

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092711** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.04.13

(22) Дата подачи заявки
2019.05.10

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) 62/670,417; 62/701,340; 62/756,643;
62/773,658; 62/826,600

(32) 2018.05.11; 2018.07.20; 2018.11.07;
2018.11.30; 2019.03.29

(33) US

(86) PCT/IB2019/000500

(87) WO 2019/215500 2019.11.14

(71) Заявитель:
КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Терретт Джонатан Александр,
Калаицидис Деметриос, Декан Мэри-
Ли, Падалия Зинкал Самир (US)

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

(57) В некоторых вариантах осуществления изобретения представлены способы и композиции (например, композиции на основе клеток) для лечения рака.

A1

202092711

202092711

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565553EA/025

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/670417, поданной 11 мая 2018 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/701340, поданной 20 июля 2018 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/756643, поданной 7 ноября 2018 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/773658, поданной 30 ноября 2018 года; и предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/826600, поданной 29 марта 2019 года. Полное содержание вышеупомянутых заявок на патенты включено в данный документ посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В терапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) используют генетически модифицированные Т-клетки для более специфичного и эффективного нацеливания и уничтожения раковых клеток. После сбора Т-клеток из крови их конструируют с возможностью размещения CAR на их поверхности. CAR можно вводить в Т-клетки с использованием технологии редактирования генов CRISPR/Cas9. Когда эти аллогенные Т-клетки с CAR вводят путем инъекции пациенту, рецепторы позволяют Т-клеткам уничтожать раковые клетки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены сконструированные иммунные клетки (например, Т-клетки) и способы получения иммунных клеток, которые были отредактированы с использованием технологии редактирования генов CRISPR/Cas9 для нарушения экспрессии эндогенного CD70 (нокаут по CD70).

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная иммунная клетка (например, Т-клетка), имеющая нарушение в гене *CD70*. В некоторых вариантах осуществления сконструированные иммунные клетки являются аллогенными Т-клетками, содержащими нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления сконструированные иммунные клетки являются аллогенными Т-клетками, содержащими ген *TRAC*, нарушенный путем вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, нарушенный ген *β2M* и нарушенный ген *CD70*. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления сконструированные иммунные клетки (например, Т-клетки) содержат нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген *B2M*, нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная клетка (например, Т-клетка) дополнительно содержит нарушенный ген *PD-1*. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, нацеливается на опухолевый антиген (например,

BCMA, CD19, CD33 или CD70).

В некоторых аспектах предусмотренная сконструированная иммунная клетка (например, Т-клетка) характеризуется улучшенной Т-клеточной функцией, в том числе предотвращением преждевременного истощения, усиленным увеличением количества Т-клеток с CAR и повышенной эффективностью уничтожения раковых клеток. В некоторых аспектах предусмотренная сконструированная иммунная клетка (например, Т-клетка) характеризуется непрерывным устойчивым ростом клеток по сравнению с неотредактированными Т-клетками или по сравнению с отредактированными Т-клетками, которые экспрессируют CD70, а также демонстрирует повышенную цитотоксичность и секрецию цитокина (например, IL-2 и/или IFN-гамма).

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который не связывает CD70. В некоторых аспектах сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген константной области Т-клеточного рецептора альфа (TRAC). В некоторых аспектах нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который не связывает CD70. В некоторых аспектах сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая: (i) нарушенный ген *TRAC*; (ii) нарушенный ген *B2M*; (iii) нарушенный ген *CD70* и (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который не связывает CD70.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который не связывает CD70.

В некоторых аспектах сконструированная Т-клетка в популяции клеток содержит нарушенный ген константной области Т-клеточного рецептора альфа (TRAC). В некоторых аспектах нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который не связывает CD70. В некоторых аспектах сконструированная Т-клетка в популяции клеток содержит нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат: (i) нарушенный ген *TRAC*; (ii) нарушенный ген *B2M*; (iii) нарушенный ген *CD70* и (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который не связывает CD70.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов CAR содержит эктодомен, который связывает антиген созревания В-клеток (BCMA). В некоторых аспектах эктодомен содержит антитело к BCMA. В некоторых аспектах эктодомен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) к BCMA. В некоторых аспектах scFv к BCMA содержит определяющие комплементарность области (CDR) переменной области тяжелой (VH) цепи и такие же CDR переменной области легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело,

где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 60, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 61. В некоторых аспектах scFv к ВСМА содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 60 и 61 соответственно. В некоторых аспектах scFv к ВСМА содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59. В некоторых аспектах scFv к ВСМА кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 57.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов scFv к ВСМА содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления scFv к ВСМА содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления scFv к ВСМА содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления scFv к ВСМА содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности CDR под (i) SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82 и/или SEQ ID NO: 84 или (ii) SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 85; и/или scFv к ВСМА содержит последовательность VL, содержащую аминокислотные последовательности CDR под (i) SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76 и/или SEQ ID NO: 78.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов CAR содержит эктодомен, который связывает CD33. В некоторых аспектах эктодомен содержит антитело к CD33. В некоторых аспектах эктодомен содержит scFv к CD33. В некоторых аспектах scFv к CD33 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL-цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 140, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 141. В некоторых аспектах scFv к CD33 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 140 и 141 соответственно. В некоторых аспектах scFv к CD33 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 137.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов CAR содержит эктодомен, который связывает CD19. В некоторых аспектах, при этом, эктодомен содержит антитело к CD19. В некоторых аспектах эктодомен содержит scFv к CD19. В некоторых аспектах scFv к CD19 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL-цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 152, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 153. В некоторых аспектах scFv к CD19 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 152 и 153 соответственно. В некоторых аспектах scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая: (i) нарушенный ген *TRAC*; (ii) нарушенный ген *B2M*; (iii) нарушенный ген *CD70* и (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который связывает CD70. В некоторых аспектах нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат: (i) нарушенный ген *TRAC*; (ii) нарушенный ген *B2M*; (iii) нарушенный ген *CD70* и (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, который связывает *CD70*.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*;

(ii) нарушенный ген $\beta 2M$;

(iii) нарушенный ген *CD70*;

(iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, содержащий (a) эктодомен, который содержит scFv к *CD70*, (b) трансмембранный домен *CD8* и (c) эндомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен *CD3z*.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов *CAR*, который связывает *CD70*, содержит эктодомен, который содержит антитело к *CD70*. В некоторых аспектах *CAR* содержит эктодомен, содержащий scFv к *CD70*. В некоторых аспектах scFv к *CD70* содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 51, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 52. В некоторых аспектах scFv к *CD70* содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 51 и 52 соответственно. В некоторых аспектах scFv к *CD70* содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50. В некоторых аспектах scFv к *CD70* содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов scFv к *CD70* содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления scFv к *CD70* содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления scFv к *CD70* содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности CDR под (i) SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 и/или SEQ ID NO: 72 или (ii) SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 и/или SEQ ID NO: 73; и/или scFv к *CD70* содержит последовательность VL, содержащую аминокислотные последовательности CDR под (i) SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 и/или SEQ ID NO: 66 или (ii) SEQ ID NO: SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65 и/или SEQ ID NO: 67.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов *CAR* содержит костимулирующий домен *CD28* или 41BB. В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов *CAR* содержит сигнальный домен *CD3z*. В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов *CAR* содержит трансмембранный домен *CD8*.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов имеется делеция в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых аспектах делеция составляет 15-30 пар оснований. В некоторых аспектах делеция составляет 20 пар оснований. В некоторых аспектах делеция предусматривает SEQ ID NO: 86. В некоторых аспектах делеция соответствует SEQ ID NO: 86.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, который связывает *CD70*, где *CAR* содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, который связывает *CD70*, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, который связывает *CD70*, где последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления ген *CD70* нарушают посредством редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* нарушают посредством редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления ген *B2M* нарушают посредством редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления ген *PD-1* нарушают посредством редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46;

(ii) нарушенный ген *B2M* и

(iii) нарушенный ген *CD70*. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая *CAR*, предусматривает последовательность, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентичную с SEQ ID NO: 45.

