп. 142-146, причем клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий условный промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон, содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более толерогенных факторов или CD47.

149. Сконструированная клетка по п. 147 или п. 148, отличающаяся тем, что условный промотор выбран из группы, состоящей из специфичного для клеточного цикла промотора, тканеспецифичного промотора, специфичного для линии промотора и промотора, индуцируемого дифференциацией.

150. Сконструированная клетка по любому из пп. 132-146, причем клетка содержит индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов или CD47.

151. Сконструированная клетка по любому из пп. 132-146, причем клетка содержит (i) экзогенный полинуклеотид, содержащий индуцируемый промотор, функционально связанный с транспозазой, и (ii) экзогенный полинуклеотид, содержащий транспозон,

содержащий полинуклеотид-карго, кодирующий один или более толерогенных факторов или CD47.

152. Сконструированная клетка по п. 150 или 151, отличающаяся тем, что индуцируемый промотор, который регулируется малой молекулой, лигандом, биологическим агентом, опосредованным аптамером модулятором полиаденилирования или рибопереключателем, регулируемым аптамером.

153. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-45 или 99-152, причем клетка содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129.

154. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-45 или 99-152, причем клетка содержит полипептид CD47, последовательность которого по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:130.

155. Сконструированная клетка по любому из пп. 132-154, причем клетка дополнительно содержит регулируемые модификации, которые увеличивают экспрессию одного или более из A20/TNFAIP3, C1-ингибитора, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9 по сравнению с контролем.

156. Сконструированная клетка по п. 155, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество ингибитора A20/TNFAIP3, C1, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9 по сравнению с контролем.

157. Сконструированная клетка по п. 155 или п. 156, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество ингибитора A20/TNFAIP3, C1, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9 по сравнению с контролем.

158. Сконструированная клетка по любому из пп. 155-157, причем клетка экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество A20/TNFAIP3, C1-ингибитора, CCL21, CCL22, CD16, Fc-рецептора CD16, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 и/или Serpinb9 по сравнению с контролем.

159. Сконструированная клетка по любому из пп. 155-158, причем контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного

уровня.

160. Сконструированная клетка по п. 159, причем контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

161. Сконструированная клетка по п. 159 или п. 160, причем контрольная клетка представляют собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

162. Сконструированная клетка по п. 159, причем эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

163. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-162, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов или CD47 кодируются первым экзогенным полинуклеотидом.

164. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-163, причем клетка содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

165. Сконструированная клетка по п. 163 или п. 164, отличающаяся тем, что первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вставлен в первый и/или второй специфический локус по меньшей мере одного аллеля клетки.

166. Сконструированная клетка по п. 165, отличающаяся тем, что первый и/или второй специфический локус выбран из группы, состоящей из безопасного локуса, целевого локуса, локуса *RHD*, локуса *B2M*, локуса *CIITA*, локуса *TRAC* и локуса *TRB*.

167. Сконструированная клетка по п. 166, отличающаяся тем, что безопасный локус выбран из группы, состоящей из локуса *CCR5*, локуса *PPP1R12C*, локуса *Rosa*, локуса гена *ROSA26* и локуса *CLYBL*.

168. Сконструированная клетка по п. 166, отличающаяся тем, что целевой локус выбран из группы, состоящей из локуса *CXCR4*, локуса *ALB*, локуса *SHS231*, локуса *F3* (*CD142*), локуса *MICA*, локуса *MICB*, локуса *LRP1* (*CD91*), локуса *HMGB1*, локуса *ABO*, локуса *FUT1* и локуса *KDM5D*.

169. Сконструированная клетка по любому из пп. 163-168, отличающаяся тем, что первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вводят в клетку с использованием лентивирусного вектора.

170. Сконструированная клетка по любому из пп. 163-169, отличающаяся тем, что первый и/или второй экзогенный полинуклеотид вносят в клетку, используя фузоген-опосредованную доставку или систему на основе транспозазы, выбранную из группы, состоящей из кондициональных или индуцибельных транспозаз, кондициональных или индуцибельных транспозонов PiggyBac, кондициональных или индуцибельных транспозонов Sleeping Beauty (SB11), кондициональных или индуцибельных транспозонов Mos1 и кондициональных или индуцибельных транспозонов Tol2.

171. Островковая клетка поджелудочной железы, имеющая пониженную

экспрессию HLA ГКГС класса I и/или пониженную экспрессию HLA ГКГС класса II и которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

172. Клетка по п. 171, причем клетка представляет собой первичную островковую бета-клетку, которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно 19 в раза или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

173. Сконструированная клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с контролем, или которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

174. Сконструированная клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с контролем, или которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

175. Сконструированная клетка по п. 173 или п. 174, причем клетка экспрессирует по меньшей мере на примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 100%, примерно 200%, примерно 300%, примерно 400%, примерно 500%, примерно 600%, примерно 700%, примерно 800%, примерно 900% или примерно 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

176. Сконструированная клетка по любому из пп. 173-175, причем клетка экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

177. Сконструированная клетка по любому из пп. 173-176, причем клетка представляет собой первичную островковую клетку поджелудочной железы, которая экспрессируетпо меньшей мере примерно на 1000% или по меньшей мере примерно на 2000% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

178. Сконструированная клетка по любому из пп. 171-177, причем контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

179. Сконструированная клетка по п. 178, причем контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

180. Сконструированная клетка по п. 178 или п. 179, причем контрольная клетка представляют собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

181. Сконструированная клетка по п. 178, причем эталоном исходного уровня

является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

182. Сконструированная клетка по любому из пп. 171-181, отличающаяся тем, что уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

183. Сконструированная Т-клетка, имеющая сниженную экспрессию HLA ГКГС класса I и/или сниженную экспрессию HLA ГКГС класса II и которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с контролем, которая экспрессирует уровень по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле, или которая экспрессирует по меньшей мере примерно 170 000 молекул CD47.

184. Сконструированная клетка по п. 221, причем клетка представляет собой Т-клетку, которая экспрессирует по меньшей мере примерно на 300% или по меньшей мере примерно на 400% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

185. Сконструированная клетка по п. 183, причем клетка представляет собой Т-клетку, которая экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

186. Сконструированная Т-клетка, которая экспрессирует по меньшей мере примерно 170 000 молекул CD47.

187. Сконструированная Т-клетка по п. 186, причем Т-клетка экспрессирует по меньшей мере примерно 180 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 190 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 200 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 210 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 220 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 230 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 240 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 250 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 260 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 270 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 280 000 молекул CD47, по меньшей мере примерно 290 000 молекул CD47 или по меньшей мере примерно 300 000 молекул CD47.

188. Сконструированная клетка по любому из пп. 183-187, причем контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

189. Сконструированная клетка по п. 188, причем контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

190. Сконструированная клетка по п. 188 или п. 189, причем контрольная клетка представляют собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

191. Сконструированная клетка по п. 190, причем эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

192. Сконструированная клетка по любому из пп. 183-191, отличающаяся тем, что уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

193. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-192, причем клетка содержит 1, 2, 3, 4 или 5 копий экзогенного полинуклеотида, кодирующего CD47.

194. Сконструированная клетка по п. 193, причем клетка содержит конститутивный промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим CD47.

195. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-194, отличающаяся тем, что экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, доставляется в клетку посредством опосредованной вирусом интеграции.

196. Сконструированная клетка по п. 195, отличающаяся тем, что опосредованная вирусом интеграция является опосредованной лентивирусом.

197. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-196, отличающаяся тем, что экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрируется в сайт клеточного генома посредством HDR.

198. Сконструированная клетка по п. 197, отличающаяся тем, что экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрирован в локус гена TRAC, локус гена TRBC или их комбинацию.

199. Т-клетка по п. 198, отличающаяся тем, что экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрирован по меньшей мере в один аллель TRAC, по меньшей мере в один аллель TRBC или их комбинацию.

200. Т-клетка по п. 198 или п. 199, отличающаяся тем, что экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, интегрирован по меньшей мере в два аллеля TRAC, по меньшей мере в два аллеля TRBC или их комбинацию.

201. Клетка по любому из пп. 1-200, причем клетка содержит экзогенный полинуклеотид, содержащий полипептид CD47, имеющий по меньшей мере примерно 80% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 129, по меньшей мере примерно 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:129, по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:129, по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:129, по меньшей мере примерно 98% идентичности последовательности с аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129, по меньшей мере примерно 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:129, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129.

202. Клетка по любому из пп. 1-200, причем клетка содержит экзогенный полинуклеотид, содержащий полипептид CD47, имеющий по меньшей мере примерно 80% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID

NO: 130, по меньшей мере примерно 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:130, по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:130, по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:130, по меньшей мере примерно 98% идентичности последовательности с аминокислотную последовательность SEQ ID NO:130, по меньшей мере примерно 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:130, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:130.

203. Клетка по любому из пп. 171-202, причем клетка имеет сниженную экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с контролем.

204. Клетка по п. 203, отличающаяся тем, что снижение экспрессии одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II вызвано конститутивными модификациями одного или более генов, кодирующих HLA ГКГС класса I и/или класса II.

205. Клетка по любому из пп. 204 или п. 205, причем клетка содержит один или более нокаутов мишеней, выбранных из группы, состоящей из HLA ГКГС класса I и ГКГС класса II.

206. Клетка по п. 205, отличающаяся тем, что один или более нокаутов являются конститутивными нокаутами.

207. Клетка по любому из пп. 204-206, причем клетка имеет сниженную экспрессию одной или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M и CIITA, по сравнению с контролем.

208. Клетка по п. 207, отличающаяся тем, что снижение экспрессии B2M и/или CIITA вызвано конститутивными модификациями гена B2M и/или гена CIITA.

209. Клетка по любому из пп. 204-208, причем клетка содержит один или более нокаутов мишеней, выбранных из группы, состоящей из B2M и CIITA.

210. Клетка по п. 209, причем клетка содержит нокауты обоих аллелей B2M и/или обоих аллелей CIITA.

211. Клетка по п. 209 или 210, отличающаяся тем, что один или более нокаутов являются конститутивными нокаутами.

212. Клетка по любому из пп. 204-211, причем клетка дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более дополнительных толерогенных факторов.

213. Клетка по п. 212, отличающаяся тем, что один или более дополнительных толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CI-ингибитора и IL-35.

214. Клетка по любому из пп. 204-213, причем клетка имеет сниженную экспрессию B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD по сравнению с контролем.

215. Клетка по п. 214, причем клетка не экспрессирует B2M, CIITA, NLRC5, TRAC, TRB, CD142, ABO, MIC-A/B, CD38, CD52, PCDH11Y, NLGN4Y и/или RHD.

216. Клетка по любому из пп. 204-215, причем клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.

217. Клетка по п. 216, причем плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC), гемопоэтическую стволовую клетку (HSC) или эмбриональную стволовую клетку (ESC).

218. Клетка по любому из пп. 204-217, причем клетка представляет собой дифференцированную клетку, полученную из стволовой клетки или ее потомства.

219. Клетка по п. 218, причем дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из островковой клетки поджелудочной железы, Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), клетки CAR-M, эндотелиальной клетки, клетки сердечной мышцы, гладкомышечной клетки, клетки скелетных мышц, гепатоцита, глиальной клетки-предшественника, дофаминергического нейрона, клетки пигментного эпителия сетчатки и клетки щитовидной железы.

220. Клетка по любому из пп. 204-219, причем клетка представляет собой первичную клетку или ее потомство.

221. Клетка по п. 220, причем первичная клетка или ее потомство представляет собой Т-клетку или NK-клетку.

222. Клетка по любому из пп. 219 или п. 221, причем Т-клетка дополнительно характеризуется сниженной экспрессией Т-клеточного рецептора (TCR)-альфа и/или TCR-бета.

223. Клетка по п. 222, причем Т-клетка не экспрессирует TCR-альфа и/или TCR-бета.

224. Клетка по любому из пп. 219 или 221-223, причем Т-клетка дополнительно содержит второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

225. Клетка по любому из пп. 204-224, причем клетка экспрессирует по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем и имеет сниженную экспрессию одного или более антигенов человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и ГКГС класса II по сравнению с контролем.

226. Клетка по любому из пп. 204-225, причем клетка экспрессирует уровень, по меньшей мере примерно в 2-раза, примерно в 3 раза, примерно в 4 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в клетке дикого типа или контрольной клетке, которая не имеет экспрессии CD47 или имеет низкую экспрессию CD47, а также сниженную экспрессию одного или более антигенов человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и ГКГС класса II по сравнению с контрольной клеткой.

227. Клетка по п. 226, причем клетка экспрессирует уровень по меньшей мере

примерно в 3 раза, примерно в 4 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в клетке дикого типа или контрольной клетке того же типа клеток, которая не имеет экспрессии CD47 или имеет низкую экспрессию CD47.

228. Клетка по любому из пп. 225-227, причем контрольная клетка представляет собой островковую клетку поджелудочной железы, Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK), клетку CAR-M, эндотелиальную клетку, клетку сердечной мышцы, гладкомышечную клетку, клетку скелетной мышцы, гепатоцит, глиальную клетку-предшественника, дофаминергический нейрон, клетку пигментного эпителия сетчатки или клетку щитовидной железы.

229. Клетка по любому из пп. 219-228, причем дифференцированная клетка или ее потомство, или первичная иммунная клетка или ее потомство избегают цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, при введении пациенту-реципиенту, защищены от лизиса клеток зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту, избегают лизиса клеток зрелыми NK-клетками при введении пациенту-реципиенту, избегают поглощения макрофагами при введении пациенту-реципиенту, не индуцируют врожденный и/или адаптивный иммунный ответ на клетку при введении пациенту-реципиенту и/или не индуцируют иммунный ответ на основе антител на клетку при введении пациенту-реципиенту.

230. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-229, причем клетка представляет собой аутологичную клетку.

231. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-229, причем клетка представляет собой аллогенную клетку.

232. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию сконструированных клеток по любому из пп. 1-231 и фармацевтически приемлемую добавку, носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

233. Фармацевтическая композиция по п. 232, отличающаяся тем, что сконструированная клетка представляет собой островковую бета-клетку, а фармацевтическая композиция дополнительно содержит одну или более дополнительных островковых клеток поджелудочной железы.

234. Способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту клинически эффективного количества или терапевтически эффективного количества сконструированных клеток по любому из пп. 1-231.

235. Способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту популяции клеток, содержащей сконструированные клетки по любому из пп. 1-231.

236. Способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту популяции клеток, содержащей дифференцированные клетки по любому из пп. 1-231.

237. Способ лечения пациента с заболеванием или состоянием, которому будет

полезна клеточная терапия, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 302 или п. 303.

238. Способ по пп. 234-237, отличающийся тем, что заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из рака, генетического нарушения, хронического инфекционного заболевания, аутоиммунного нарушения, неврологического нарушения, сердечного нарушения (выбранного из группы, состоящей из детской кардиомиопатии, возрастной кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, гипертрофической кардиомиопатии, рестриктивной кардиомиопатии, хронической ишемической кардиомиопатии, перипартальной кардиомиопатии, воспалительной кардиомиопатии, идиопатической кардиомиопатии, другой кардиомиопатии, ишемического реперфузионного поражения миокарда, желудочковой дисфункции, сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, терминальной стадии сердечной недостаточности, атеросклероза, ишемии, гипертонии, рестеноза, стенокардии, ревматической болезни сердца, воспаления артерий, сердечно-сосудистого заболевания, инфаркта миокарда, ишемии миокарда, инфаркта миокарда, ишемии сердца, поражения сердца, ишемии миокарда, сосудистого заболевания, приобретенного порока сердца, врожденного порока сердца, ишемической болезни сердца, дисфункций проводящей системы, дисфункций коронарных артерий, легочной гипертензии, сердечных аритмий, мышечной дистрофии, аномалий мышечной массы, мышечной дегенерации, миокардита, инфекционного миокардита, мышечных аномалий, вызванных лекарственными средствами или токсинами, миокардита, обусловленного реакцией гиперчувствительности, митральной недостаточности, аутоиммунного эндокардита, первичных аритмических заболеваний, сердечных каналопатий, синдромов удлиненного интервала QT, синдромов короткого интервала QT, синдрома Бругада, катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии, синдрома Джервелла и Ланге - Нильсена, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, кардиомиопатии, врожденного порока сердца, заболевания или дисфункции сердечного клапана, эндокардита, ревматической лихорадки, пролапса митрального клапана, инфекционного эндокардита, гипертрофической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, миокардита, кардиомегалии, митральной недостаточности), неврологического нарушения (выбранного из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, болезни Пелизеуса - Мерцбахера, других нейродегенеративных заболеваний или состояний, синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), ишемии, рассеянного склероза, черепно-мозговой травмы, эпилепсии, каталепсии, энцефалита, менингита, мигрени, инсульта, транзиторной ишемической атаки, субарахноидального кровоизлияния, субдурального кровоизлияния, гематомы, экстрадурального кровоизлияния, травмы спинного мозга, шейного спондилеза, синдрома запястного канала, опухолей головного или спинного мозга, периферической нейропатии, синдрома Гийена - Барре, невралгии, бокового амиотрофического склероза (БАС), тауопатий, болезни Пика, прогрессирующего супрануклеарного паралича,