В других аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45;

(ii) нарушенный ген *B2M* и

(iii) нарушенный ген *CD70*. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген *TRAC* содержит донорную последовательность, предусматривающую нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 45, или SEQ ID NO: 44.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген *TRAC*, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты,

на по меньшей мере 90% идентичную с SEQ ID NO: 44;

(ii) нарушенный ген B2M и

(iii) нарушенный ген CD70.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген TRAC, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 44;

(ii) нарушенный ген B2M и

(iii) нарушенный ген CD70.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген *PD-1*. В некоторых аспектах сконструированные иммунные клетки являются аллогенными Т-клетками, содержащими ген *TRAC*, нарушенный вследствие вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, нарушенный ген β 2M и нарушенный ген *PD-1*. В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная клетка (например, Т-клетка) дополнительно содержит нарушенный ген *CD70*.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов сконструированная Т-клетка сохраняет цитотоксичность после 5 повторных воздействий целевой клетки, где целевая клетка экспрессирует антиген, специфический к CAR. В некоторых аспектах сконструированная Т-клетка сохраняет цитотоксичность после 10 повторных воздействий целевой клетки. В некоторых аспектах целевая клетка представляет собой раковую клетку. В некоторых аспектах целевая клетка представляет собой раковую клетку при раке кроветворных клеток или клетку солидной опухоли.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов сконструированная Т-клетка или популяция клеток содержат CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57. В некоторых аспектах CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 56.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов сконструированная Т-клетка или популяция клеток содержат CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 139. В некоторых аспектах CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 136.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов сконструированная Т-клетка или популяция клеток содержат CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149. В некоторых аспектах CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 148.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов сконструированная Т-клетка или популяция клеток содержат CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46. В некоторых аспектах CAR кодируется последовательностью

нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к популяции клеток, содержащей любую из сконструированных иммунных клеток (например, Т-клеток), описываемых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит Т-клетки, которые содержат ген *TRAC* нарушенный вследствие вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей *CAR*, нарушенный ген $\beta 2M$ и нарушенный ген *CD70*. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген *B2M*, нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, нарушенный ген *B2M* и нарушенный ген *CD70*.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

- (i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, содержащий (a) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела к *CD70*, (b) трансмембранный домен *CD8* и (c) эндодомен, который содержит костимулирующий домен *41BB* и сигнальный домен *CD3z*;
- (ii) нарушенный ген бета-2-микроглобулина (*B2M*) и
- (iii) нарушенный ген *CD70*.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

- (i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46;
- (ii) нарушенный ген $\beta 2M$ и
- (iii) нарушенный ген *CD70*.

В других аспектах в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

- (i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45;
- (ii) нарушенный ген $\beta 2M$ и
- (iii) нарушенный ген *CD70*. В некоторых аспектах нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 45.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

- (i) нарушенный ген *TRAC*, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90% идентичную с SEQ ID NO: 44;

(ii) нарушенный ген *β2M* и

(iii) нарушенный ген *CD70*. В некоторых аспектах нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления *CAR* содержит сигнальный домен CD3z. В некоторых вариантах осуществления *CAR* содержит трансмембранный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления *CAR* содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов популяции клеток нарушенный ген *β2M* содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 9-14. В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов популяции клеток нарушенный ген *CD70* содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 129-134.

В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 45, и/или нуклеиновая кислота, кодирующая *CAR* к *CD70*, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 56, и/или нуклеиновая кислота, кодирующая *CAR* к *BCMA*, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 55.

В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 156, и/или нуклеиновая кислота, кодирующая *CAR* к *CD19*, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 156. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 135, и/или нуклеиновая кислота, кодирующая *CAR* к *CD33*, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 135.

В любом из вышеупомянутых аспектов сконструированные Т-клетки: (a) характеризуются повышенным клеточным пролиферативным потенциалом;

(b) характеризуются повышенным клеточным лизисом;

(c) характеризуются пониженным клеточным истощением;

(d) сохраняют цитокин-зависимую пролиферацию;

(e) характеризуются повышенной секрецией цитокина или

(f) характеризуются любой комбинацией из (a) - (e)

по сравнению с контрольными Т-клетками, где контрольные Т-клетки экспрессируют эндогенный белок CD70.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50%, необязательно 50%-65% сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне и не экспрессируют поверхностный белок β 2M на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок CD70 на обнаруживаемом уровне и/или экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90%, необязательно 90%-100% сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления более чем 99,5% сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 60%, необязательно 60%-75% сконструированных иммунных клеток (например, Т-клеток) не экспрессируют поверхностный белок β 2M на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80%, необязательно 80%-100% сконструированных иммунных клеток (например, Т-клеток) не экспрессируют поверхностный белок CD70 на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80%, необязательно 80%-95% сконструированных иммунных клеток (например, Т-клеток) экспрессируют CAR (например, CAR к CD70 или CAR к BCMA) на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные иммунные клетки (например, Т-клетки) дополнительно содержат нарушенный ген *PD-1*.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50%, необязательно 50%-70% сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок β 2M на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок PD-1 на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок CD70 на обнаруживаемом уровне и/или экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения сконструированной Т-клетки, при этом способ предусматривает:

(a) доставку в Т-клетку

РНК-направляемой нуклеазы,

gRNA, нацеливающейся на ген *CD70*, и

вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR; и

(b) получение сконструированной Т-клетки, содержащей нарушенный ген *CD70* и экспрессирующей CAR.

В некоторых аспектах способ дополнительно предусматривает доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген *TRAC*; где сконструированная Т-клетка дополнительно содержит нарушенный ген *TRAC*. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии к гену *TRAC*; и при этом сконструированная Т-клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, в гене *TRAC*. В некоторых аспектах способ дополнительно предусматривает доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$; где сконструированная Т-клетка дополнительно содержит нарушенный ген $\beta 2M$.

Также в данном документе представлены способы получения сконструированной Т-клетки, при этом способ предусматривает (а) доставку в Т-клетку РНК-направляемой нуклеазы, gRNA, нацеливающейся на ген *TRAC*, gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$, gRNA, нацеливающейся на ген *CD70*, и вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, необязательно где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии к локусу гена *TRAC*, и (б) получение сконструированной Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, необязательно нуклеазу Cas9 *Streptococcus pyogenes*. Могут быть использованы другие РНК-направляемые нуклеазы, и они описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 98 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 118, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 99 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 119, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 94 или 95 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 114 или 115, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26 или 27.

В любом из вышеупомянутых аспектов РНК-направляемая нуклеаза и gRNA, объединенные в комплекс, образуют рибонуклеопротеиновую частицу (RNP).

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно предусматривают доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген *PD-1*.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающаяся на ген *PD-1*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 100 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 120, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *PD-1*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 32.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения сконструированной Т-клетки для иммунотерапии против целевой клетки, предусматривающий:

(а) нарушение гена *CD70* в Т-клетке и

(b) экспрессию CAR, который связывается с антигеном, экспрессируемым на целевой клетке, где антиген не является *CD70*. В некоторых аспектах целевая клетка представляет собой раковую клетку. В некоторых аспектах способ выполняют *ex vivo*. В некоторых аспектах способ дополнительно предусматривает нарушение последовательности гена *TRAC* в Т-клетке. В некоторых аспектах способ дополнительно предусматривает нарушение последовательности гена $\beta 2M$ в Т-клетке. В некоторых аспектах CAR кодируется нуклеиновой кислотой в нарушенном гене *TRAC*. В некоторых аспектах CAR является любым из CAR, описываемых в данном документе.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена популяция сконструированных Т-клеток, полученных любым из способов, описываемых в данном документе.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ усиления пролиферации Т-клеток, предусматривающий нарушение последовательности гена *CD70* в Т-клетках. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ уменьшения истощения Т-клеток, предусматривающий нарушение последовательности гена *CD70* в Т-клетках. В любом из вышеупомянутых аспектов последовательность гена *CD70* нарушают путем редактирования генов с помощью CRISPR/Cas. В некоторых аспектах способ дополнительно предусматривает нарушение последовательности гена *TRAC*, последовательности гена $\beta 2M$ или последовательностей обоих генов *TRAC* и $\beta 2M$ в Т-клетках. В некоторых аспектах ген *TRAC*, ген $\beta 2M$ или и ген *TRAC*, и ген $\beta 2M$ нарушают путем редактирования генов с помощью CRISPR/Cas.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 139.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены способы введения популяции клеток или сконструированных Т-клеток, описанных в данном документе, субъекту. В некоторых аспектах сконструированные Т-клетки представляют собой сконструированные Т-клетки человека. В некоторых аспектах у субъекта имеется рак. В некоторых аспектах рак характеризуется экспрессией *CD70*, *BMCA*, *CD19*, *CD33* или их комбинаций. В некоторых аспектах популяцию клеток вводят субъекту в количестве,

эффективном для лечения рака. В некоторых аспектах рак представляет собой солидную злокачественную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль. В некоторых аспектах солидная злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, опухоли почки, опухоли легкого и опухоли желудочно-кишечного тракта. В некоторых аспектах популяцию клеток вводят субъекту в количестве, эффективном для снижения объема опухоли у субъекта.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение популяции клеток или сконструированных Т-клеток, описываемых в данном документе, субъекту.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение пациенту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат нарушенный ген CD70 и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает CD70. В некоторых вариантах осуществления CAR не связывает CD70.

В других аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение пациенту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

- (i) нарушенный ген TRAC;
 - (ii) нарушенный ген B2M;
 - (iii) нарушенный ген CD70 и
 - (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR;
- за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта.

В еще других аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение пациенту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

- (i) нарушенный ген TRAC;
- (ii) нарушенный ген B2M;
- (iii) нарушенный ген CD70 и
- (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий (a) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела к CD70, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен CD3z,

за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 44.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака

у субъекта, предусматривающий введение субъекту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*,

за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение субъекту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*,

за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта. В некоторых аспектах нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 45.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение субъекту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90% идентичную с SEQ ID NO: 44;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*,

за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта. В некоторых аспектах нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 44.

В любом из вышеупомянутых или связанных аспектов сконструированные Т-клетки представляют собой сконструированные Т-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки являются сконструированными аллогенными Т-клетками.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1** показан график, демонстрирующий высокоэффективное редактирование нескольких генов в Т-клетках с *TRAC*-/ *$\beta 2M$* -/*PD-1*-/*CD70*- (с нокаутом по четырем генам).

На **фиг. 2** показан график, демонстрирующий подобное увеличение количества среди клеток с редактированием нескольких генов.

На **фиг. 3** показаны графики, демонстрирующие эффективное редактирование нескольких генов в Т-клетках с *TRAC*-/ *$\beta 2M$* -/*CD70*-/*CAR* к *CD70*⁺ (т. е. 3X KO (*CD70*), *CD70*

CAR⁺).

На **фиг. 4** показан график, демонстрирующий, что поддерживаются нормальные количественные отношения CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток среди популяции Т-клеток с TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺.

На **фиг. 5** показан график, демонстрирующий эффективное редактирование нескольких генов в Т-клетках с TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺.

На **фиг. 6** показан график, демонстрирующий, что сохраняются нормальные количественные отношения CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток среди популяции Т-клеток с TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺ (т. е. 4X KO, CD70 CAR⁺).

На **фиг. 7А-7С** показаны графики, демонстрирующие данные по характеристике Т-клеток с CAR⁺ к ВСМА со случаями редактирования нескольких генов. Т-клетки с нокаутом по двум генам TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к ВСМА и Т-клетки с нокаутом по четырем генам TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к ВСМА окрашивали для экспрессии TRAC и β2M (**фиг. 7А**), PD-1 и CD70 (**фиг. 7В**) и ВСМА CAR (**фиг. 7С**). CAR к ВСМА был экспрессирован у приблизительно 80% Т-клеток с CAR с нокаутом как по двум, так и по четырем генам.

На **фиг. 8** показаны графики проточной цитометрии, демонстрирующие предотвращение потери CD4⁺ клеток среди Т-клеток с 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) CAR к CD33 по сравнению с Т-клетками с 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR к CD33 на протяжении трех недель.

На **фиг. 9** показан график, демонстрирующий, что KO CD70 усиливал клеточную пролиферацию в Т-клетках с CAR к CD33 на протяжении двух недель. Подсчитывали общее число жизнеспособных клеток среди Т-клеток с 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) и Т-клеток с 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR к CD33.

На **фиг. 10** показан график, демонстрирующий, что KO CD70 усиливал клеточную пролиферацию в Т-клетках с CAR к CD19 на протяжении двух недель. Подсчитывали общее число жизнеспособных клеток среди Т-клеток с 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) и Т-клеток с 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR к CD33.

На **фиг. 11** показаны графики, демонстрирующие, что KO CD70 усиливал клеточную пролиферацию в Т-клетках с CAR к ВСМА и устранял негативное воздействие KO PD1 на пролиферацию клеток с ВСМА CAR. Подсчитывали общее число жизнеспособных клеток среди Т-клеток с 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD1⁻), 3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), 3X KO (PD1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻) и Т-клеток с 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR к CD33.

На **фиг. 12** показаны графики, демонстрирующие, что KO CD70 усиливал клеточную пролиферацию в Т-клетках с CAR к ВСМА и устранял негативное воздействие KO PD1 на пролиферацию клеток с ВСМА CAR⁻. Подсчитывали общее число жизнеспособных клеток среди Т-клеток с 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD1⁻), 3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), 3X KO (PD1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻) и Т-клеток с 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR к CD33. Т-клетки с CAR к ВСМА были получены из разных донорских Т-клеток, как и Т-клетки с CAR, показанные на **фиг. 11**.

На **фиг. 13** показан график, демонстрирующий сравнение апоптотической смерти клеток из-за воздействия антигена в 2X КО (TRAC-/B2M-) CAR+ к BCMA Т-клетках и 3X КО (TRAC-/B2M-/CD70-) CAR+ к BCMA Т-клетках. CAR+ Т-клетки подвергали воздействию антигена BCMA, связанного с планшетом, в течение 24 часов с повторным воздействием каждые 24 часа и степень апоптоза оценивали после каждого воздействия антигеном посредством проточной цитометрии. Индуцирование апоптоза из-за воздействия антигеном было ниже в Т-клетках с CAR+ к BCMA с КО CD70 по сравнению с таковыми без.

На **фиг. 14** показан график, демонстрирующий сравнение увеличения количества Т-клеток с CAR после воздействия антигеном среди 2X КО (TRAC-/B2M-) CAR+ к BCMA Т-клеток и 3X КО (TRAC-/B2M-/CD70-) CAR+ к BCMA Т-клеток. CAR+ Т-клетки подвергали воздействию антигена BCMA, связанного с планшетом, в течение 24 часов с повторным воздействием каждые 24 часа и увеличение количества клеток оценивали после каждого воздействия антигеном и нормализовали по отношению к популяции в момент времени 0 ч. Увеличение количества популяции после воздействия антигеном была выше в Т-клетках с CAR+ к BCMA с КО CD70 по сравнению с таковыми без.

На **фиг. 15** показан график, демонстрирующий устойчивое увеличение количества клеток среди TRAC-/β2M-/CD70-/CAR к CD70+ Т-клеток. Подсчитывали общее число жизнеспособных клеток среди 3X КО (TRAC-/β2M-/CD70-) и 2X КО (TRAC-/β2M-) Т-клеток с CAR к CD70. 3X КО клетки получали с sgRNA CD70 T7 или T8.

На **фиг. 16** показан график, демонстрирующий устойчивое увеличение количества клеток TRAC-/β2M-/PD-1-/CD70-/CAR к CD70+ Т-клеток. Подсчитывали общее число жизнеспособных клеток среди 4X КО (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-), 3X КО (TRAC-/β2M-/PD1-) и 2X КО (TRAC-/β2M-) Т-клеток с CAR к CD70.

На **фиг. 17** показаны графики, демонстрирующие устойчивое уничтожение клеток как среди клеток Nalm6 (верхняя панель), так и среди клеток Raji (нижняя панель) с помощью Т-клеток с CAR к CD19 (TRAC-/β2M-/CD70-/CAR к CD19+ или TRAC-/β2M-/CAR к CD19+ Т-клеток).