кортикобазальной дегенерации, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен, паралича Белла, церебрального паралича, болезни двигательных нейронов, нейрофиброматоза, энцефалита, менингита, синдрома Туретта, шизофрении, психоза, депрессии и других нервно-психических нарушений), сосудистой деменции, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, рассеянного склероза, других нейродегенеративных заболеваний или состояний, синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), синдрома Туретта (СТ), шизофрении, психоза, депрессии, другого нервно-психического нарушения, нейрокогнитивного нарушения, связанного с ВИЧ-1, черепно-мозговой травмы, инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), кровоизлияния в мозг, эпилептического припадка, повреждения спинного мозга, заболевания, характеризующегося появлением аргирофильных зерен (AGD), бокового амиотрофического склероза (БАС), кортико-базальной дегенерации (CBD), паркинсонизма, связанного с хромосомой 17 (FTDP-17), множественной системной атрофии (MSA), болезни Паркинсона/диффузной болезни с тельцами Леви (PD/DLBD) или болезни Альцгеймера, атеросклероза, атерогенеза, артериального тромбоза, венозного тромбоза, тромбоцитарных микроангиопатий, транссудации, диффузного внутрисосудистого свертывания крови, диабета, инсулинорезистентности, сердечно-сосудистого заболевания, сосудистого заболевания, заболевания периферических сосудов, ишемической болезни, инфаркта миокарда, застойной сердечной недостаточности, обструктивной болезни периферических сосудов, инсульта, реперфузионного поражения, ишемии конечностей, невропатии (*например*, периферической невропатии или диабетической невропатии), органной недостаточности (*например*, печеночной недостаточности, почечной недостаточности и т.п.), диабета, ревматоидного артрита, остеопороза, поражения сосудов, поражения тканей, гипертонии, стенокардии и инфаркта миокарда вследствие ишемической болезни сердца, почечной сосудистой гипертензии, почечной недостаточности вследствие стеноза почечных артерий, хромоты нижних конечностей, транзиторной ишемической атаки или инсульта, инфаркта миокарда и ишемии конечностей, восстановления ишемизированных тканей, формирования кровеносных сосудов и клапанов сердца, проектирования искусственных сосудов, восстановления поврежденных сосудов и стимуляции образования кровеносных сосудов в сконструированных тканях (*например*, перед трансплантацией), восстановления или замены тканей, нуждающихся в сосудистых клетках или васкуляризации, сердечной ткани, ткани печени, ткани поджелудочной железы, почечной ткани, мышечной ткани, нервной ткани, костной ткани и т. д. это может быть ткань, поврежденная и характеризующаяся избыточной гибелью клеток, ткань с риском повреждения или искусственно созданная ткань), ишемической болезни сердца, цереброваскулярного заболевания, стеноза аорты, аневризмы аорты, заболевания периферических артерий, атеросклероза, варикозного расширения вен, ангиопатии, инфаркта области сердца с недостаточной коронарной перфузией, незаживающих ран, диабетических или недиабетических язв или любого другого заболевания или нарушения, при которых

желательно вызвать образование кровеносных сосудов, что способствует улучшению протезных имплантатов (*например*, сосудов, изготовленных из синтетических материалов, таких как дакрон и гортекс), которые используются в сосудистой реконструктивной хирургии, сосудистого заболевания, выбранного из группы, состоящей из поражения сосудов, сердечно-сосудистого заболевания, сосудистого заболевания, заболевания периферических сосудов, ишемической болезни, инфаркта миокарда, застойной сердечной недостаточности, обструктивного заболевания периферических сосудов, гипертонии, ишемического поражения тканей, реперфузионного поражения, ишемии конечностей, инсульта, невропатии (*например*, периферической невропатии или диабетической невропатии), органной недостаточности (*например*, печеночной недостаточности, почечной недостаточности и т.п.), диабета, ревматоидного артрита, остеопороза, цереброваскулярного заболевания, гипертонии, стенокардии и инфаркта миокарда вследствие ишемической болезни сердца, почечной сосудистой гипертензии, почечной недостаточности вследствие стеноза почечной артерии, хромоты нижних конечностей, другого сосудистого состояния или заболевания, аутоиммунного тиреоидита, зоба, гиперпаратиреоза, гипопаратиреоза (врожденного или аутоиммунного), тиреоидита, тиреоидита Хашимото, послеродового тиреоидита, подострого тиреоидита, ятрогенного гипотиреоза, болезни Грейвса и тиреоидной офтальмопатии, инфекционного гепатита (A, B и C), аутоиммунного гепатита, первичного билиарного холангита, первичного склерозирующего холангита, неалкогольной жировой болезни печени, цирроза печени, гемохроматоза, гипероксалурии, дефицита альфа-1-антитрипсина, печеночной недостаточности, болезни Вильсона, печеночной энцефалопатии, желтухи, острых печеночных порфирий, синдрома Алажиля, билиарной атрезии, синдрома Бадда - Киари, гипербилирубинемий, синдрома Криглера - Найяра, синдрома Жильбера - Мейленграхта, синдрома Дабина - Джонсона, синдрома Ротора, галактоземии, болезни накопления гликогена 1-го типа, гепаторенального синдрома, внутрипеченочного холестаза беременных, прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза, синдрома Рея, дефицита лизосомальной кислой липазы, алкоголь-ассоциированного панкреатита, желчнокаменного панкреатита, сахарного диабета (типа 1 и типа 2), преддиабета, гестационного диабета, сахарного диабета, экзокринной недостаточности поджелудочной железы, острого панкреатита, хронического панкреатита, наследственного панкреатита, гиперинсулинемии, кист поджелудочной железы, синдрома Золлингера - Эллисона, синдрома Швахмана - Даймонда, наследственного гемохроматоза, талассемии, отложения железа в поджелудочной железе, муковисцидоза, разделенной поджелудочной железы и резекции поджелудочной железы, макулярной дегенерации или пациента с поврежденными клетками ПЭС, возрастной макулярной дегенерации (ВМД), ранней ВМД, промежуточной ВМД, поздней ВМД, неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, сухой макулярной дегенерации (сухой возрастной макулярной дегенерация), влажной макулярной дегенерации (влажной возрастной макулярной дегенерации), вителлиформной макулярной дистрофии у взрослых (ВМДВ), вителлиформной

макулярной дистрофии Беста, макулярной дистрофии Штаргардта (STGD3), дистрофии глазного дна Сорби (SFD), заболевания, связанного с ABCA4, синдрома Ашера IB типа, аутосомно-рецессивной бесстрофинопатии, аутосомно-доминантной витреоретинохориоидопатии, ювенильной макулярной дегенерации (ЮМД), врожденного амавроза Лебера или пигментного ретинита, отслойки сетчатки, разрывов сетчатки, тяжелых комбинированных иммунодефицитов (ТКИД), синдрома Оменна, хрящево-волосяной гипоплазии, ретикулярной дисгенезии, синдрома Вискотта - Олдрича, атаксии-телеангиэктазии, синдрома ДиДжорджа, иммуно-костных дисплазий, врожденного дискератоза, хронического кожно-слизистого кандидоза, гематологических злокачественных новообразований, фолликулярной лимфомы (ФЛ), миелоидного новообразования, зрелых новообразований из T/NK-клеток, гистиоцитарных новообразований, множественной миеломы (ММ), миелодиспластических синдромов (МДС), лимфоплазмоцитарной лимфомы (ЛПЛ), макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы Беркитта (BL), первичной медиастинальной B-крупноклеточной лимфомы (PMBL), лимфомы Ходжкина, мантийноклеточной лимфомы (MCL), волосатоклеточного лейкоза (HCL), миелопролиферативного/миелодиспластического синдрома (МДС), острого лимфоидного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), диффузной B-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), острого B-клеточного лимфоидного лейкоза (B-ОЛЛ), острого T-клеточного лимфоидного лейкоза (T-ОЛЛ), T-клеточной лимфомы, B-клеточной лимфомы, аутоиммунного заболеванийя, включая, например, волчанку, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит, рассеянный склероз, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Аддисона, болезнь Грейвса, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, сахарный диабет 1 типа, первичный билиарный цирроз печени, аутоиммунный гепатит, целиакию, онкологических заболеваний, включая, помимо прочего, B-клеточный острый лимфобластный лейкоз (B-ОЛЛ), диффузную B-крупноклеточную лимфому, рак печени, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак легких, немелкоклеточный рак легких, острый миелоидный и лимфоидный лейкоз, множественную миелому, рак желудка, аденокарциному желудка, аденокарциному поджелудочной железы, глиобластому, нейробластому, плоскоклеточный рак легкого, гепатоцеллюлярную карциному, рак мочевого пузыря, системной красной волчанки (СКВ), диабета 1 типа, аутоиммунного заболевания печени, синдрома Шегрена, ревматоидного артрита, системного склероза (склеродермии), органоспецифических аутоиммунных заболеваний (аутоиммунного гепатита, первичного склерозирующего хонлангита), алкогольного заболевания печени, рассеянного склероза, дефицита NK-клеток (NKD) (функционального (FNKD) или классического (CNKD)), синдрома X-сцепленной иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии (IPEX-синдром), синдрома Блума, анемии Фанкони, врожденного дискератоза, синдрома Чедиака - Хигаси, семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (СГЛ), синдрома Гришелли 2 типа, синдрома Германски - Пудлака,

синдрома Папийона - Лефевра, синдрома Вискотта - Олдрича, аутосомно-рецессивного варианта гипер-IgE-синдрома, аномалии Мея - Хегглина и дефицита адгезии лейкоцитов I или III типа.

239. Способ по п. 234-238, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из мезенхимальной стволовой клетки (MSC), гемопоэтической стволовой клетки (HSC), островковой клетки поджелудочной железы, островковой бета-клетки, иммунной клетки, B-клетки, T-клетки, естественной клетки-киллера (NK), естественной T-клетки-киллера (NKT), макрофагальной клетки, иммунопривилегированной клетки, зрительной клетки, клетки пигментированного эпителия сетчатки (RPE), гепатоцита, клетки щитовидной железы, эндотелиальной клетки, клетки кожи, глиальной клетки-предшественника, нейрональной клетки, мышечной клетки, сердечной клетки и клетки крови.

240. Способ по любому из пп. 234-239, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент перед введением популяции клеток.

241. Способ по любому из пп. 234-240, дополнительно включающий введение пациенту одного или более иммуносупрессивных агентов.

242. Способ по любому из пп. 234-241, отличающийся тем, что пациенту вводили один или более иммуносупрессивных агентов.

243. Способ по п. 241 или п. 242, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов представляют собой малую молекулу или антитело.

244. Способ по любому из пп. 241-243, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов выбраны из группы, состоящей из циклоспорина, азатиоприна, микофеноловой кислоты, микофенолата мофетила, кортикостероидов, преднизолона, метотрексата, солей золота, сульфасалазина, противомалярийных средств, брекинара, лефлуномида, мизорибина, 15-дезоксиспергуалина, 6-меркаптопурина, циклофосфамида, рапамицина, такролимуса (FK-506), OKT3, антитимоцитарного глобулина, тимопентина (тимозин-α) и иммунодепрессивного антитела.

245. Способ по любому из пп. 241-244, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов содержат циклоспорин.

246. Способ по любому из пп. 241-245, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов включают микофенолата мофетил.

247. Способ по любому из пп. 241-246, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов содержат кортикостероид.

248. Способ по любому из пп. 241-247, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов содержат циклофосфамид.

249. Способ по любому из пп. 241-248, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов содержат рапамицин.

250. Способ по любому из пп. 241-249, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов содержат такролимус (FK-506).

251. Способ по любому из пп. 241-250, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов содержат антитимоцитарный глобулин.

252. Способ по любому из пп. 241-251, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов представляют собой один или более иммуномодулирующих агентов.

253. Способ по п. 252, отличающийся тем, что один или более иммуномодулирующих агентов представляют собой малую молекулу или антитело.

254. Способ по п. 243 или п. 253, отличающийся тем, что антитело связывается с одним или более рецепторами или лигандами, выбранными из группы, состоящей из p75 рецептора IL-2, ГКГС, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, CD58 и антител, связывающихся с любым из их лигандов.

255. Способ по любому из пп. 241-254, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту до введения сконструированных клеток.

256. Способ по любому из пп. 241-255, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней до введения сконструированных клеток.

257. Способ по любому из пп. 241-256, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более до введения сконструированных клеток.

258. Способ по любому из пп. 241-257, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней после введения сконструированных клеток.

259. Способ по любому из пп. 241-258, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после введения сконструированных клеток.

260. Способ по любому из пп. 241-259, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту в тот же день, в который было проведено первое введение сконструированных клеток.

261. Способ по любому из пп. 241-260, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту после введения сконструированных клеток.

262. Способ по любому из пп. 241-261, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту после проведения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

263. Способ по любому из пп. 241-262, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту до проведения первого и/или

второго введения сконструированных клеток.

264. Способ по любому из пп. 241-263, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней до проведения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

265. Способ по любому из пп. 241-264, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более до проведения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

266. Способ по любому из пп. 241-265, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней после проведения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

267. Способ по любому из пп. 241-266, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят или вводили пациенту по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после проведения первого и/или второго введения сконструированных клеток.

268. Способ по любому из пп. 241-267, отличающийся тем, что один или более иммуносупрессивных агентов вводят в более низкой дозе по сравнению с дозой одного или более иммуносупрессивных агентов, вводимых для снижения иммунного отторжения иммуногенными клетками, которые не содержат модификаций сконструированных клеток.

269. Применение популяции сконструированных клеток по любому из пп. 1-231 для лечения нарушения или состояния у пациента-реципиента, которому будет полезна клеточная терапия.

270. Способ получения сконструированной клетки по любому из пп. 1-231 или популяции клеток, содержащей сконструированную клетку по любому из пп. 1-231, при этом способ включает

получение выделенной клетки; и

приведение выделенной клетки в контакт с одним или более реагентами и/или компонентами для модификации экспрессии гена в выделенной клетке, тем самым создавая сконструированную клетку или популяцию клеток, содержащую сконструированную клетку.

271. Способ по п. 270, причем способ дополнительно включает определение уровней экспрессии CD47 сконструированных клеток или популяции клеток.

272. Способ по п. 270 или п. 271, причем способ дополнительно включает отбор сконструированной клетки или популяции клеток для применения в производстве терапевтического продукта, если установлено, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют CD47 на пороговом или более высоком уровне.

273. Способ по любому из пп. 27-272, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно одинаковое количество CD47 по сравнению с контролем.

274. Способ по любому из пп. 270-273, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно на 10% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

275. Способ по любому из пп. 270-274, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

276. Способ по любому из пп. 270-275, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно на 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% или 900% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

277. Способ по любому из пп. 270-276, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют по меньшей мере примерно на 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

278. Способ по любому из пп. 270-277, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

279. Способ по любому из пп. 270-273 и 278, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза или примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

280. Способ по любому из пп. 270-273, 278 и 279, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз или примерно в 5,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

281. Способ по любому из пп. 270-273 и 278-280, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 4 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

282. Способ по любому из пп. 270-273 и 278-281, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 4,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

283. Способ по любому из пп. 270-273 и 278-282, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 5 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

284. Способ по любому из пп. 270-273 и 278-283, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 5,5 раза превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

285. Способ по любому из пп. 270-273 и 278-284, отличающийся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

286. Способ по любому из пп. 270-285, отличающийся тем, что контроль представляет собой клетку дикого типа или популяцию клеток дикого типа, контрольную клетку или популяцию контрольных клеток, или эталон исходного уровня.

287. Способ по п. 286, отличающийся тем, что контрольная клетка или популяция контрольных клеток содержат немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

288. Способ по п. 286 или п. 287, отличающийся тем, что контрольная клетка или популяция контрольных клеток представляет собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

289. Способ по п. 286, отличающийся тем, что эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

290. Способ по любому из пп. 270-289, отличающийся тем, что сконструированная клетка представляет собой островковую бета-клетку, а популяция клеток включает островковые бета-клетки и дополнительные островковые клетки поджелудочной железы.

291. Способ по любому из пп. 270-289, отличающийся тем, что сконструированная клетка содержит регулируемые модификации, которые изменяют экспрессию одной или более мишеней в сконструированной клетке по сравнению с контролем.

292. Способ по п. 291, отличающийся тем, что регулируемые модификации снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с клеткой дикого типа, популяцией клеток дикого типа, контрольной клеткой или популяцией контрольных клеток.

293. Способ по п. 291 или п. 292, отличающийся тем, что регулируемые модификации увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с клеткой дикого типа, популяцией клеток дикого типа, контрольной клеткой или популяцией контрольных клеток.

294. Способ по любому из пп. 293-294, отличающийся тем, что один или более реагентов для модификации экспрессии гена в выделенной клетке включают i) условный или индуцируемый компонент на основе РНК для изменения экспрессии одной или более мишеней, ii) условный или индуцируемый компонент на основе ДНК для изменения экспрессия одной или более мишеней, или iii) условный или индуцируемый белковый компонент для изменения экспрессии одной или более мишеней.

295. Способ по п. 294, причем способ дополнительно включает приведение выделенной клетки в контакт с экзогенным фактором или воздействие на выделенную клетку условий для активации условного или индуцируемого промотора, тем самым вызывая экспрессию одной или более мишеней, что позволяет получить

сконструированную клетку.

296. Способ получения сконструированной клетки, включающий регулируемые модификации, которые i) снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и ii) увеличивают экспрессию одного или более толерогенных факторов по сравнению с контролем, при этом способ включает:

(a) получение выделенной клетки;

(b) введение в клетку условного или индуцируемого белковый компонент компонента на основе РНК для регулируемой сниженной экспрессии молекул человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, условного или индуцируемого компонента на основе ДНК для регулируемой сниженной экспрессии ГКГС класса I и/или молекул человеческих лейкоцитов ГКГС класса II, или условного или индуцируемого белковый компонента для регулируемой сниженной экспрессии молекул человеческих лейкоцитов ГКГС класса I и/или ГКГС класса II;

(c) воздействие на клетку условий или экзогенного фактора для активации условного или индуцируемого компонента, тем самым вызывая снижение экспрессии молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса;

(d) введение в выделенную клетку нуклеиновой кислоты, содержащей условный или индуцируемый промотор, функционально связанный с экзогенным полинуклеотидом, кодирующим один или более толерогенных факторов, для регулируемой увеличенной экспрессии одного или более толерогенных факторов; и

(e) воздействие на сконструированную клетку условия или экзогенного фактора для активации условного или индуцируемого промотора, тем самым вызывая экспрессию экзогенного одного или более толерогенных факторов, что позволяет получить сконструированную клетку.

297. Способ по п. 296, отличающийся тем, что этапы (a)-(d) выполняют в любом порядке.

298. Способ по п. 296, отличающийся тем, что один или более этапов (a)-(d) выполняют одновременно.