На **фиг. 18** показан график, демонстрирующий устойчивое уничтожение клеток среди клеток MV411 с помощью Т-клеток с CAR к CD33 (TRAC-/β2M-/CD70-/CAR к CD33+ или TRAC-/β2M-/CAR к CD33+ Т-клеток).

На **фиг. 19** показан график, демонстрирующий устойчивое уничтожение клеток среди клеток A498 с помощью 3X КО (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR к CD70+ Т-клеток по сравнению с 2X КО (TRAC-/β2M-) Т-клетками с CAR к CD70+.

На **фиг. 20** показан график, демонстрирующий увеличение количества клеток 3X КО (TRAC-/β2M-/CD70-) или 2X КО (TRAC-/β2M-) CAR к CD33 Т-клеток после воздействия целевых клеток MV411.

На **фиг. 21** показан график, демонстрирующий увеличение количества клеток 3X КО (TRAC-/β2M-/CD70-) или 2X КО (TRAC-/β2M-) CAR к CD70 Т-клеток после воздействия целевых клеток Nalm6.

На **фиг. 22А** показан график, демонстрирующий уничтожение клеток A498 с помощью Т-клеток с CAR к CD70 после серийного повторного воздействия. Использовали 4X KO (TRAC β 2M/CD70/PD1 β), 3X KO (CD70) (TRAC β 2M/CD70 β), 3X KO (PD1) (TRAC β 2M/PD1 β) и 2X KO (TRAC β 2M β) CAR к CD70+ Т-клетки. 3X KO (CD70), CD70 CAR β Т-клетки и 4X KO, CD70 CAR β Т-клетки были наиболее эффективными. На **фиг. 22В** показан график, демонстрирующий уничтожение клеток ACHN с помощью Т-клеток с CAR к CD70 после серийного повторного воздействия. Использовали те же клетки, что и на **фиг. 22А**. 3X KO (CD70), CD70 CAR β Т-клетки и 4X KO, CD70 CAR β Т-клетки были наиболее эффективными.

На **фиг. 23А** показан график, демонстрирующий уничтожение клеток ACHN с помощью Т-клеток с CAR к CD70 при разных отношениях эффектор:цель. Использовали 4X KO (TRAC β 2M/CD70/PD1 β), 3X KO (CD70) (TRAC β 2M/CD70 β), 3X KO (PD1) (TRAC β 2M/PD1 β) и 2X KO (TRAC β 2M β) CAR к CD70+ Т-клетки. 3X KO (CD70), CD70 CAR β Т-клетки и 4X KO, CD70 CAR β Т-клетки были наилучшими в уничтожении после нескольких серийных повторных воздействий. На **фиг. 23В** показан график, демонстрирующий экспрессию LAG3 (слева) и PD1 (справа) в клетках из **фиг. 23А** после восьми повторных воздействий.

На **фиг. 24А-24С** показаны графики, демонстрирующие, что нокаут PD-1 и CD70 усиливает активность уничтожения клеток Т-клетками с CAR к BCMA β , как измерено при серийных повторных воздействиях с линией клеток множественной миеломы (MM.1S). (2X KO (TRAC β 2M β) Т-клетки с CAR β к BCMA (кружочки) с нокаутом по двум генам начинали терять свою эффективность по отношению к клеткам MM.1S после приблизительно 4 повторных воздействий, тогда как (4X KO (TRAC β 2M/CD70/PD1 β) Т-клетки с CAR β к BCMA (квадратики) с нокаутом по четырем генам были способны к 100% уничтожению клеток MM.1S после 10 повторных воздействий (**фиг. 24А**). В соответствии с этим, Т-клетки с CAR β к BCMA с нокаутом по четырем генам продолжали секретировать IFN-g в ответ на целевые клетки после 10 повторных воздействий, тогда как Т-клетки с CAR β к BCMA с нокаутом по двум генам демонстрировали пониженную секрецию IFN-g после третьего повторного воздействия (**фиг. 24В**). Т-клетки с CAR β к BCMA с нокаутом по четырем генам также демонстрировали более высокую степень пролиферации в ответ на воздействие целевых клеток, чем Т-клетки с CAR β к BCMA с нокаутом по двум генам (**фиг. 24С**).

На **фиг. 25А-25С** показаны графики, демонстрирующие наивысшую активность уничтожения клеток среди клеток рака почки A498 PD-L1 (которые сверхэкспрессируют PD-L1) с использованием (4X KO) TRAC β 2M/PD-1/CD70/CAR к CD70 β Т-клеток с нокаутом по четырем генам и (3X KO (CD70)) TRAC β 2M/CD70/CAR к CD70 β Т-клеток с нокаутом по трем генам по сравнению с (2X KO) TRAC β 2M/CAR к CD70 β Т-клетками с нокаутом по двум генам и (3X KO (PD1) TRAC β 2M/PD-1/CAR к CD70 β Т-клетками с нокаутом по трем генам. Соотношение Т-клетка с CAR:клетка A498-PD-L1 2:1 использовали на **фиг. 25А**, соотношение Т-клетка с CAR:клетка A498-PD-L1 1:1

использовали на **фиг. 25B** и соотношение Т-клетка с CAR:клетка A498-PD-L1 0,5:1 использовали на **фиг. 25C**.

На **фиг. 26A** и **фиг. 26B** показаны графики, демонстрирующие, что (4X KO) TRAC β 2M β /PD-1/CD70/CAR к CD70 $^+$ Т-клетки с нокаутом по четырем генам секретируют наивысшие уровни цитокинов IFN-гамма (**фиг. 26A**) и IL-2 (**фиг. 26B**) по сравнению с (3X KO (CD70) TRAC β 2M β /CD70/CAR к CD70 $^+$ Т-клетками с нокаутом по трем генам, (2X KO) TRAC β 2M β /CAR к CD70 $^+$ Т-клетками с нокаутом по двум генам и (3X KO (PD1) TRAC β 2M β /PD-1/CAR к CD70 $^+$ Т-клетками с нокаутом по трем генам. Использовали соотношение Т-клетка с CAR:клетка A498-PD-L1 1:1.

На **фиг. 27A** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценивания снижения объема опухоли на модели клеток A498 почечной карциномы, введенных подкожным путем, подвергавшейся воздействию 2X KO (TRAC β 2M β), CD70 CAR $^+$ Т-клеток; 3X KO (PD-1) (TRAC β 2M β /PD1 β), CD70 CAR $^+$ Т-клеток; 3X KO (CD70) (TRAC β 2M β /CD70 β), CD70 CAR $^+$ Т-клеток или 4X KO (PD-1, CD70) (TRAC β 2M β /PD1/CD70 β), CD70 CAR $^+$ Т-клеток. На **фиг. 27B** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценивания предотвращения роста опухоли на модели повторного воздействия клеток A498 почечной карциномы, введенных подкожным путем. Мышей из **фиг. 27A** подвергали повторному воздействию опухолевых клеток A498 в день 25 и объем опухоли оценивали с течением времени. На **фиг. 27C** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценивания снижения объема опухоли на модели клеток A498 почечной карциномы, введенных подкожным путем (большая опухоль ~150 мм 3 на момент инъекции CAR-T), подвергавшейся воздействию 3X KO (CD70) (TRAC β 2M β /CD70 β), CD70 CAR $^+$ Т-клеток; 4X KO (PD-1, CD70) (TRAC β 2M β /PD1/CD70 β), CD70 CAR $^+$ Т-клеток; 2X KO (TRAC β 2M β), CD70 CAR $^+$ Т-клеток или 3X KO (PD-1) (TRAC β 2M β /PD1 β), CD70 CAR $^+$ Т-клеток.

На **фиг. 28A** показан график, демонстрирующий снижение объема опухоли на модели клеток MM.1S, введенных подкожным путем, подвергавшейся воздействию 2X KO (TRAC β 2M β), BCMA CAR $^+$ Т-клеток; 3X KO (PD-1) (TRAC β 2M β /PD1 β), BCMA CAR $^+$ Т-клеток; 3X KO (CD70) (TRAC β 2M β /CD70 β), BCMA CAR $^+$ Т-клеток или 4X KO (PD-1, CD70) (TRAC β 2M β /PD1/CD70 β), BCMA CAR $^+$ Т-клеток.