299. Способ по п. 296, отличающийся тем, что этапы (b) и (c) выполняют перед этапами (d) и (e).

300. Способ по п. 296, отличающийся тем, что этапы (d) и (e) выполняют перед этапами (b) и (c).

301. Способ по п. 296, отличающийся тем, что этапы (c) и (e) выполняют последовательно.

302. Способ по п. 296, отличающийся тем, что этапы (c) и (e) выполняют одновременно.

303. Способ идентификации популяции клеток или популяции клеток, содержащей сконструированные клетки по любому из пп. 1-231, подходящей для применения в качестве терапевтического продукта, включающий:

(a) получение выделенных клеток;

(b) введение в клетки одной или более модификаций, которые снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с контролем;

(c) введение в клетки одной или более модификаций, увеличивающих экспрессию CD47 по сравнению с контролем;

(d) измерение уровней экспрессии CD47 в клетках; и

(e) отбор популяции клеток, которые экспрессируют по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем, и определение популяции как подходящей для применения в качестве терапевтического продукта.

304. Способ идентификации популяции клеток или популяции клеток, содержащей сконструированные клетки по любому из пп. 1-231, подходящей для применения в качестве терапевтического продукта, включающий:

(a) получение выделенных клеток;

(b) введение в клетки одной или более модификаций, которые снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с контролем;

(c) введение в клетки одной или более модификаций, увеличивающих экспрессию CD47 по сравнению с контролем;

(d) измерение уровней экспрессии CD47 в клетках; и

(e) отбор популяции клеток, которые экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 2,5 раза, примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз, примерно в 10 раз, примерно в 11 раз, примерно в 12 раз, примерно в 13 раз, примерно в 14 раз, примерно в 15 раз, примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле, и определения популяции как подходящей для применения в качестве терапевтического продукта.

305. Способ по п. 303 или 304, отличающийся тем, что этап (b) выполняют перед этапом (c).

306. Способ по п. 303 или 304, отличающийся тем, что этап (c) выполняют перед этапом (b).

307. Способ по п. 303 или 304, отличающийся тем, что этапы (b) и (c) выполняют одновременно.

308. Способ определения того, пригодна ли популяция клеток для применения в качестве терапевтического продукта, включающий:

(a) получение сконструированных клеток, содержащих первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, необязательно сконструированных клеток по любому из пп. 1-231;

(b) измерение уровней экспрессии CD47 в клетках; и

(c) определение того, что популяция клеток пригодна для применения в качестве терапевтического продукта, если клетки экспрессируют примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем.

309. Способ определения того, пригодна ли популяция клеток для применения в качестве терапевтического продукта, включающий:

(a) получение сконструированных клеток, содержащих первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47, необязательно сконструированных клеток по любому из пп. 1-231;

(b) измерение уровней экспрессии CD47 в клетках; и

(c) определение того, что популяция клеток пригодна для применения в качестве терапевтического продукта, если клетки экспрессируют уровень по меньшей мере примерно в 1,1 раза, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 2,5 раза, примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз, примерно в 10 раз, примерно в 11 раз, примерно в 12 раз, примерно в 13 раз, примерно в 14 раз, примерно в 15 раз, примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле.

310. Способ по любому из пп. 296-309, отличающийся тем, что контроль представляет собой клетку дикого типа, контрольную клетку или эталон исходного уровня.

311. Способ по п. 310, отличающийся тем, что контрольная клетка представляет собой немодифицированную или неизмененную клетку, необязательно, при этом немодифицированная или неизмененная клетка относится к тому же типу клеток, что и сконструированная клетка.

312. Способ по п. 310 или п. 311, отличающийся тем, что контрольная клетка представляют собой исходный материал от донора или пул исходных клеток от пула доноров.

313. Способ по п. 310, отличающийся тем, что эталоном исходного уровня является изотипический контроль или уровень фонового сигнала.

314. Способ по любому из пп. 296-313, отличающаяся тем, что уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

315. Способ определения порогового уровня экспрессии CD47, необходимого для уклонения от иммунного ответа гипоиммуногенных клеток, включающий:

(a) получение сконструированных клеток, содержащих первый экзогенный полинуклеотид, кодирующий CD47;

(b) сортировку сконструированных клеток на основе уровней экспрессии CD47 для создания пулов клеток, имеющих сходные уровни экспрессии CD47;

(c) оценку иммунного ответа, индуцированного пулами клеток; и

(d) определение порогового уровня экспрессии CD47, необходимого для уклонения от иммунного ответа.

316. Способ по п. 315, отличающаяся тем, что уровень CD47 определяют с использованием метода количественного определения на основе антител, необязательно анализа Quantibrite™.

317. Способ по п. 315, отличающийся тем, что этап (a) способа дополнительно включает конструирование клеток, обеспечивающих сниженную экспрессию одного или более генов Y-хромосомы и антигенов человеческих лейкоцитов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I и/или класса II по сравнению с клеткой дикого типа или контрольной клеткой.

318. Способ по п. 315 или п. 317, отличающийся тем, что оценку иммунного ответа проводят с использованием анализов in vitro или анализов in vivo.

319. Способ по п. 318, отличающийся тем, что оценку иммунного ответа проводят путем измерения цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, лизиса зрелыми NK-клетками, поглощения макрофагами, иммунного ответа на клетки на основе антител или путем измерения процента клеток, все еще присутствующих у реципиента через определенный период времени после введения пациенту-реципиенту.

320. Способ идентификации популяции клеток или популяции клеток, содержащей сконструированные клетки по любому из пп. 1-231, подходящей для применения в качестве терапевтического продукта, включающий:

(a) введение в выделенные клетки одной или более модификаций, которые снижают экспрессию одной или более молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II по сравнению с контролем, и

(b) введение в клетки одной или более модификаций, увеличивающих экспрессию CD47 по сравнению с контролем.

321. Способ по п. 320, дополнительно включающий этап (c) измерения уровней экспрессии CD47 в клетках.

322. Способ по п. 321, дополнительно включающий этап (d) отбора популяции клеток, которые экспрессируют по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% большее количество CD47 по сравнению с контролем, и определения популяции как подходящей для применения в качестве терапевтического продукта.

323. Способ по п. 321, дополнительно включающий этап (d) отбора популяции клеток, которые экспрессируют уровень, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 2,5 раза, примерно в 3 раза, примерно в 3,5 раза, примерно в 4 раза, примерно в 4,5 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз, примерно в 10 раз, примерно в 11 раз, примерно в 12 раз, примерно в 13 раз, примерно в 14 раз, примерно в 15 раз, примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз или примерно в 20 раз превышающий уровень CD47, экспрессируемый в контроле, и определения популяции как

подходящей для применения в качестве терапевтического продукта.

324. Способ по любому из пп. 320-323, отличающийся тем, что этап (a) выполняют перед этапом (b).

325. Способ по любому из пп. 320-323, отличающийся тем, что этап (b) выполняют перед этапом (a).

326. Способ по любому из пп. 320-323, отличающийся тем, что этапы (a) и (b) выполняют одновременно.

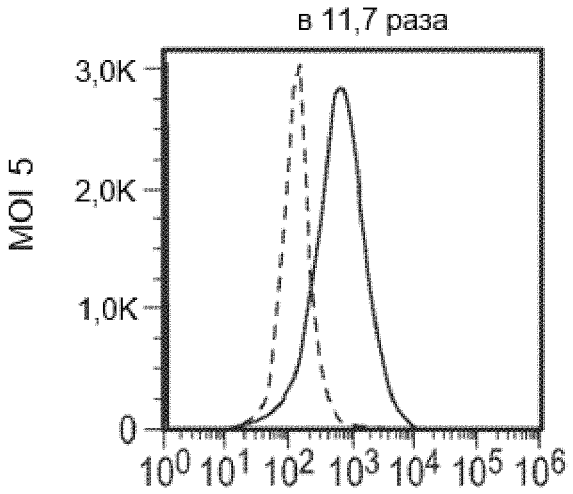
По доверенности

ФИГ. 1A

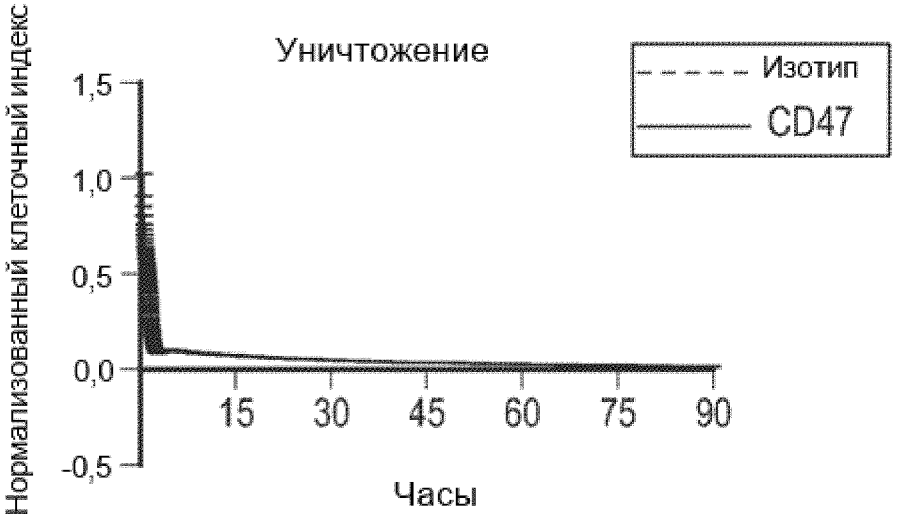
ФИГ. 1B

ФИГ. 1C

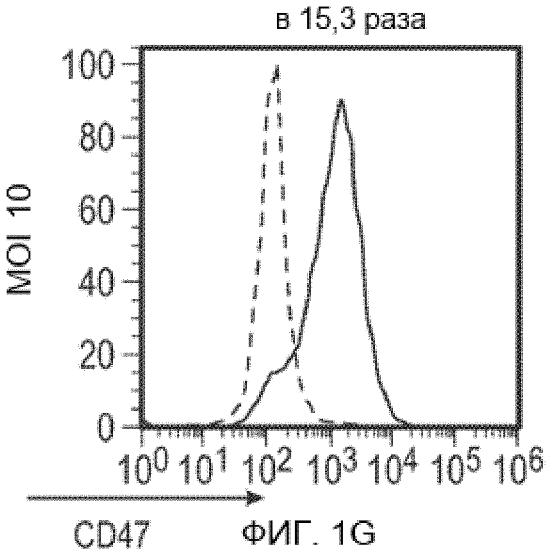
ФИГ. 1D



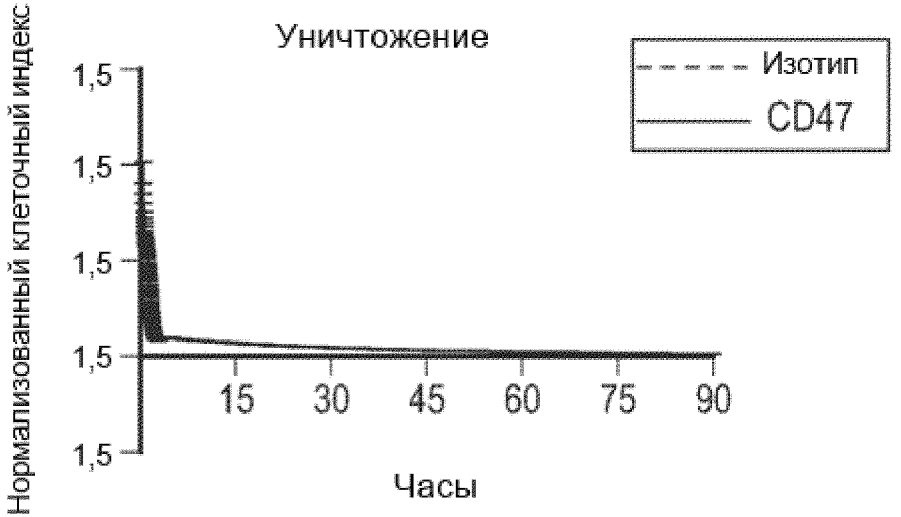
ФИГ. 1E



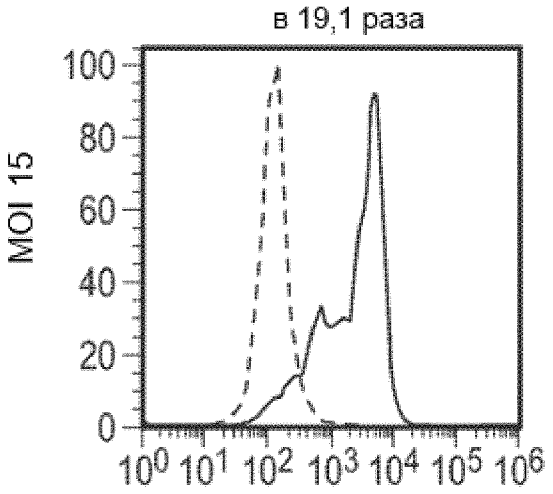
ФИГ. 1F



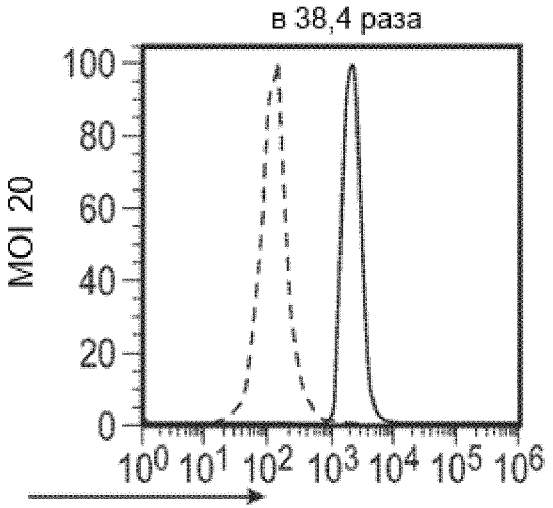
ФИГ. 1G



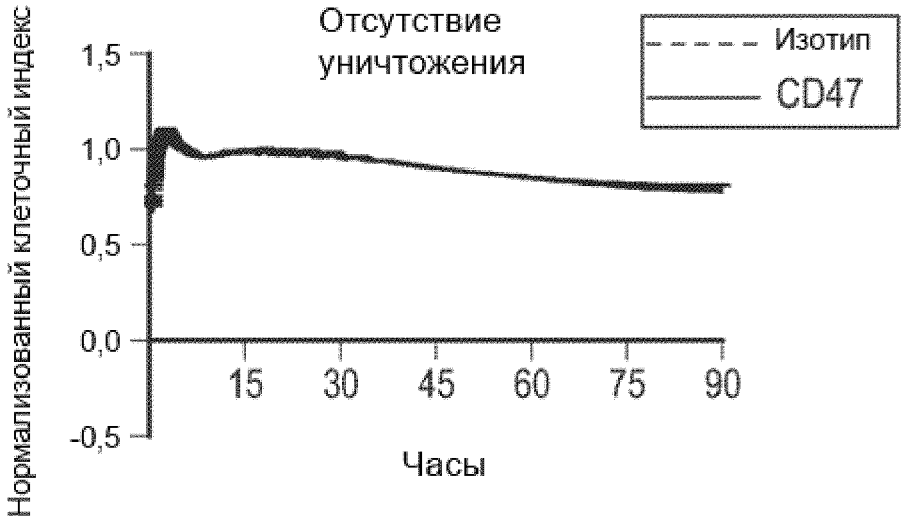
ФИГ. 1H



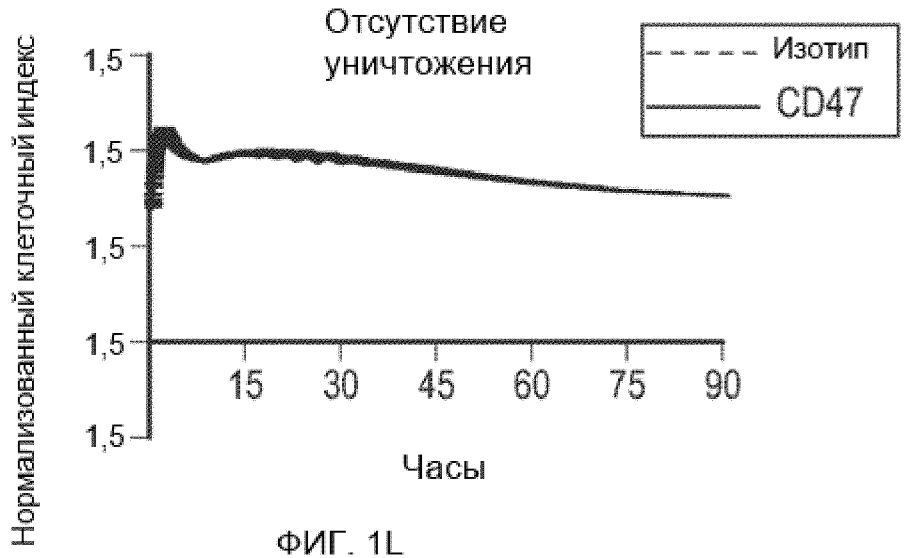
ФИГ. 1I



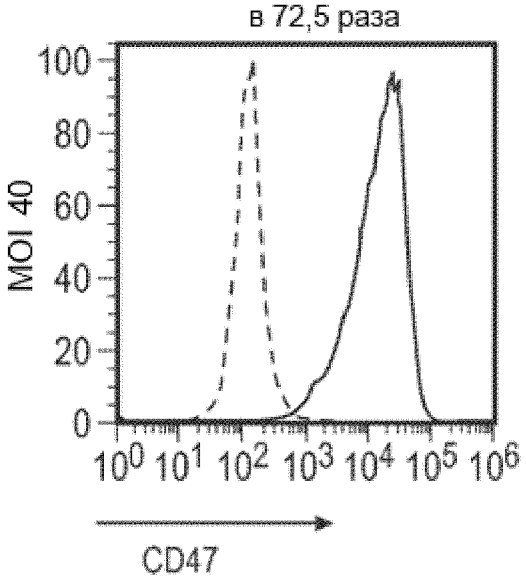
ФИГ. 1K



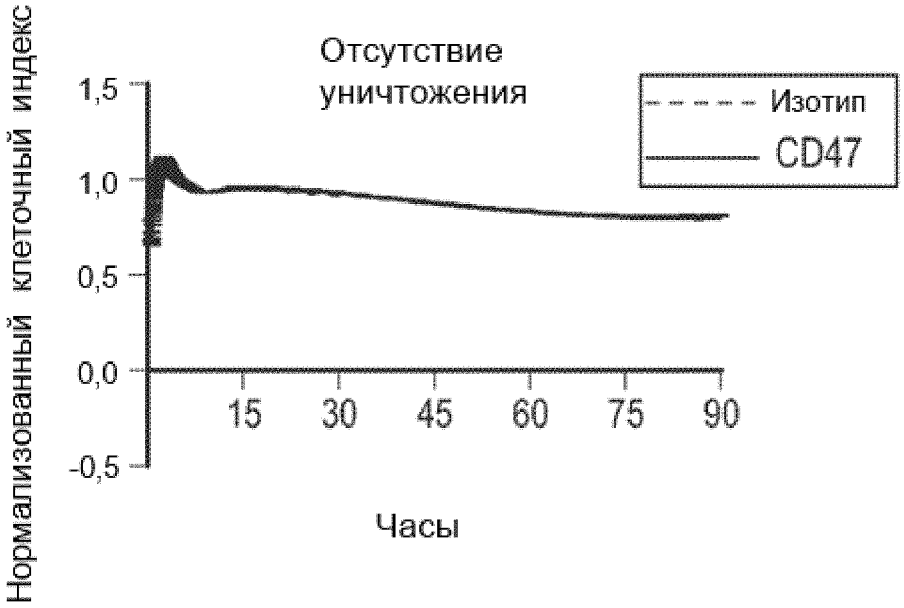
ФИГ. 1J



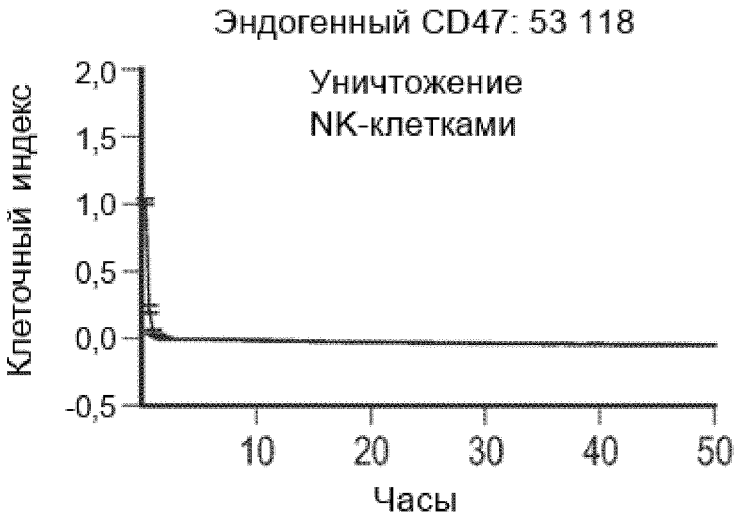
ФИГ. 1L


в 72,5 раза
MOI 40
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
CD47

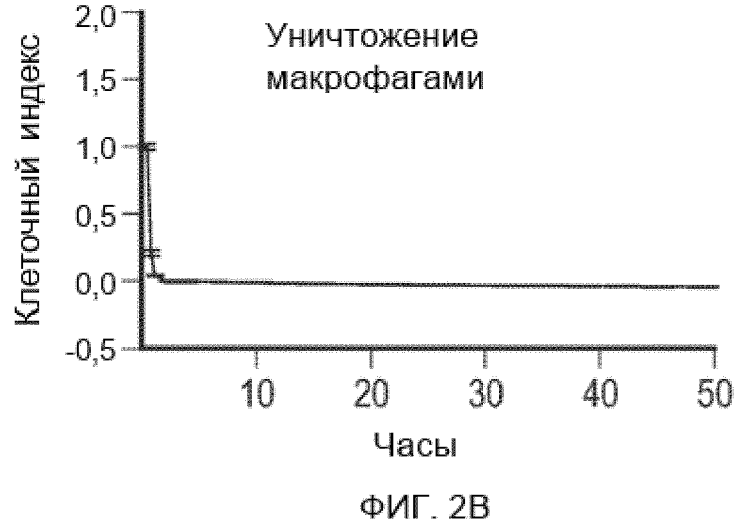
ФИГ. 1M


Нормализованный клеточный индекс
Отсутствие уничтожения
Изотип
CD47
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90
Часы