На **фиг. 28B** показан график, демонстрирующий снижение объема опухоли на модели клеток MM.1S, введенных подкожным путем, после повторного воздействия опухолевых клеток. Мышей из **фиг. 28A** подвергали повторному воздействию со второй инокуляцией клеток MM.1S в день 45 и объем опухоли оценивали с течением времени.

На **фиг. 29** показаны графики, демонстрирующие число человеческих CD45 $^+$ 2X KO (TRAC β 2M β), BCMA CAR $^+$ Т-клеток; человеческих CD45 $^+$ 3X KO (PD-1) (TRAC β 2M β /PD1 β), BCMA CAR $^+$ Т-клеток; человеческих CD45 $^+$ 3X KO (CD70) (TRAC β 2M β /CD70 β), BCMA CAR $^+$ Т-клеток и человеческих CD45 $^+$ 4X KO (PD-1, CD70) (TRAC β 2M β /PD1/CD70 β), BCMA CAR $^+$ Т-клеток через 1 неделю (правый график), 2 недели (средний график)

КО (PD-1), CD70 CAR+). Использовали соотношение Т-клетка с CAR:клетка A498 0,25:1. Секретию IFN-гамма и IL-2 измеряли через 24 часа после совместного культивирования.

На **фиг. 38** показан график, демонстрирующий, что нокаут CD70 в Т-клетках с CAR к CD70 (3X КО (CD70) (TRAC β 2M/CD70 \cdot), CD70 CAR+; 3X КО (PD-1) (TRAC β 2M/PD1 \cdot), CD70 CAR+ и 4X КО (TRAC β 2M/CD70 \cdot /PD-1 \cdot), CD70 CAR+) снижал уровни экспрессии PD-1 в CD4 \cdot Т-клетках по сравнению с Т-клетками с CAR к CD70, экспрессирующими эндогенный CD70 (2X КО (TRAC β 2M \cdot) CD70 CAR+).

На **фиг. 39А** и **фиг. 39В** показаны графики, демонстрирующие, что нокаут CD70 в Т-клетках с CAR к CD70 (3X КО (CD70) (TRAC β 2M/CD70 \cdot), CD70 CAR+; 3X КО (PD-1) (TRAC β 2M/PD1 \cdot), CD70 CAR+ и 4X КО (TRAC β 2M/CD70 \cdot /PD-1 \cdot), CD70 CAR+) снижал уровни маркера истощения LAG3 в CD8 \cdot Т-клетках (**фиг. 39А**) и CD4 \cdot Т-клетках (**фиг. 39В**) по сравнению с Т-клетками с CAR к CD70, экспрессирующими эндогенный CD70 (2X КО (TRAC β 2M \cdot) CD70 CAR+).

На **фиг. 40А** показаны графики, демонстрирующие относительную экспрессию CD70 у пяти разных линий раковых клеток (левая панель) и относительную экспрессию CD70 у трех разных линий раковых клеток (правая панель). На **фиг. 40В** показаны графики, демонстрирующие относительную экспрессию CD70 у девяти разных линий раковых клеток. На **фиг. 40С-40D** показаны графики, демонстрирующие наивысшую активность уничтожения клеток в отношении клеток рака почки ACHN (ATCC® CRL-1611™) (которые экспрессируют низкие уровни CD70) с использованием TRAC β 2M/PD-1/CD70 \cdot /CAR к CD70 \cdot Т-клеток с нокаутом по четырем генам (4X КО, CD70 CAR+) и TRAC β 2M/CD70 \cdot /CAR к CD70 \cdot Т-клеток с нокаутом по трем генам (3X КО (CD70), CD70 CAR+) по сравнению с TRAC β 2M/CAR к CD70 \cdot Т-клетками с нокаутом по двум генам (2X КО, CD70 CAR+) и TRAC β 2M/PD-1/CAR к CD70 \cdot Т-клетками с нокаутом по трем генам (3X КО (PD-1), CD70 CAR+). Соотношение CAR-Т-клетка:клетка ACHN 0,5:1 использовали на **фиг. 40С** и соотношение Т-клетка с CAR:клетка ACHN 0,25:1 использовали на **фиг. 40D**. На **фиг. 40Е** и **фиг. 40F** показаны графики, демонстрирующие активность уничтожения клеток с использованием TRAC β 2M/PD-1/CD70 \cdot /CAR к CD70 \cdot Т-клеток с нокаутом по четырем генам (**фиг. 40Е**) и TRAC β 2M/CD70 \cdot /CAR к CD70 \cdot Т-клеток с нокаутом по трем генам (**фиг. 40F**) против дополнительных линий клеток солидной опухоли с варьирующими уровнями экспрессии CD70 (отношение эффекторная:целевая клетка 4:1, 1:1 или 0,25:1). На **фиг. 40G** показан график, демонстрирующий активность уничтожения клеток с использованием TRAC β 2M/CD70 \cdot /CAR к CD70 \cdot Т-клеток с нокаутом по трем генам против линий клеток солидной опухоли после 24-часового или 96-часового периода совместного культивирования. На **фиг. 40H-40J** показаны графики, демонстрирующие активность уничтожения клеток с использованием TRAC β 2M/CD70 \cdot /CAR к CD70 \cdot Т-клеток с нокаутом по трем генам (3КО (CD70), CD70 CAR+) против CD70-дефицитных клеток хронического миелогенного лейкоза (K562) (**фиг. 40H**), CD70-экспрессирующих клеток множественной миеломы (MM.1S) (**фиг. 40I**) и CD70-экспрессирующих клеток Т-клеточной лимфомы (HuT78) (**фиг. 40J**) при разных соотношениях эффектор:цель.

На **фиг. 41А** и **фиг. 41В** показаны графики, демонстрирующие, что TRAC β 2M/PD-1/CD70/CAR к CD70⁺ Т-клетки с нокаутом по четырем генам (4X KO, CD70 CAR+) и TRAC β 2M/CD70/CAR к CD70⁺ Т-клетки с нокаутом по трем генам (3X KO (CD70), CD70 CAR+) секретируют наивысшие уровни цитокинов IFN-гамма (**фиг. 41А**) и IL-2 (**фиг. 41В**) по сравнению с TRAC β 2M/CAR к CD70⁺ Т-клетками с нокаутом по двум генам (2X KO, CD70 CAR+) и TRAC β 2M/PD-1/CAR к CD70⁺ Т-клетками с нокаутом по трем генам (3X KO (PD-1), CD70 CAR+). Использовали соотношение Т-клетка с CAR-:клетка ACHN 0,25:1.

На **фиг. 42А** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценивания снижения объема опухоли на модели опухолевого ксенотрансплантата яичника человека (например, опухолевых клеток SKOV-3), подвергавшейся воздействию 3X KO (TRAC β 2M/CD70-) CAR к CD70 Т-клеток. На **фиг. 42В** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценивания снижения объема опухоли на модели ксенотрансплантата мелкоклеточной опухоли легкого человека (например, опухолевых клеток NCI-H1975), подвергавшейся воздействию 3X KO (TRAC β 2M/CD70-) CAR к CD70 Т-клеток. На **фиг. 42С** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценивания снижения объема опухоли на модели опухолевого ксенотрансплантата поджелудочной железы человека (например, опухолевых клеток Hs766T), подвергавшейся воздействию 3X KO (TRAC β 2M/CD70-) CAR к CD70 Т-клеток. На **фиг. 42D** показаны графики, демонстрирующие результаты эксперимента, разработанного для оценивания снижения объема опухоли на модели ксенотрансплантата Т-клеточной лимфомы человека (например, опухолевых клеток HuT78), подвергавшейся воздействию 3X KO (TRAC β 2M/CD70-) CAR к CD70 Т-клеток. Показаны объемы опухоли отдельных мышей (слева) и средние объемы опухоли (справа).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение основывается, по меньшей мере частично, на открытии того, что нарушение последовательности гена CD70 в иммунных клетках, сконструированных для экспрессии нацеливающегося на антиген фрагмента (например, CAR), улучшает несколько характеристик, важных для клеточной иммунотерапии, включая противоопухолевую эффективность. В частности, такие сконструированные иммунные клетки продемонстрировали неожиданные превосходные характеристики, включая увеличенную пролиферацию и устойчивость *in vivo*, что привело к долговременной усиленной противоопухолевой эффективности. Примечательно, что эти неожиданные особенности были продемонстрированы с нацеливающимися фрагментами, специфичными для различных антигенов, в том числе BCMA, CD19, CD33 и CD70.