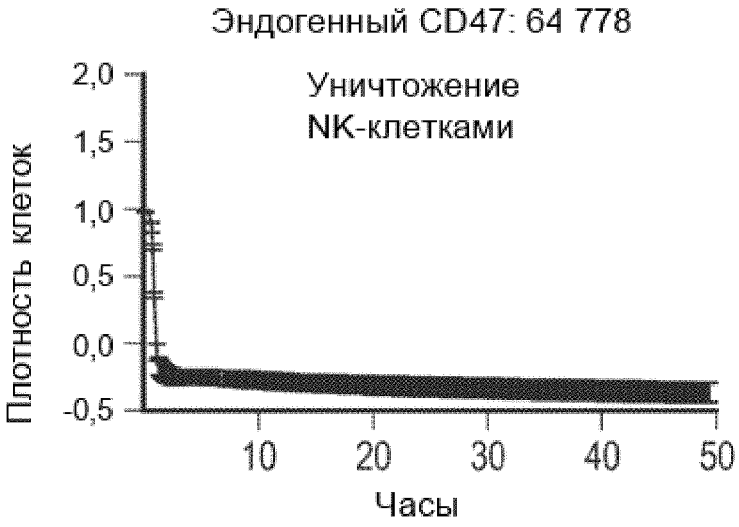
ФИГ. 1N



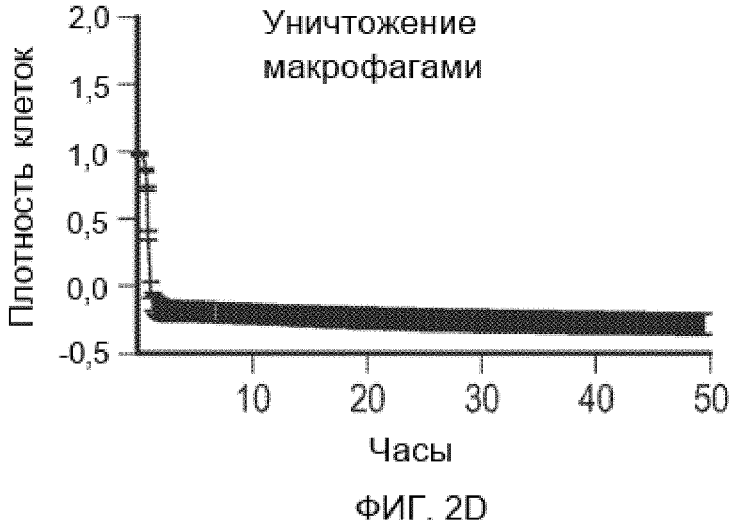
ФИГ. 2A



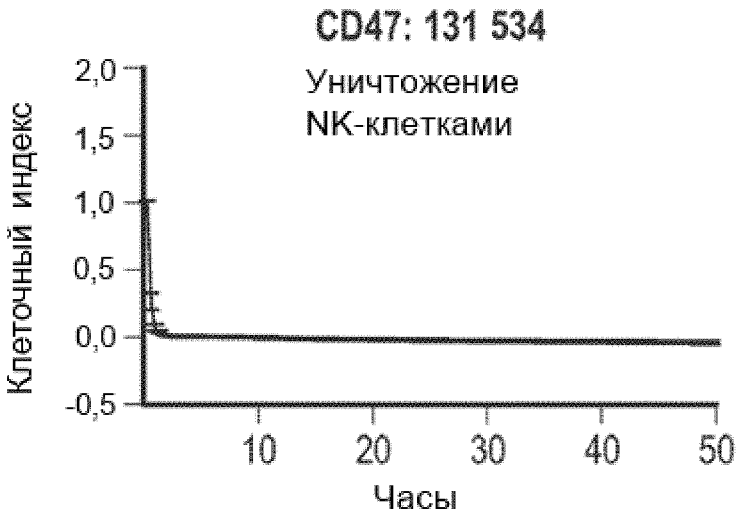
ФИГ. 2B



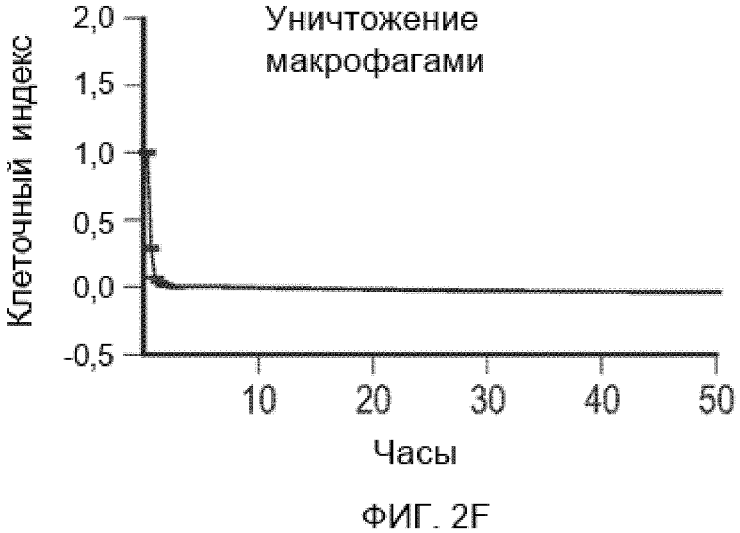
ФИГ. 2C



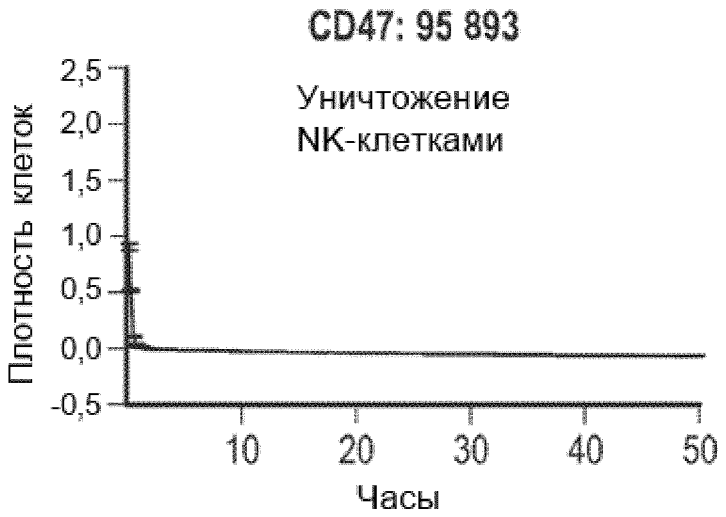
ФИГ. 2D



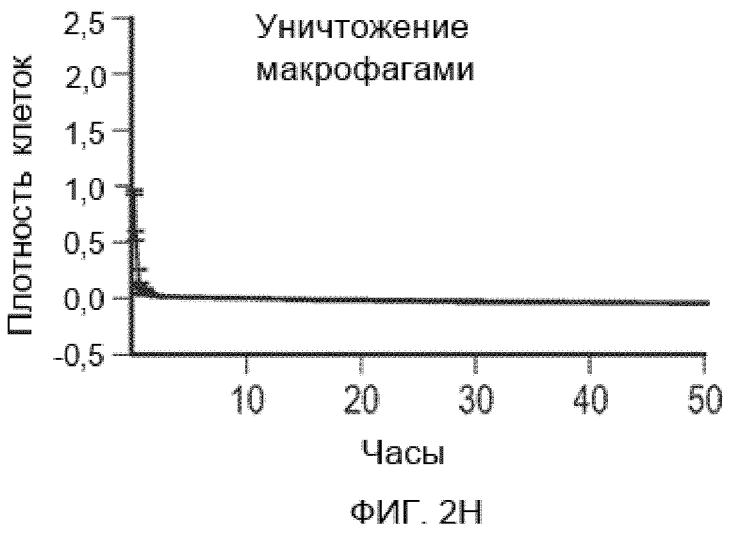
ФИГ. 2E



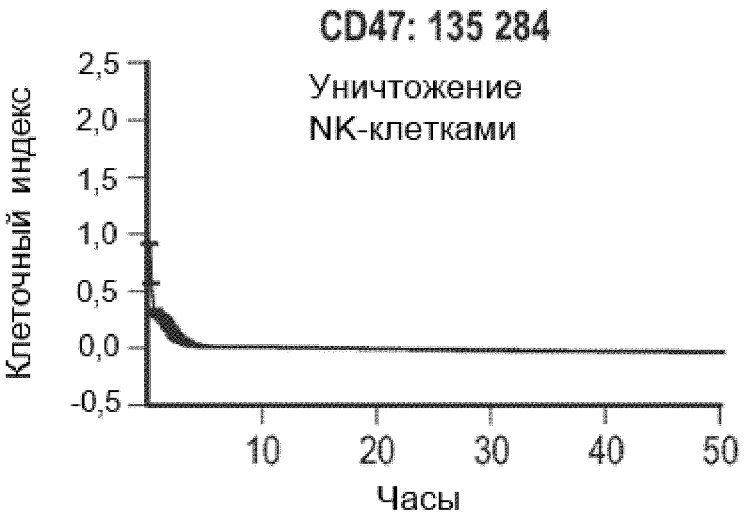
ФИГ. 2F



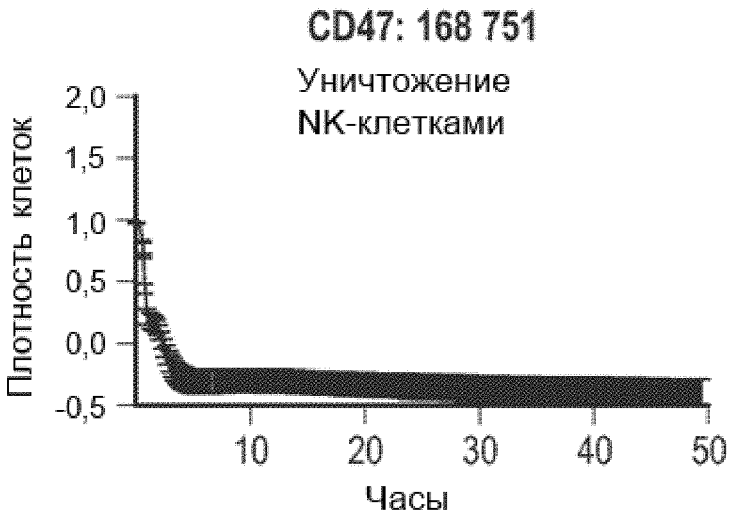
ФИГ. 2G



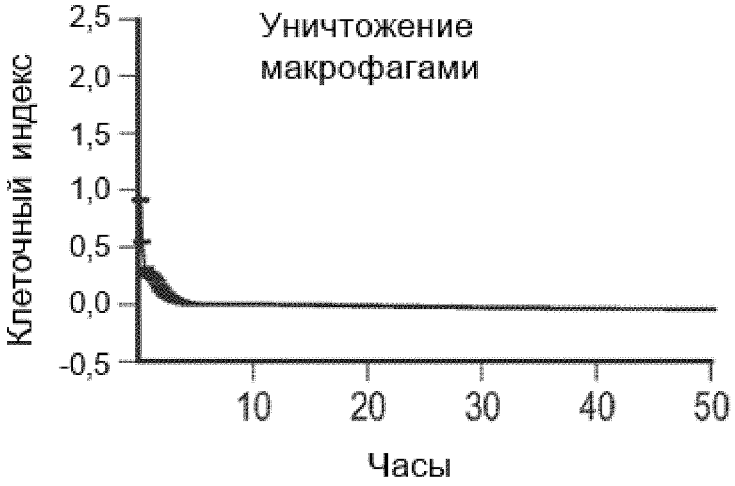
ФИГ. 2H



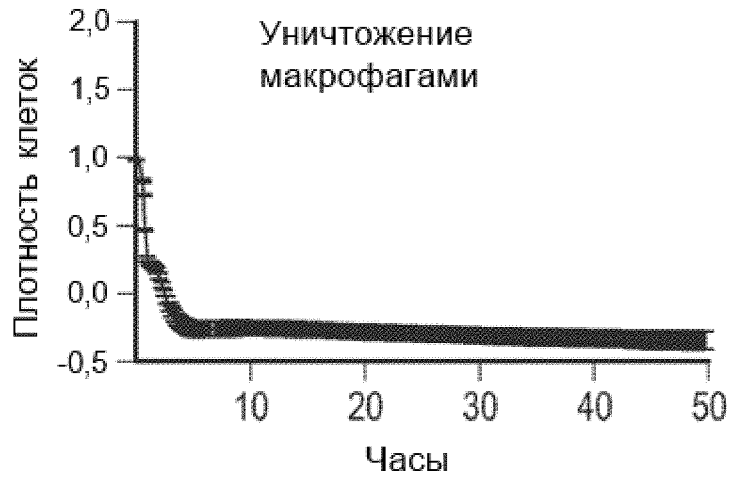
ФИГ. 2I



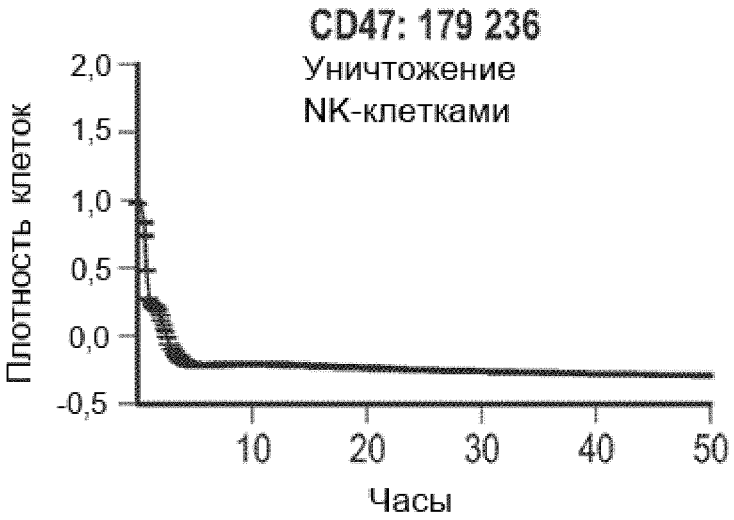
ФИГ. 2K



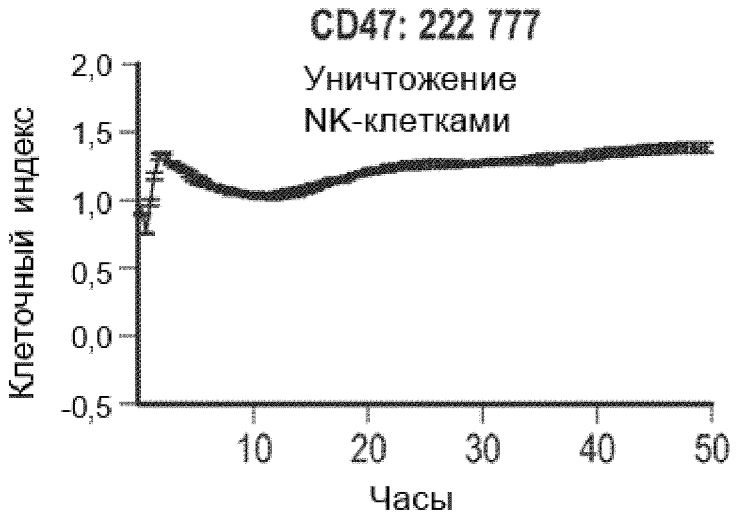
ФИГ. 2J



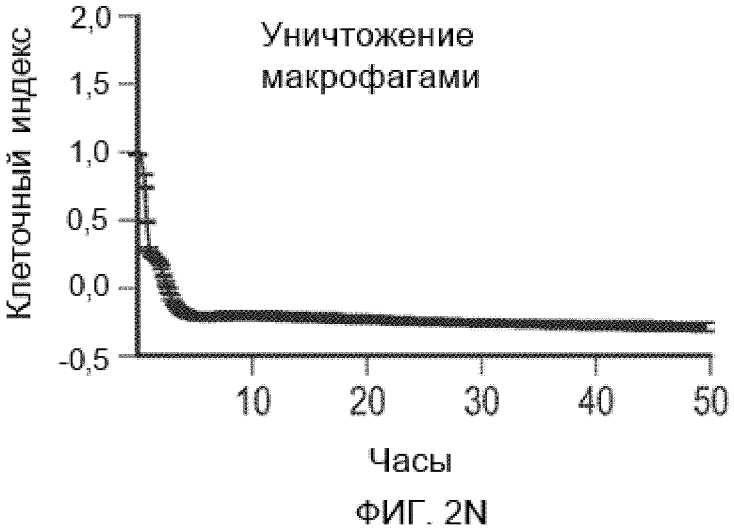
ФИГ. 2L



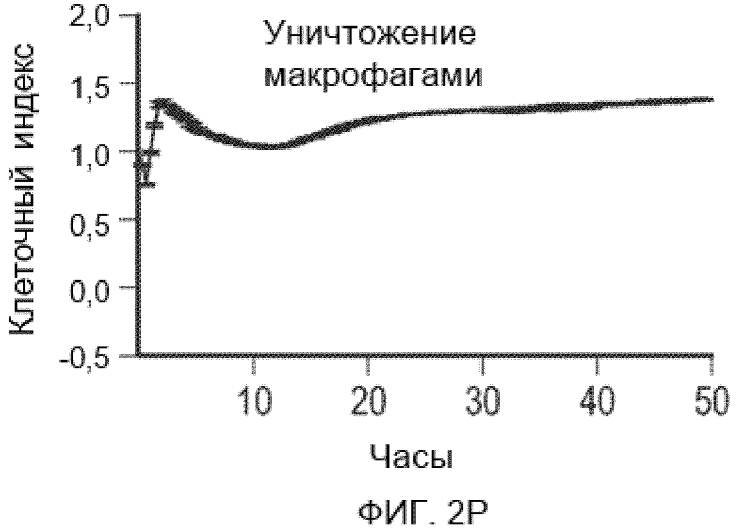
ФИГ. 2M



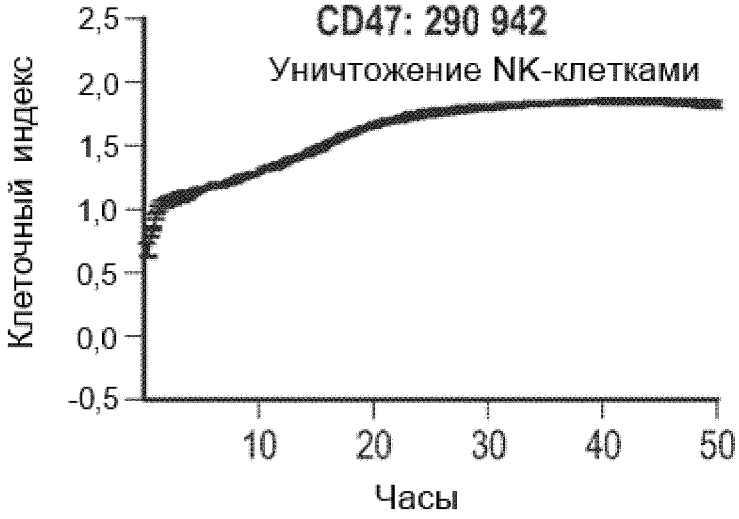
ФИГ. 2O



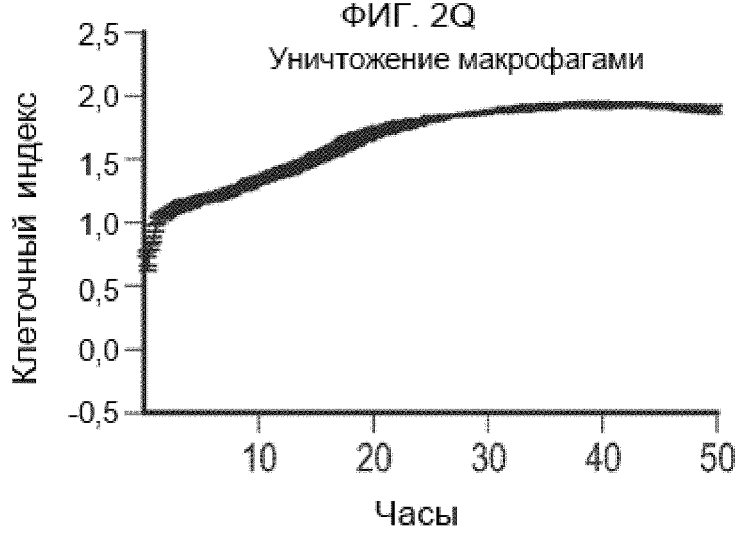
ФИГ. 2N



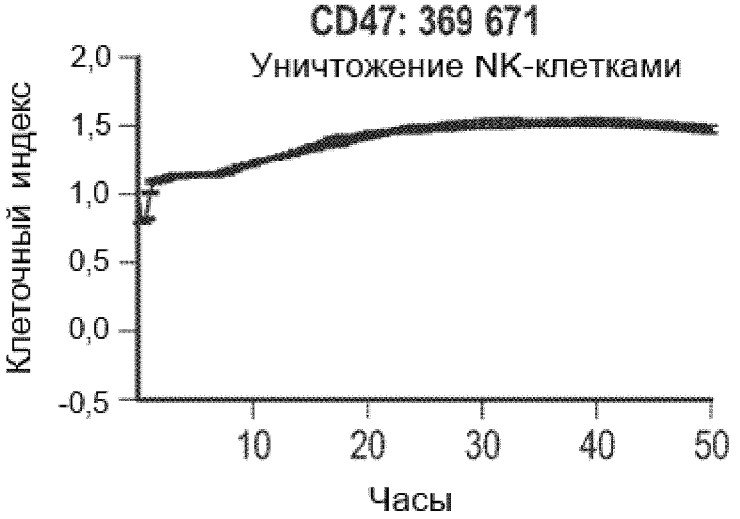
ФИГ. 2P



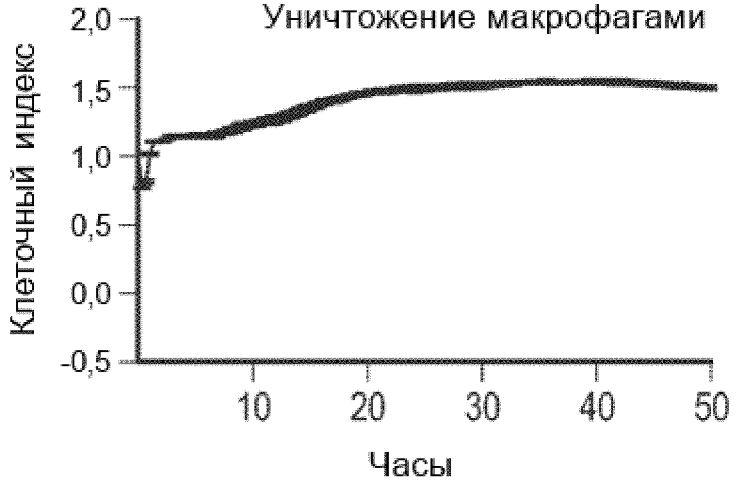