Как продемонстрировано в данном документе, нарушение последовательности гена CD70 привело к поддержанию цитотоксичности иммунных клеток, сконструированных для экспрессии нацеливающегося на антиген фрагмента после нескольких циклов воздействий раковых клеток *in vitro*. Без ограничения теорией, такое поддержание цитотоксичности указывает на то, что нарушение последовательности гена CD70 делает сконструированные

иммунные клетки устойчивыми к истощению и может привести к более длительной жизни клеток.

Также было обнаружено, что нарушение гена CD70 в иммунных клетках, сконструированных для экспрессии нацеливающегося на антиген фрагмента, усиливает противоопухолевую эффективность против больших опухолей и индуцирует стойкий противораковый вторичный иммунный ответ. В частности, противораковый вторичный иммунный ответ предупреждает рост опухоли при повторном воздействии. Кроме того, было продемонстрировано, что нарушение последовательности гена CD70 приводит к усилению цитотоксичности иммунных клеток, сконструированных для экспрессии нацеливающегося на антиген фрагмента при более низких соотношениях сконструированных иммунных клеток к целевым клеткам, что указывает на потенциальную эффективность низких доз сконструированных иммунных клеток.

Также было показано, что нарушение последовательности гена CD70 усиливает пролиферацию клеток и устойчивость сконструированных иммунных клеток *in vivo*. Без ограничения теорией, считают, что превосходные характеристики сконструированных иммунных клеток, описываемых в данном документе, позволяют обеспечивать более стабильные клеточные популяции, более крупномасштабное получение благодаря способности клеток выживать при более интенсивном делении клеток и меньшем количестве исходных клеток, необходимых для получения сконструированных клеток. Такие характеристики также могут оказаться полезными в клинических условиях. Например, увеличенное размножение и уменьшенное истощения указывают на повышенную эффективность на дозу и возможность получения эффективности при более низких дозах.

Также было продемонстрировано, что нарушение последовательности гена CD70 в иммунных клетках, сконструированных для экспрессии нацеливающегося на антиген фрагмента, сохраняет цитотоксичность в отношении раковых клеток, экспрессирующих молекулы с высокой иммуносупрессивностью, *т. е.* PD-L1. Без ограничения теорией, считают, что внутренний негативный сигнал PD-1, экспрессируемого на иммунных клетках при связывании с PD-L1, экспрессируемым на раковых клетках, преодолевается за счет нарушения последовательности гена CD70.

Следовательно, в данном документе представлены способы и композиции (например, композиции на основе клеток) для лечения рака, такого как BCMA⁺, CD19⁺, CD33⁺ и CD70⁺ злокачественные опухоли, предусматривающие применение сконструированных иммунных клеток с повышенной эффективностью и устойчивостью.

Редактирование гена CD70

Кластер дифференцировки 70 (CD70) является представителем суперсемейства факторов некроза опухоли, и его экспрессия ограничена активированными Т- и В-лимфоцитами и зрелыми дендритными клетками. CD70 участвует в выживаемости опухолевых клеток и регуляторных Т-клеток посредством взаимодействия со своим лигандом CD27. CD70 и его рецептор CD27 играют множество ролей в иммунной функции

в нескольких типах клеток, включая Т-клетки (активированные и Т-регуляторные) и В-клетки. Непонятно, как именно CD70 функционирует во всех этих типах клеток, чтобы контролировать такие функции как апоптоз, при этом публикации указывают на противоречащие роли. Например, сообщалось, что CD70 индуцирует апоптоз или выживание Т-клеток в зависимости от антигенной нагрузки (Wensveen, F., et al. *J. Immunol*, Vol 188: 4256-4267, 2012).

Несмотря на то, что Т-клетки с CAR оказались эффективным иммунотерапевтическим средством, остается ряд проблем. Например, с течением времени Т-клетки с CAR истощаются и становятся неэффективными *in vivo*. Что касается получения, то для получения достаточного количества клеток для введения дозы пациенту требуется значительный период времени. Чтобы устранить эти ограничения в настоящем изобретении предусмотрены Т-клетки с CAR, которые были сконструированы для нарушения экспрессии эндогенного CD70, с экспрессией при этом нацеливающегося на антиген фрагмента (например, scFv).

Неожиданно настоящее изобретение показывает, что нарушение гена CD70 позволяет улучшить здоровое состояние и функцию Т-клеток с CAR (например, увеличенную пролиферацию, пониженное истощение) независимо от антигена, на который нацелен scFv в Т-клетке с CAR. Это применимо даже к антигенам, экспрессируемым на Т-клетках, таким как CD33 и CD70, при этом эффекты нарушенного гена CD70 сохраняют функцию Т-клетки с CAR, даже если можно ожидать взаимное уничтожение. То есть эти клетки с нокаутом по CD70 (например, в которых ген *CD70* был отредактирован с использованием технологии редактирования генов CRISPR/Cas9) независимо от вставки CAR, характеризуются непрерывным устойчивым ростом клеток по сравнению с немодифицированными Т-клетками (или отредактированными Т-клетками, которые экспрессируют CD70) и экспрессируют более низкие уровни маркеров истощения, таких как LAG3. Т-клетки с CAR в соответствии с настоящим изобретением могут включать любое антитело (в том числе полные антитела и фрагменты антител) или другую молекулу (например, рецептор или лиганд), которые специфически связываются с раковым антигеном, чтобы направлять Т-клетку с CAR к раковой клетке. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к CD70 (например, scFv к CD70). В других вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к CD19 (например, scFv к CD19). В еще других вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к BCMA (например, scFv к BCMA). В других вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к CD33 (например, scFv к CD33). Другие раковые антигены охватываются настоящим изобретением.

Следует учитывать, что нарушение последовательности гена охватывает генную модификацию посредством редактирования генов (например, использование редактирования генов с помощью CRISPR/Cas для вставки или удаления одного или нескольких нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген представляет собой ген, который не кодирует функциональный белок. В некоторых

вариантах осуществления клетка, которая содержит нарушенный ген, не экспрессирует (например, на клеточной поверхности) на обнаруживаемом уровне (например, с помощью антитела, например, посредством проточной цитометрии) белок, кодируемый геном. Клетка, которая не экспрессирует белок на обнаруживаемом уровне, может называться нокаутной клеткой. Например, клетка с отредактированным геном *CD70* может считаться клеткой, нокаутной по *CD70*, если белок *CD70* не обнаруживается на клеточной поверхности с использованием антитела, которое специфически связывает белок *CD70*.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены популяции клеток, в которых определенный процент клеток был отредактирован (например, отредактированный ген *CD70*), что привело к отсутствию экспрессии конкретного гена и/или белка определенным процентом клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 85%) клеток в популяции клеток с отредактированным геном являются клетками, нокаутными по *CD70*. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% клеток (например, Т-клеток) популяции не экспрессируют белок *CD70* на обнаруживаемых уровнях. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток в популяции клеток с отредактированным геном могут быть клетками, нокаутными по *CD70*.

В некоторых вариантах осуществления 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок *CD70* на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления процент сконструированных Т-клеток, которые не экспрессируют поверхностный белок *CD70* на обнаруживаемом уровне, повышается с течением времени. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок *CD70* на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок *CD70* на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, или 90%-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок *CD70* на обнаруживаемом уровне.

Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных последовательностей gRNA *CD70*, которые могут быть использованы, как предусмотрено в данном документе, для получения геномного изменения (например, нарушения последовательности, например, делеции, вставки, замены) в гене *CD70*, перечислены в **таблице 5** (например, SEQ ID NO: 23-29 и 33-39). Другие последовательности gRNA могут

быть разработаны с использованием последовательности гена *CD70*, расположенной на хромосоме 19 (координаты GRCh38: хромосома 19: 6,583,183-6,604,103; Ensembl: ENSG00000125726). В определенных вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область *CD70*, обуславливают инсерционно-делеционные мутации (например, вставки, делеции или замены) в гене *CD70* или вокруг него, нарушая экспрессию mRNA и/или белка *CD70*.

В некоторых вариантах осуществления рибонуклеопротеиновую частицу (RNP), содержащую РНК-направляемую нуклеазу (например, нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas9), и gRNA, нацеливающуюся на ген *CD70* (или любой другой ген, представляющий интерес), доставляют в Т-клетки (например, первичные Т-клетки). В других вариантах осуществления РНК-направляемую нуклеазу и gRNA доставляют в Т-клетки отдельно. Рибонуклеопротеиновая частица (RNP) представляет собой простую РНК-направляемую нуклеазу (например, Cas9), предварительно образовавшую комплекс/образовавшую комплекс с (связанную с) gRNA.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, представляет собой синтетически модифицированную gRNA, такую как без ограничения любая из gRNA, содержащих SEQ ID NO: 33-39. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, представляет собой синтетически немодифицированную gRNA, такую как без ограничения любая из gRNA, содержащих SEQ ID NO: 23-29.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область *CD70*, и РНК-направляемая нуклеаза создают двунитевые разрывы в гене *CD70*. Восстановление разрыва приводит к инсерционно-делеционным мутациям в гене *CD70*, при этом последовательность гена *CD70* может содержать нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129-134.

Редактирование нескольких генов

Сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением в некоторых вариантах осуществления включают более чем один нарушенный ген (например, более чем один отредактированный ген), например, в более чем одном гене. Например, сконструированная Т-клетка может содержать нарушенный ген *CD70*, нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*), нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$), нарушенный ген программируемой гибели клеток-1 (*PD-1* или *PDCDI*) или любую комбинацию двух или более из вышеупомянутых нарушенных генов. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген $\beta 2M$ и нарушенный ген *CD70*. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген $\beta 2M$ и нарушенный ген *PD-1*. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген $\beta 2M$, нарушенный ген *CD70* и нарушенный ген *PD-1*.

Редактирование гена *TRAC*

В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген TRAC. Это нарушение приводит к потере функции TCR и делает сконструированную Т-клетку неаллореактивной и пригодной для аллогенной трансплантации, сводя к минимуму риск развития заболевания "хозяин против трансплантата". В некоторых вариантах осуществления экспрессия эндогенного гена TRAC элиминируется для предупреждения реакции "хозяин против трансплантата".

В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена TRAC вызывают путем нокина химерного антигенного рецептора (CAR) в ген TRAC (например, с использованием вектора аденоассоциированного вируса (AAV) и донорной матрицы). В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена *TRAC* вызывают с помощью нуклеазы и gRNA, нацеливающих на геномную область TRAC. В некоторых вариантах осуществления геномную делецию в гене TRAC получают с помощью HDR, где химерный антигенный рецептор (CAR) заменяет сегмент гена TRAC (например, с использованием вектора аденоассоциированного вируса (AAV) и донорной матрицы). В некоторых вариантах осуществления нарушение в экспрессии гена TRAC вызывают с помощью нуклеазы и gRNA, нацеливающих на геномную область TRAC, и нокина химерного антигенного рецептора (CAR) в ген TRAC.

Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных последовательностей gRNA TRAC, которые могут быть использованы, как предусмотрено в данном документе, для получения геномного изменения в гене TRAC, приведены в **таблице 7** (например, SEQ ID NO: 30 и 40). См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 года, включенную в данный документ посредством ссылки. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена TRAC, расположенной на хромосоме 14 (GRCh38: хромосома 14: 22,547,506-22,552,154; Ensembl; ENSG00000277734). В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область TRAC, и РНК-направляемая нуклеаза обуславливают разрывы в геномной области TRAC, что приводит к инсерционно-делеционным мутациям в гене *TRAC*, нарушая экспрессию mRNA или белка.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок Т-клеточного рецептора (TCR) на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, или 90%-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления рибонуклеопротеиновая частица (RNP),

содержащая РНК-направляемую нуклеазу (например, нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas9), и gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC* (или любой другой ген, представляющий интерес), доставляют в Т-клетки (например, первичные Т-клетки). В других вариантах осуществления РНК-направляемую нуклеазу и gRNA доставляют в Т-клетки отдельно. Рибонуклеопротеиновая частица (RNP) представляет собой простую РНК-направляемую нуклеазу (например, Cas9), предварительно образовавшую комплекс/образовавшую комплекс с gRNA.

В некоторых вариантах осуществления gRNA и РНК-направляемая нуклеаза, нацеливающаяся на геномную область *TRAC*, обуславливают инсерционно-делеционные мутации в гене *TRAC*, содержащем нуклеотидную последовательность, выбранную из следующих последовательностей в **таблице 1**.

Таблица 1

Последовательность	SEQ ID NO:
AAGAGCAACAAATCTGACT	1
AAGAGCAACAGTGCTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	2
AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	3
AAGAGCAACAGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	4
AAGAGCAACAGTGCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT	5
AAGAGCAACAGTGCTGTGGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	6
AAGAGCAACAGTGCTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	7
AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	8

В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит делецию в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит делецию, предусматривающую 15-30 пар оснований, в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит делецию, предусматривающую 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 пар оснований, в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит делецию, предусматривающую более чем 30 пар оснований, в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых

вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит делецию, составляющую 20 пар оснований, в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит делецию, предусматривающую SEQ ID NO: 86, в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит делецию, предусматривающую SEQ ID NO: 86, в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит делецию, предусматривающую SEQ ID NO: 118, в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит делецию, предусматривающую SEQ ID NO: 118, в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками.

Редактирование гена $\beta 2M$

В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген $\beta 2M$. $\beta 2M$ является общим (инвариантным) компонентом комплексов МНС I. Нарушение его экспрессии вследствие редактирования генов будет предотвращать реакции "хозяин против терапевтических аллогенных Т-клеток", что приведет к увеличению персистенции аллогенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления экспрессия эндогенного гена $\beta 2M$ элиминируется для предупреждения реакции "хозяин против трансплантата".

Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных последовательностей gRNA $\beta 2M$, которые могут быть использованы, как предусмотрено в данном документе, для получения геномной делеции в гене $\beta 2M$, приведены в **таблице 7** (например, SEQ ID NO: 31 и 41). См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 года, включенную в данный документ посредством ссылки. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена $\beta 2M$, расположенной на хромосоме 15 (координаты GRCh38: хромосома 15: 44,711,477-44,718,877 ; Ensembl: ENSG00000166710).

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область $\beta 2M$, и РНК-направляемая нуклеаза создают разрывы в геномной области $\beta 2M$, что приводит к инсерционно-делеционным мутациям в гене $\beta 2M$, нарушая экспрессию mRNA или белка.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, или 90%-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный

белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления менее чем 50% сконструированных Т-клеток популяции клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления менее чем 30% сконструированных Т-клеток популяции клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. Например, менее чем 50%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10% или менее чем 5% сконструированных Т-клеток популяции клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 40%-30%, 40%-20%, 40%-10%, 40%-5%, 30%-20%, 30%-10%, 30%-5%, 20%-10%, 20%-5% или 10%-5% сконструированных Т-клеток популяции клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления рибонуклеопротеиновую частицу (RNP), содержащую РНК-направляемую нуклеазу (например, нуклеазу Cas нуклеазу, такую как нуклеаза Cas9), и gRNA, нацеливающуюся на ген $B2M$ (или любой другой ген, представляющий интерес), доставляют в Т-клетки (например, первичные Т-клетки). В других вариантах осуществления РНК-направляемую нуклеазу и gRNA доставляют в Т-клетки отдельно. Рибонуклеопротеиновая частица (RNP) представляет собой простую РНК-направляемую нуклеазу (например, Cas9), предварительно образовавшую комплекс/образовавшую комплекс с gRNA.

В некоторых вариантах осуществления отредактированный ген $\beta 2M$ содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из следующих последовательностей в **таблице 2**.