ФИГ. 2Q



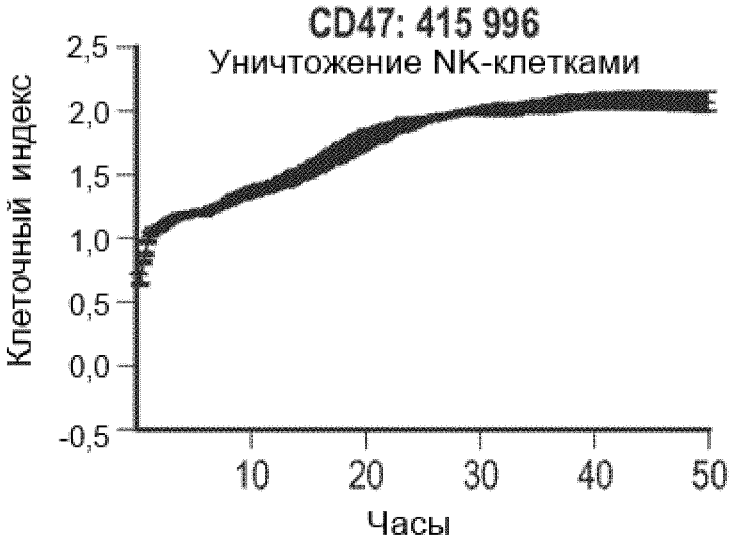
ФИГ. 2R



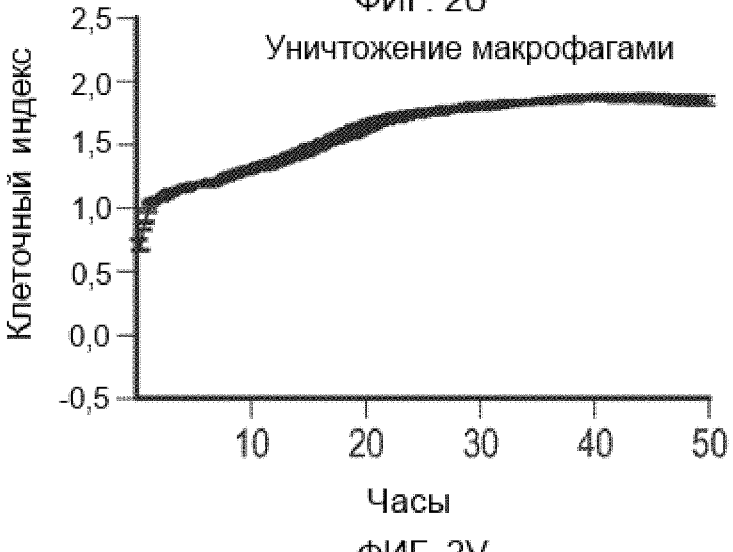
ФИГ. 2S



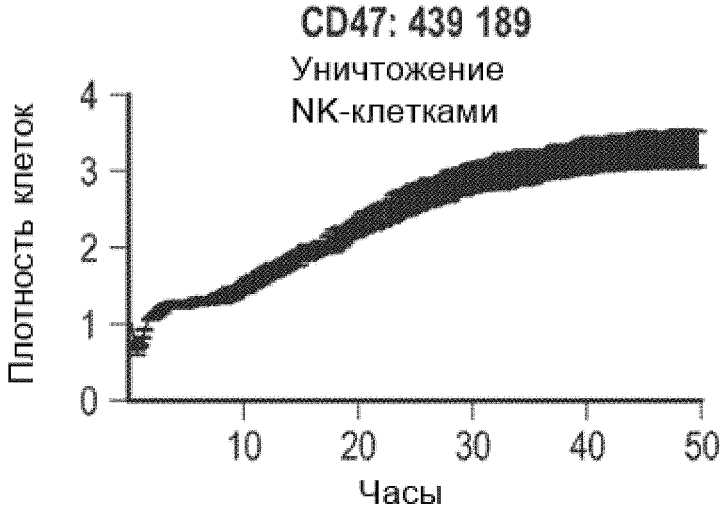
ФИГ. 2T



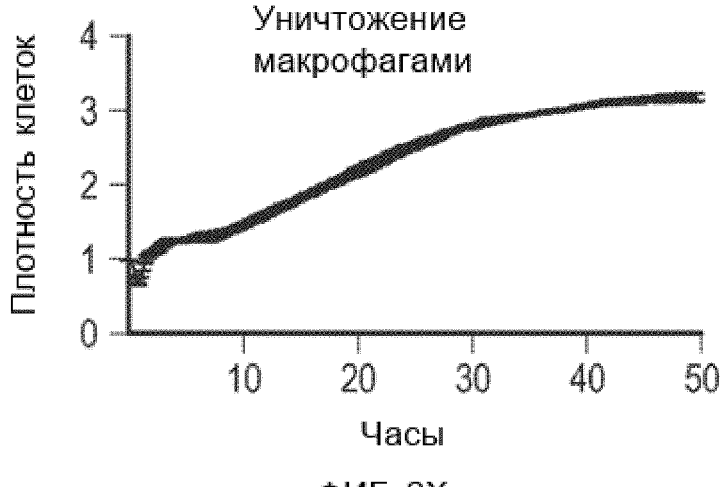
ФИГ. 2U



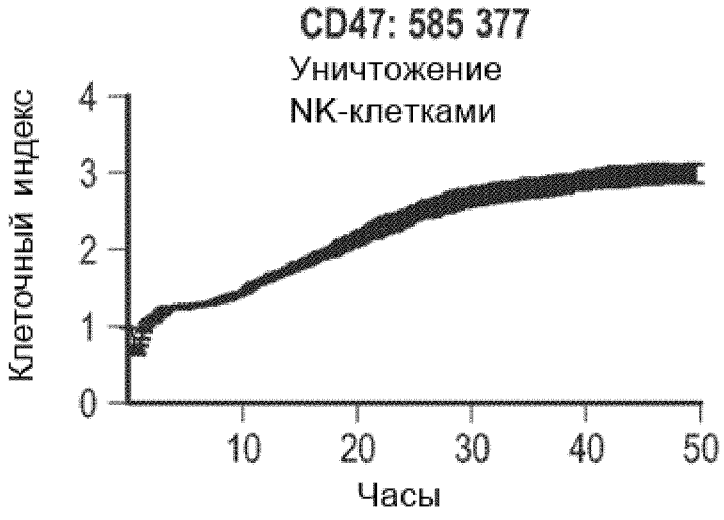
ФИГ. 2V



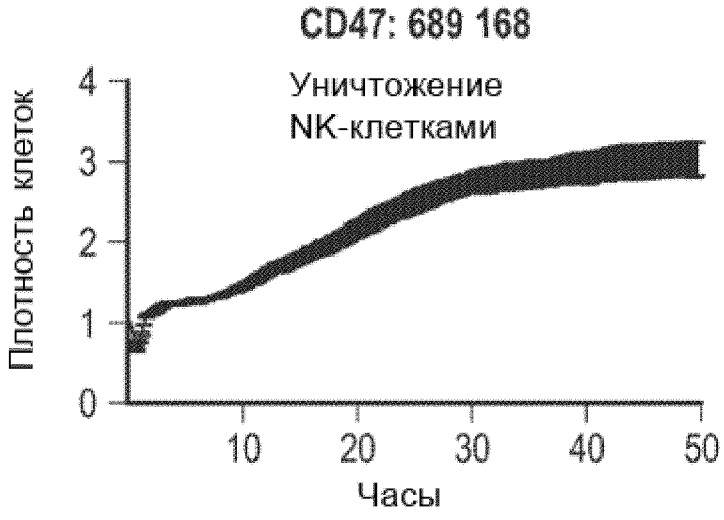
ФИГ. 2W



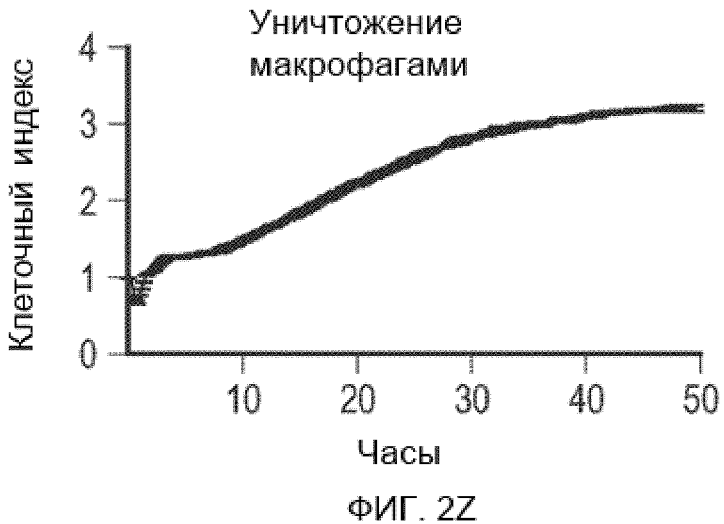
ФИГ. 2X



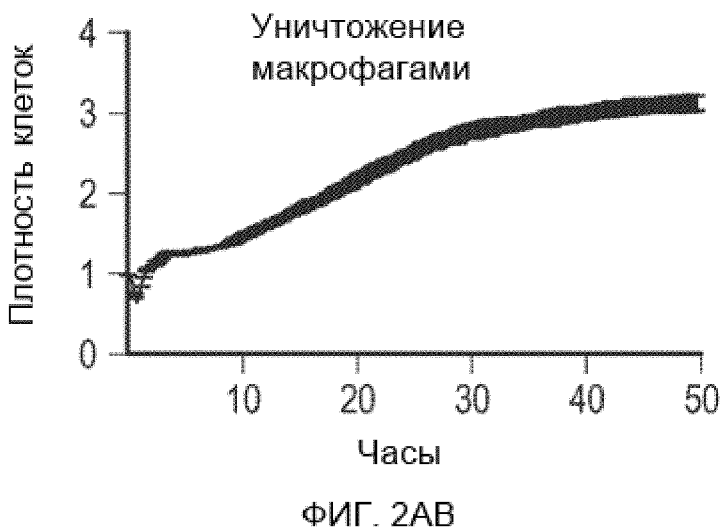
ФИГ. 2Y



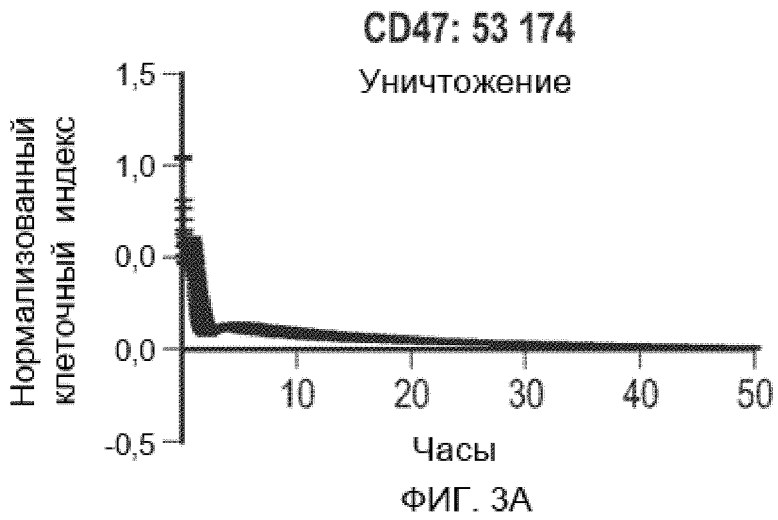
ФИГ. 2AA



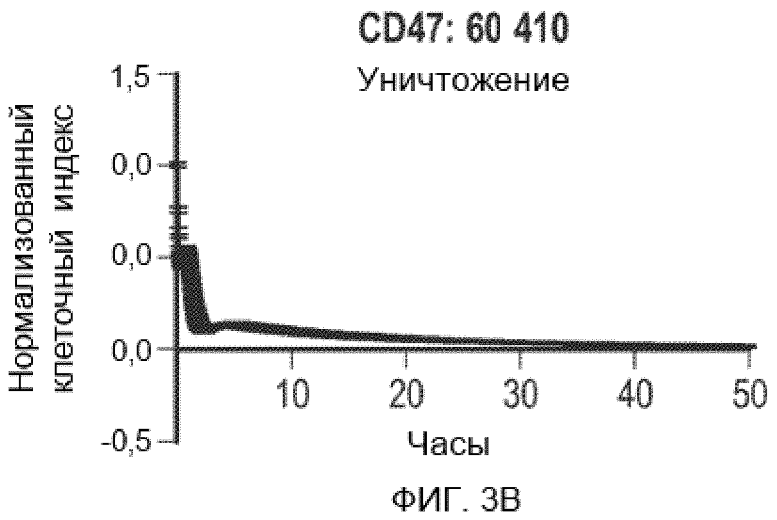
ФИГ. 2Z



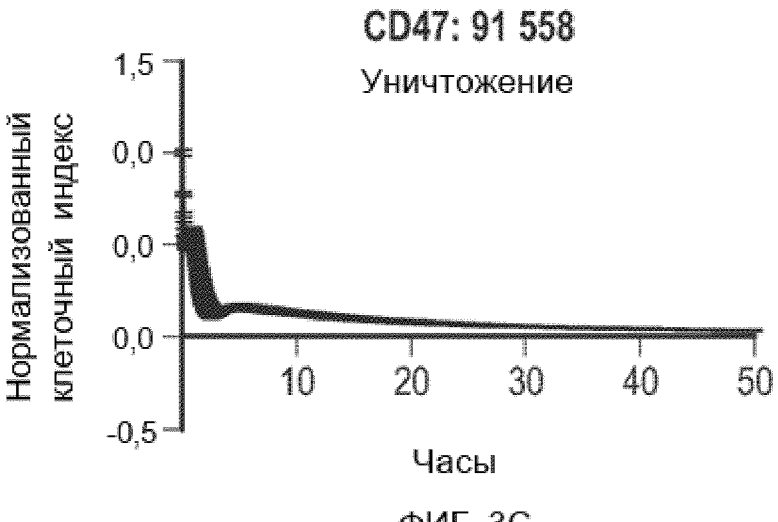
ФИГ. 2AB



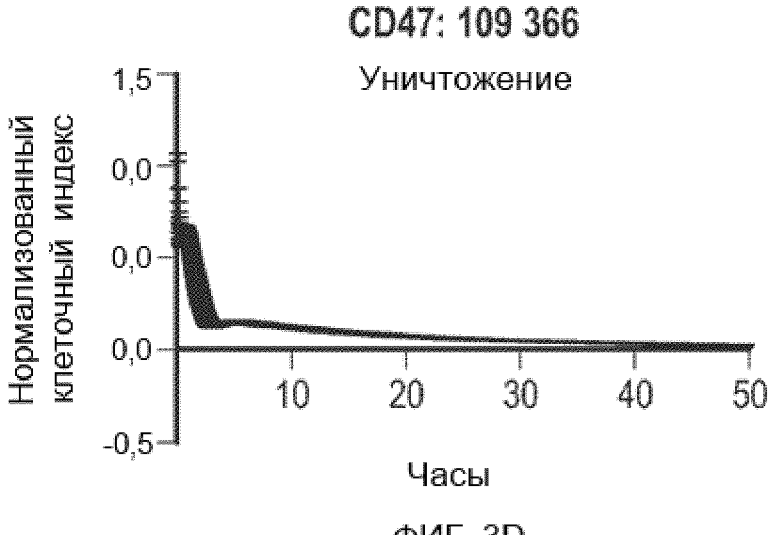
ФИГ. 3А



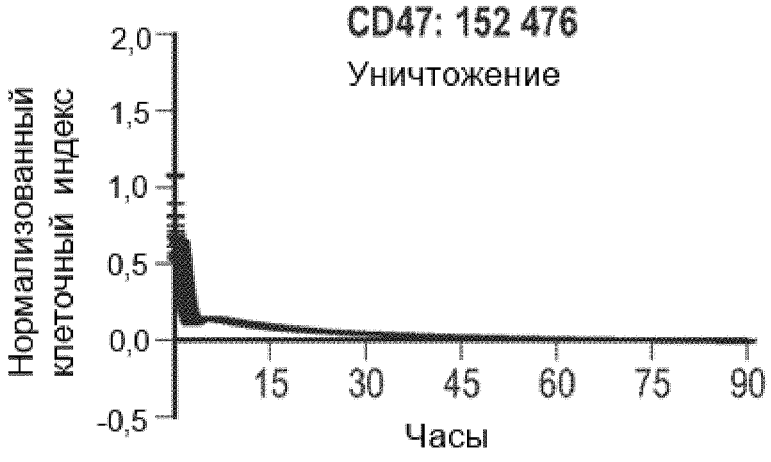
ФИГ. 3В



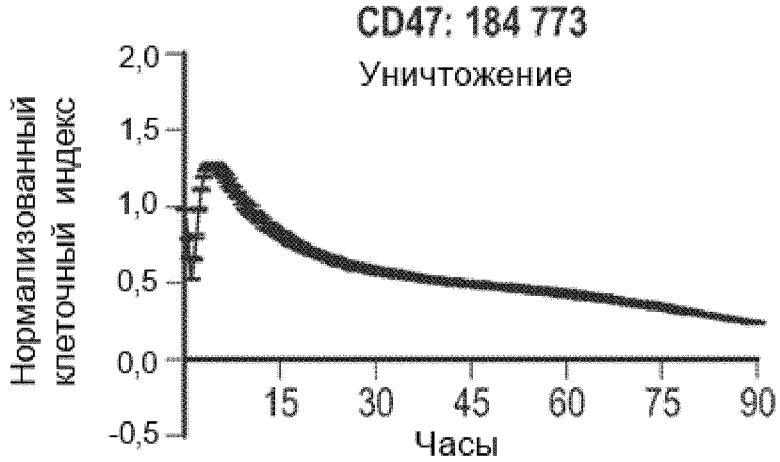
ФИГ. 3С



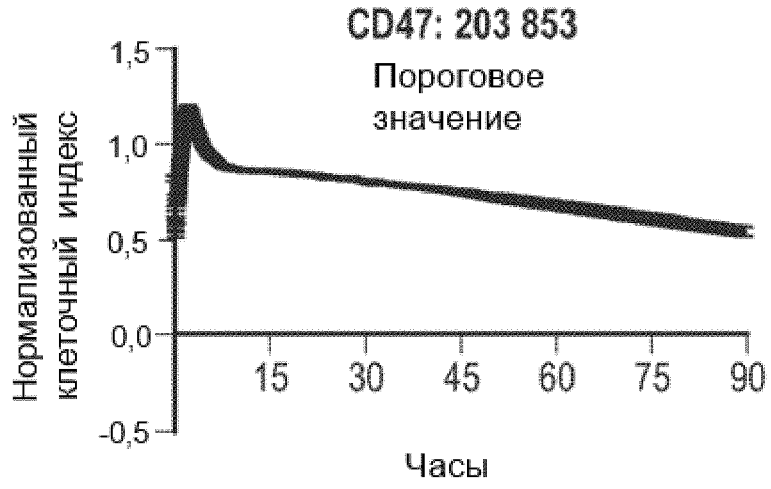
ФИГ. 3D



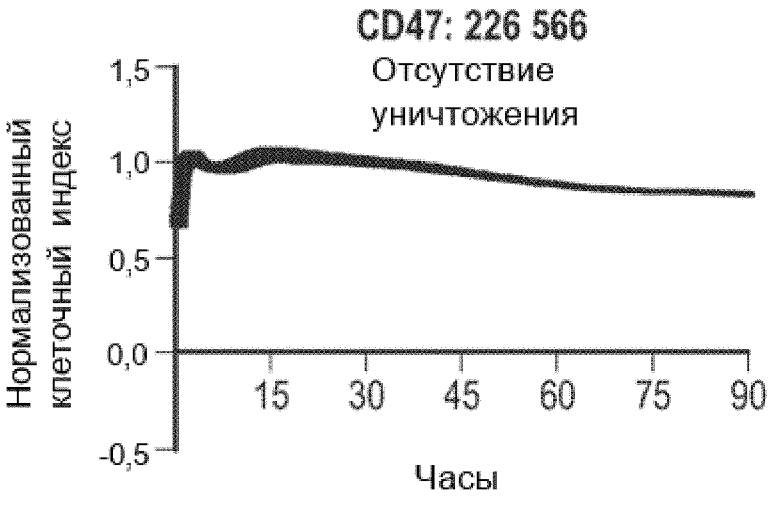
ФИГ. 3E



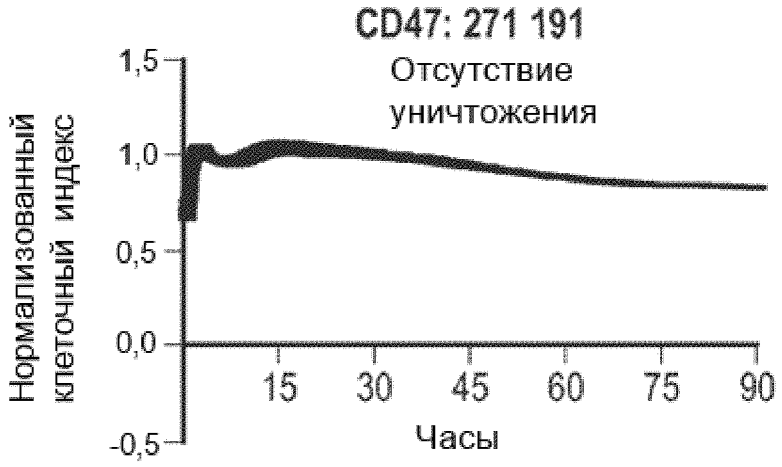
ФИГ. 3F



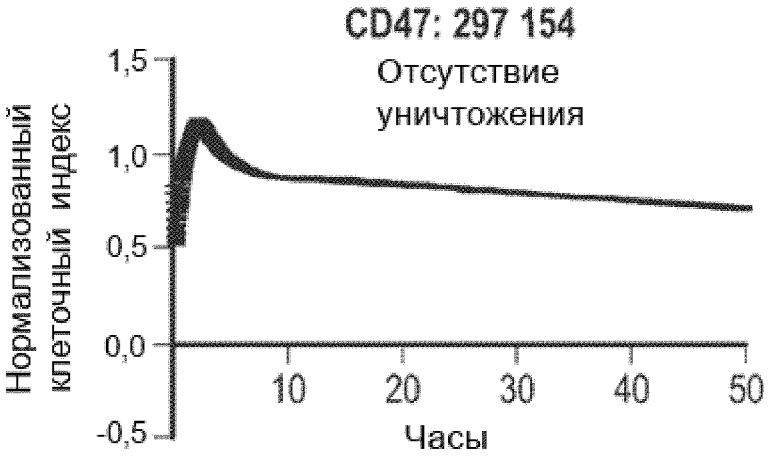
ФИГ. 3G



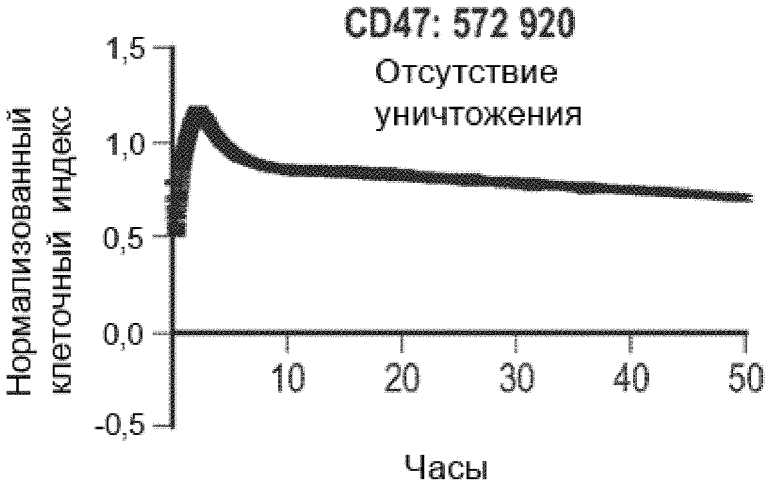
ФИГ. 3H



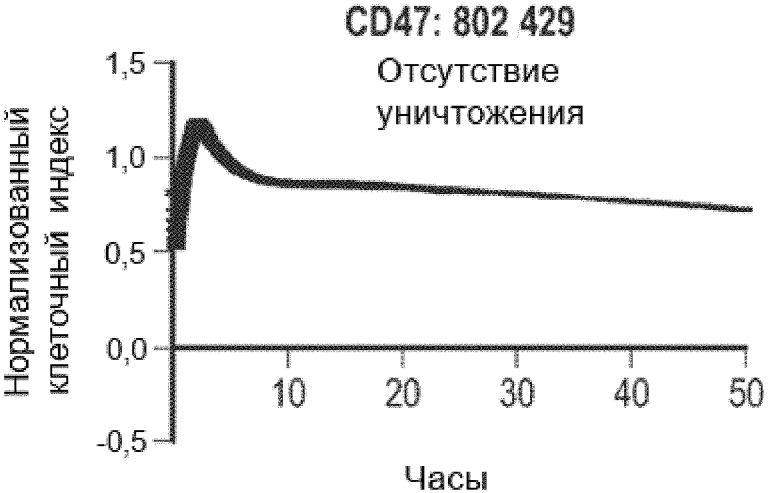
ФИГ. 3I



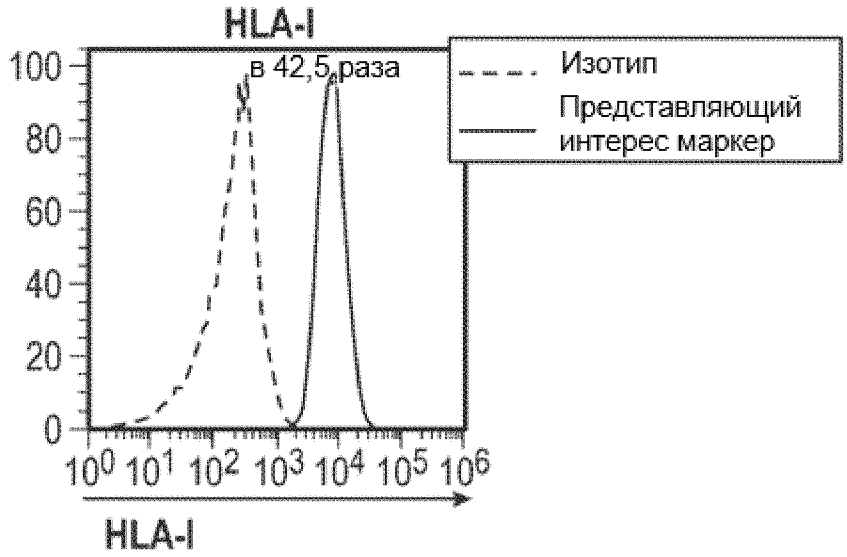
ФИГ. 3J



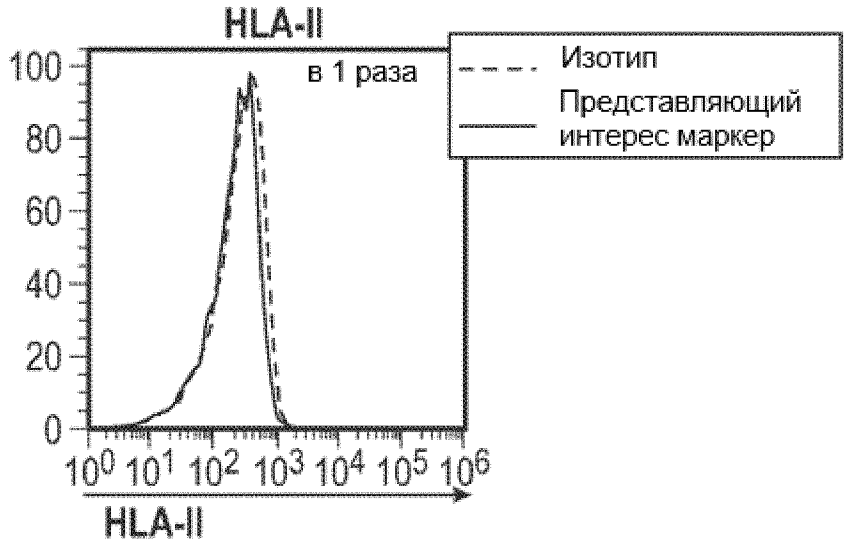
ФИГ. 3K



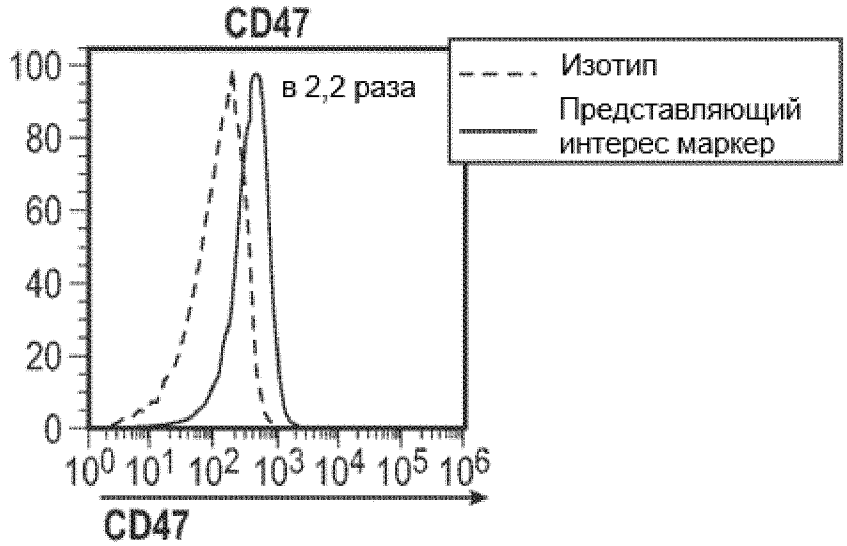
ФИГ. 3L



ФИГ. 4A

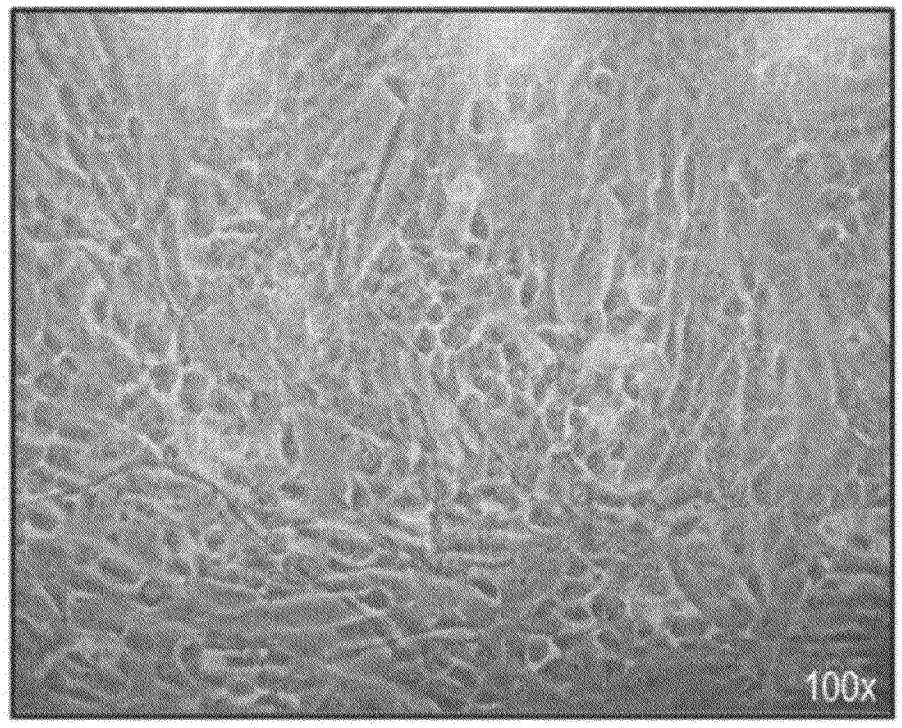


ФИГ. 4B

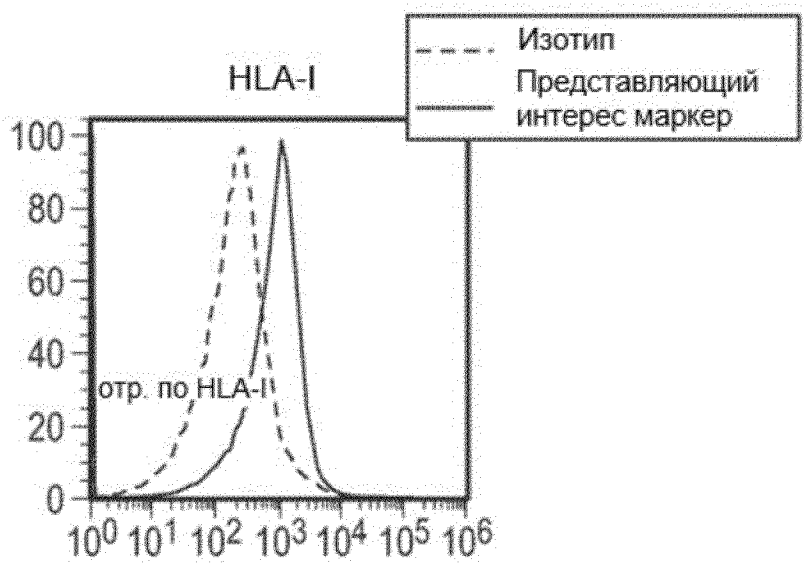


ФИГ. 4C

B2M/CIITA KO + CD47

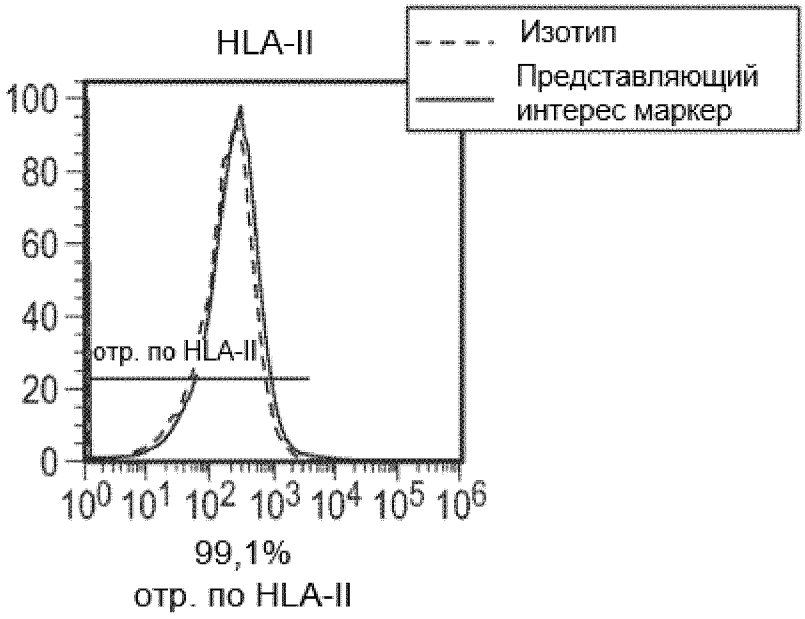


ФИГ. 5A

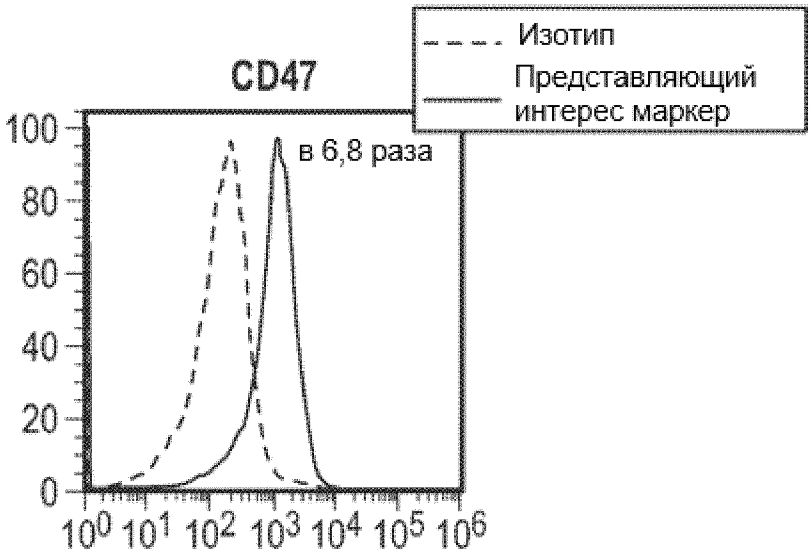


40,2%
отр. по HLA-I

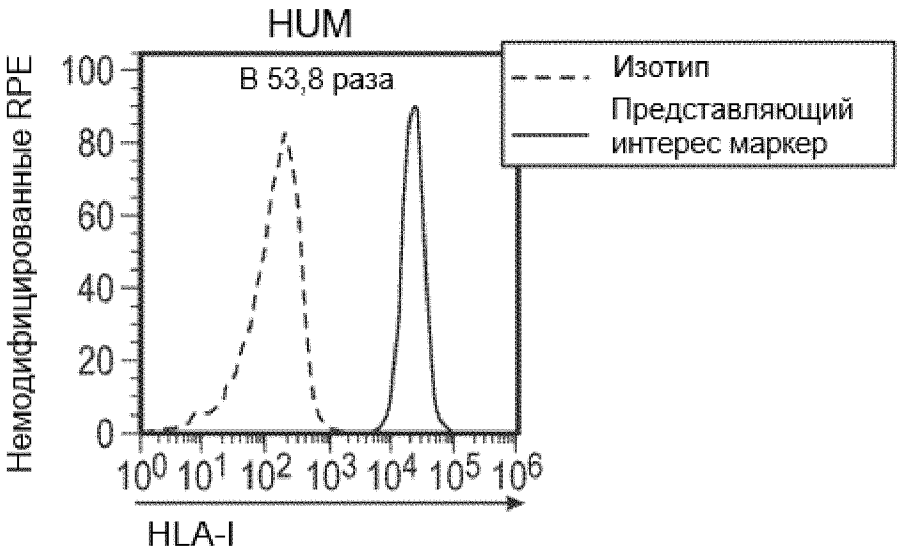
ФИГ. 5B


HLA-II
Изотип
Представляющий интерес маркер
100
80
60
40
20
0
отр. по HLA-II
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
99,1%
отр. по HLA-II

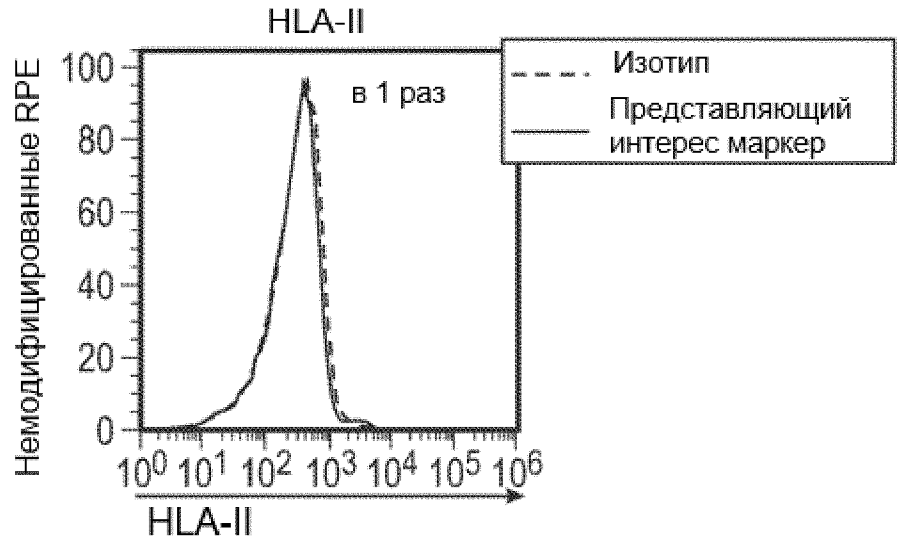
ФИГ. 5C


CD47
Изотип
Представляющий интерес маркер
в 6,8 раза
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6

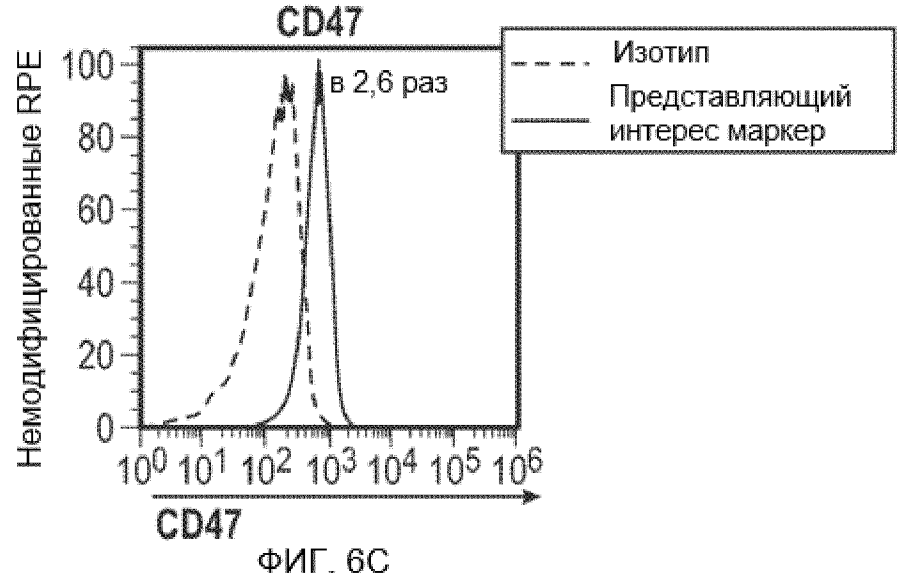
ФИГ. 5D



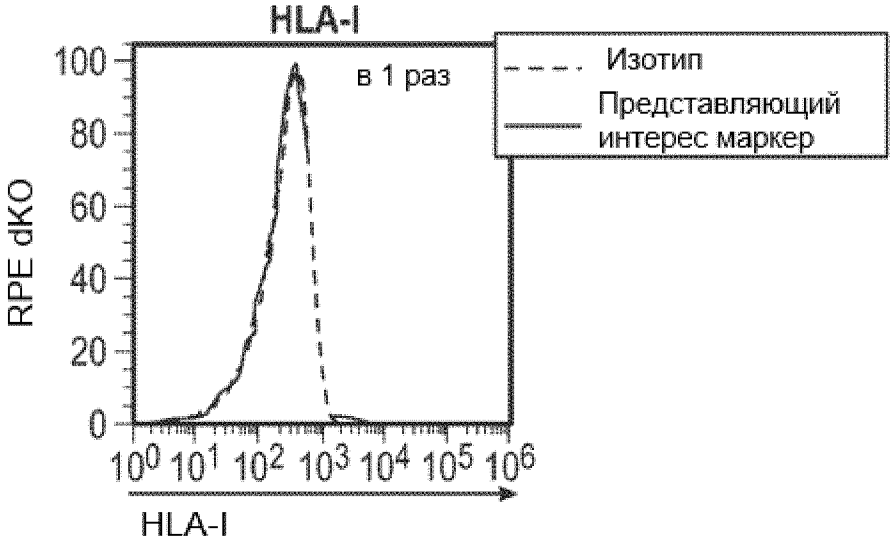
ФИГ. 6A



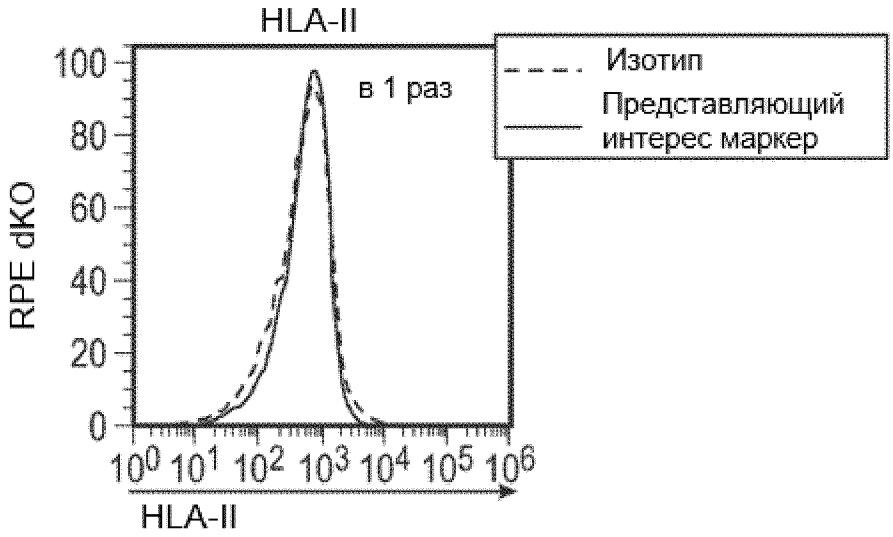
ФИГ. 6B



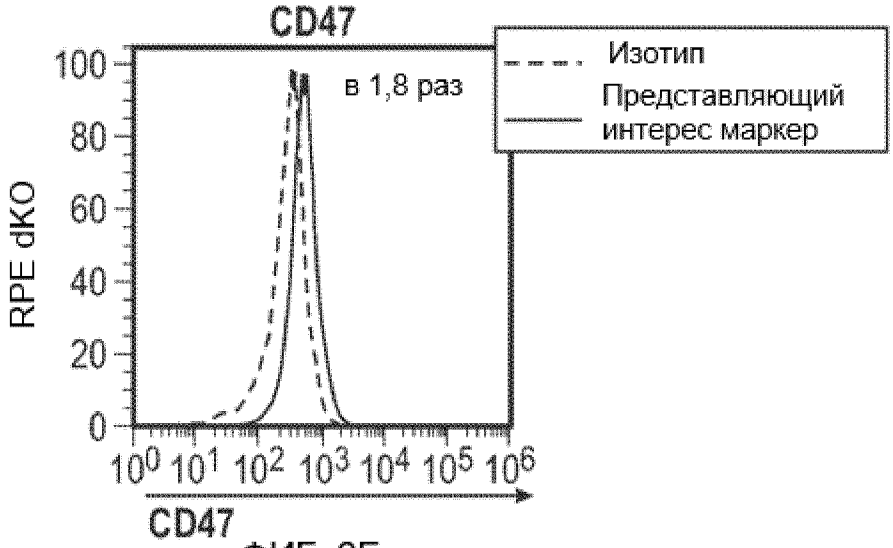
ФИГ. 6C



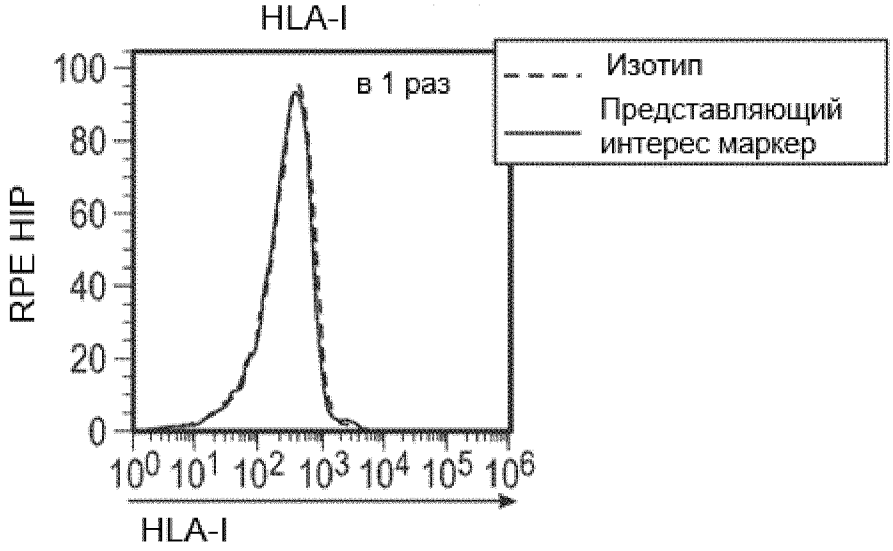
ФИГ. 6D



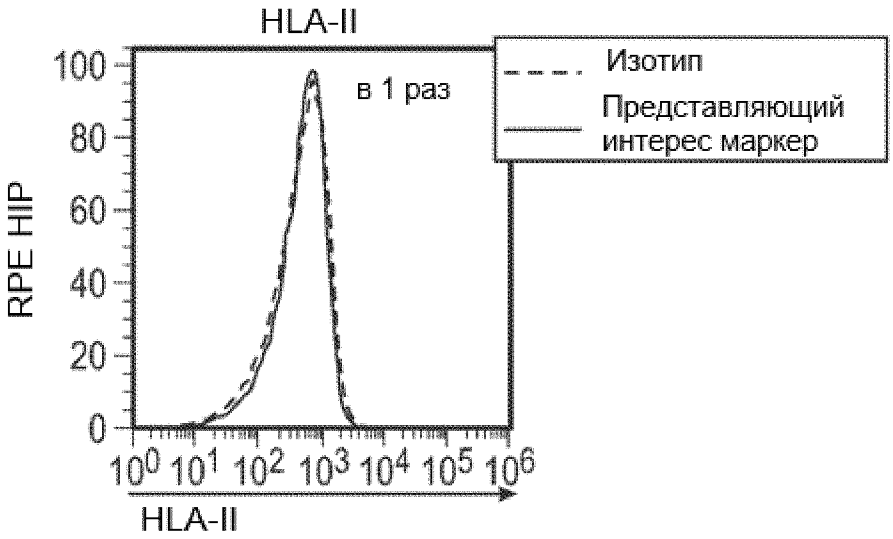
ФИГ. 6E



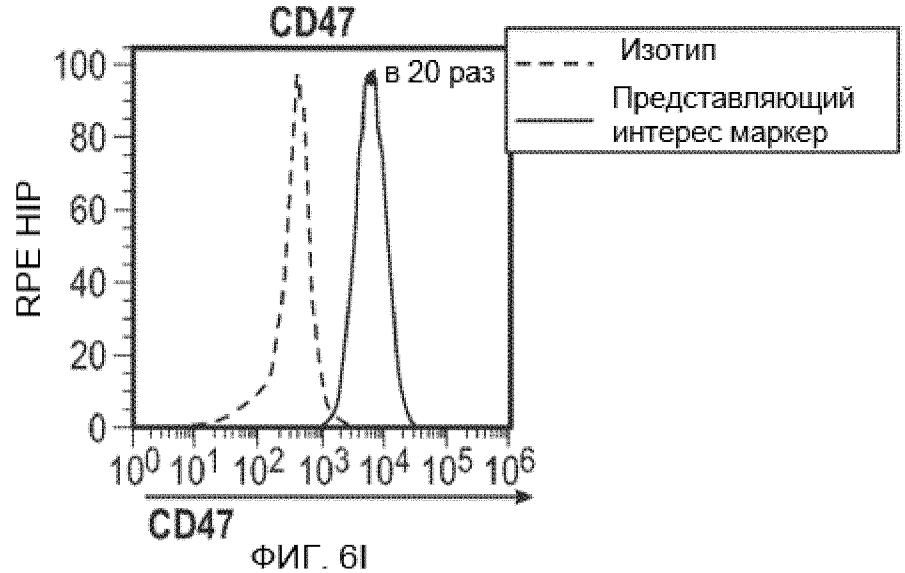
ФИГ. 6F



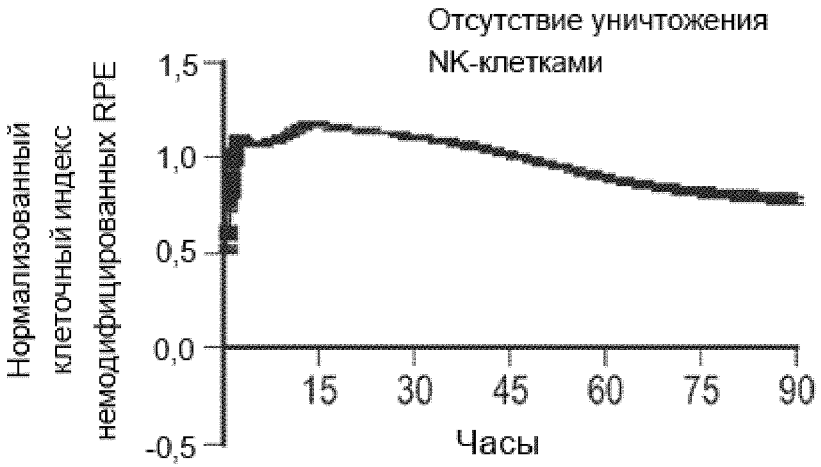
ФИГ. 6G



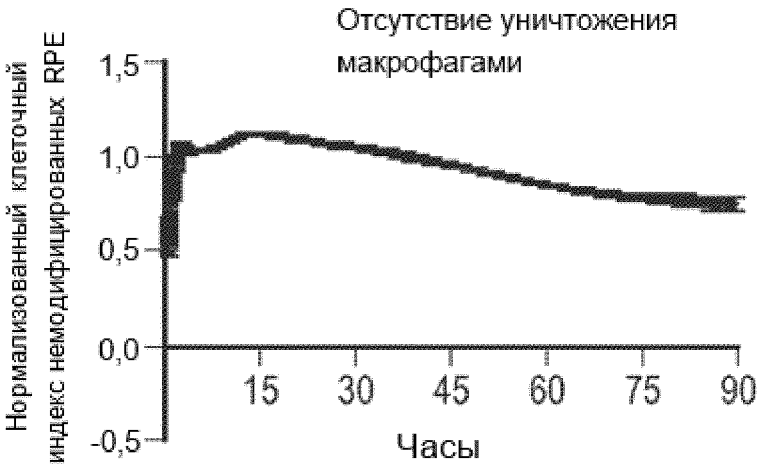
ФИГ. 6H



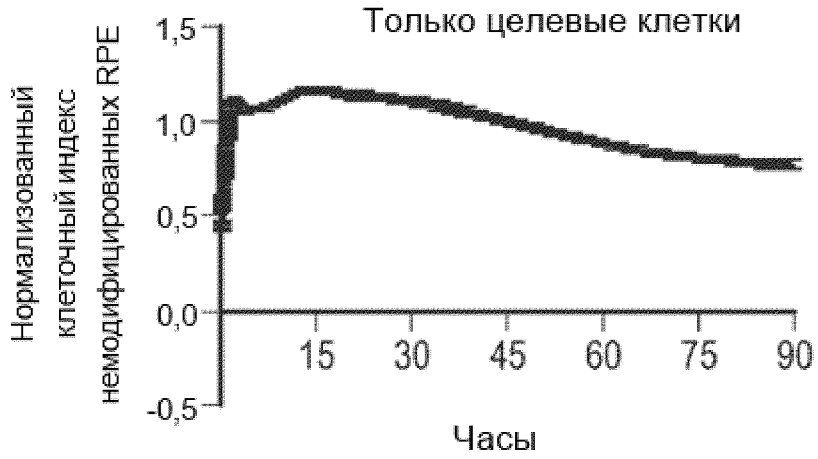
ФИГ. 6I



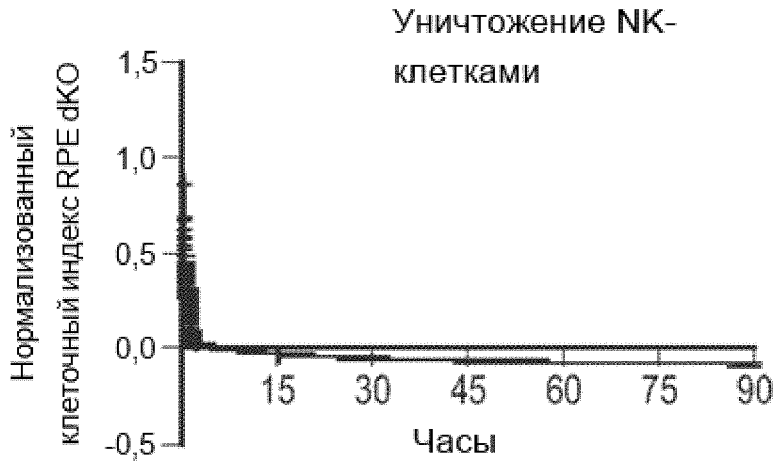
ФИГ. 7A



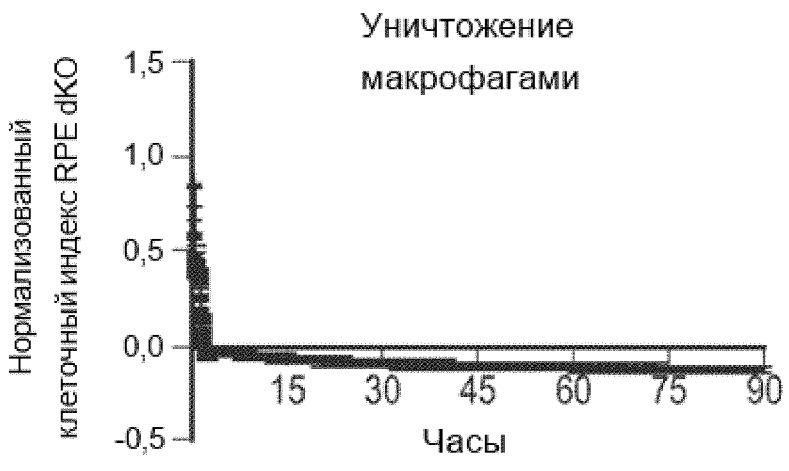
ФИГ. 7B



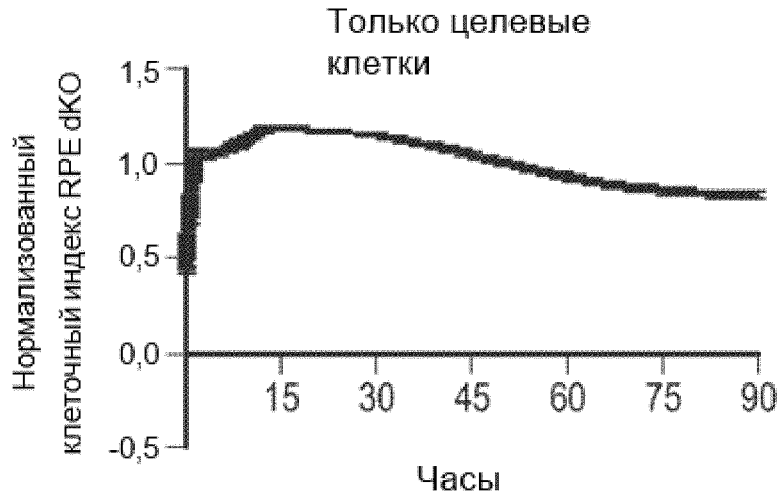
ФИГ. 7C



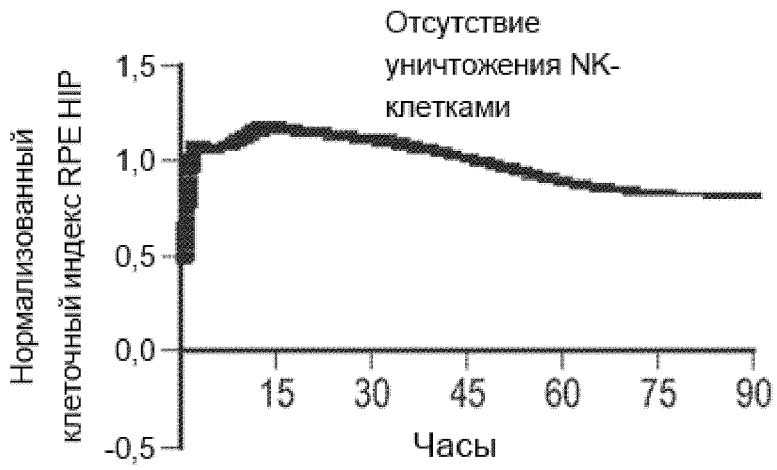
ФИГ. 7D



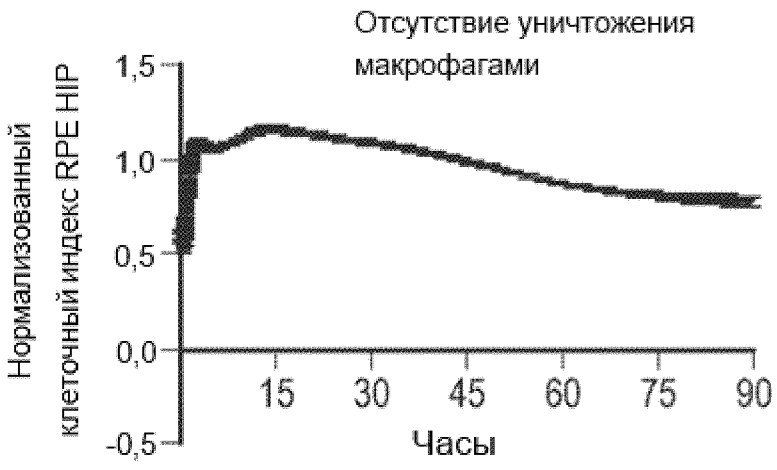
ФИГ. 7E



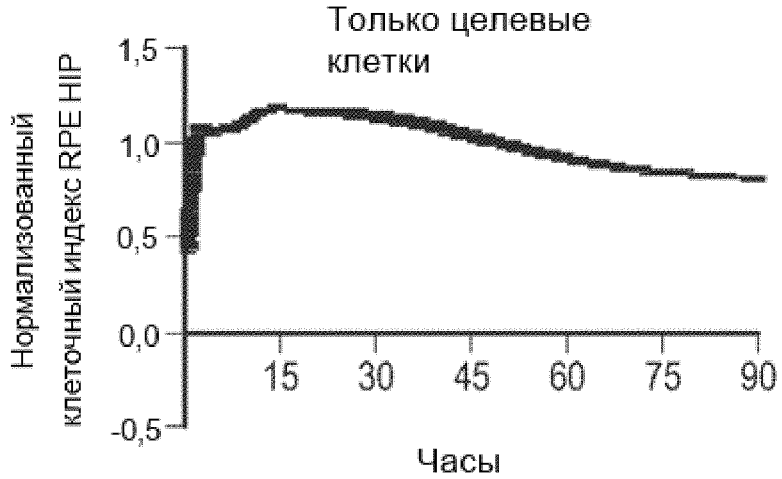
ФИГ. 7F



ФИГ. 7G



ФИГ. 7H



ФИГ. 7I