Таблица 2

Последовательности	SEQ ID NO:
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGAGG STATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	9
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGAGGC TATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	10
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGAGGCTAT CCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	11
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGATAGCCT GGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	12
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTAC CCTCCCGCT	13
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGTGGCCTGG AGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	14

Редактирование гена $PD-1$

PD-1 представляет собой молекулу иммунной контрольной точки, экспрессия

которой повышена в активированных Т-клетках, и она служит для ослабления или остановки Т-клеточных ответов. Нарушение PD-1 вследствие редактирования гена может привести к более устойчивым и/или сильным терапевтическим Т-клеточным ответам и/или к снижению иммуносупрессии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген *PD-1*. В некоторых вариантах осуществления экспрессию эндогенного гена *PD-1* элиминируют для усиления противоопухолевой эффективности Т-клеток с CAR в соответствии с настоящим изобретением.

Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных последовательностей gRNA PD-1, которые могут быть использованы, как предусмотрено в данном документе, для получения геномной делеции в гене *PD-1*, приведены в **таблице 5** (например, SEQ ID NO: 32 и 42). См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 года, включенную в данный документ посредством ссылки. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена *PD-1*, расположенной на хромосоме 2 (координаты GRCh38: хромосома 2: 241,849,881-241,858,908; Ensembl: ENSG00000188389).

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область PD-1, и РНК-направляемая нуклеаза создают разрывы в геномной области TRAC, что приводит к инсерционно-делеционным мутациям в гене *PD-1*, нарушая экспрессию mRNA или белка PD-1.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок PD-1 на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок PD-1 на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, или 90%-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок PD-1 на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления рибонуклеопротеиновая частица (RNP), содержащая РНК-направляемую нуклеазу (например, нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas9), и gRNA, нацеливающаяся на ген *PD-1* (или любой другой ген, представляющий интерес), доставляют в Т-клетки (например, первичные Т-клетки). В других вариантах осуществления РНК-направляемую нуклеазу и gRNA доставляют в Т-клетки отдельно. Рибонуклеопротеиновая частица (RNP) представляет собой простую РНК-направляемую нуклеазу (например, Cas9), предварительно образовавшую комплекс/образовавшую комплекс с gRNA.

Клеточные фенотипы

В некоторых вариантах осуществления случаи редактирования одного или

нескольких генов в популяции клеток обуславливают фенотип, связанный с изменениями клеточного пролиферативного потенциала, клеточным истощением, жизнеспособностью клеток, способностью к клеточному лизису (например, увеличением продуцирования и/или высвобождения цитокинов) или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки популяции содержат CAR, который включает эктодомен scFv к CD70. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки популяции содержат CAR, который включает эктодомен scFv к ВСМА. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки популяции содержат CAR, который включает эктодомен scFv к CD19. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки популяции содержат CAR, который включает эктодомен scFv к CD33. Любая из вышеупомянутых сконструированных Т-клеток также может содержать нарушение в одном или нескольких из следующих генов: TRAC, $\beta 2M$, PD-1 и/или CD70 (например, TRAC \cdot / $\beta 2M$ / \cdot CD70 \cdot ; TRAC \cdot / $\beta 2M$ /PD-1 \cdot или TRAC \cdot / $\beta 2M$ /PD-1 \cdot /CD70 \cdot).

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются повышенным клеточным пролиферативным потенциалом по сравнению с контрольными клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются клеточным пролиферативным потенциалом, который на по меньшей мере 20% выше, чем у контрольных Т-клеток. Например, сконструированные Т-клетки (например, TRAC \cdot / $\beta 2M$ / \cdot CD70 \cdot ; TRAC \cdot / $\beta 2M$ /PD-1 \cdot или TRAC \cdot / $\beta 2M$ /PD-1 \cdot /CD70 \cdot ; с или без CAR) могут характеризоваться клеточным пролиферативным потенциалом, который на по меньшей мере 25%, на по меньшей мере 30%, на по меньшей мере 35%, на по меньшей мере 40%, на по меньшей мере 45%, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% выше, чем у контрольных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются клеточным пролиферативным потенциалом, который на 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, или 50%-60% выше, чем у контрольных Т-клеток. Способы измерения клеточной пролиферации известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются пониженным истощением по сравнению с контрольными Т-клетками. Например, сконструированные Т-клетки могут экспрессировать пониженные уровни LAG3 (или других маркеров истощения) по сравнению с контрольными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии LAG3 снижаются на по меньшей мере 20% по сравнению с контрольными Т-клетками. Например, уровни экспрессии LAG3 могут быть снижены на по меньшей мере

25%, на по меньшей мере 30%, на по меньшей мере 35%, на по меньшей мере 40%, на по меньшей мере 45%, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% по сравнению с контрольными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии LAG3 снижаются на 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, или 50%-60% по сравнению с контрольными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления пониженное истощение определяют путем измерения пониженной поверхностной экспрессии маркеров истощения, в том числе TIGIT, PD-1, LAG-3 или их комбинаций. Способы измерения поверхностной экспрессии известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются повышенной клеточной жизнеспособностью по сравнению с контрольными клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются по меньшей мере 20% повышением клеточной жизнеспособности по сравнению с контрольными клетками. Например, сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением могут характеризоваться по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% повышением клеточной жизнеспособности по сравнению с контрольными клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, или 50%-60% повышением клеточной жизнеспособности по сравнению с контрольными клетками. Способы измерения клеточной жизнеспособности известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются повышенной способностью к клеточному лизису по сравнению с контрольными клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются по меньшей мере 20% повышением способности к клеточному лизису (уничтожают на по меньшей мере 20% больше целевых клеток) по сравнению с контрольными клетками. Например, сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением могут характеризоваться по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%,

по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% повышением способности к клеточному лизису по сравнению с контрольными клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, или 50%-60% повышением способности к клеточному лизису по сравнению с контрольными клетками.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются повышенной секрецией цитокина по сравнению с контрольными клетками. Например, в некоторых вариантах осуществления уровень цитокинов (например, IL-2 и/или IFN-гамма), секретируемых сконструированными Т-клетками, по меньшей мере в 2 раза (например, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 5 раз) больше уровня цитокинов, секретируемых контрольными Т-клетками.

Контрольные Т-клетки в некоторых вариантах осуществления представляют собой сконструированные Т-клетки (например, Т-клетки с отредактированными генами), которые экспрессируют эндогенный белок CD70 (CD70, обычно экспрессируемый Т-клетками). В некоторых вариантах осуществления контрольные Т-клетки представляют собой сконструированные Т-клетки, которые экспрессируют эндогенный белок CD70 и содержат ген *TRAC*, нарушенный вследствие вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR (например, CAR к CD70 или CAR к BCMA), нарушенный ген $\beta 2M$, нарушенный ген *PD-1* или любую комбинацию вышеупомянутых нарушенных генов. В некоторых вариантах осуществления контрольные Т-клетки представляют собой неотредактированные Т-клетки.

Неожиданным является то, что Т-клетки с CAR с несколькими отредактированными генами в соответствии с настоящим изобретением (например, клетки с *TRAC*/ $\beta 2M$ /*PD-1*/*CD70*) сохраняют цитотоксичность (способность к уничтожению раковых клеток) после нескольких воздействий (также называемых повторным(-и) воздействием(-ями)) раковыми клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после по меньшей мере 1 повторного воздействия целевой клетки, где целевая клетка экспрессирует антиген, распознаваемый Т-клетками с CAR. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после по меньшей мере 2 повторных воздействий целевой клетки, где целевая клетка экспрессирует антиген, распознаваемый Т-клетками с CAR. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после по меньшей мере 1 повторного воздействия раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после по меньшей мере 2 повторных воздействий раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 повторных воздействий целевой клетки, где целевая клетка экспрессирует антиген, распознаваемый Т-клетками с CAR. В некоторых вариантах осуществления

сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 повторных воздействий целевой клетки, где целевая клетка экспрессирует антиген, распознаваемый Т-клетками с CAR. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 повторных воздействий раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после 10 или более повторных воздействий целевой клетки, где целевая клетка экспрессирует антиген, распознаваемый Т-клетками с CAR. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после 10 или более повторных воздействий раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки экспрессируют CAR, специфический по отношению к CD70, и целевая клетка (например, раковая клетка) экспрессирует CD70. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки экспрессируют CAR, специфический по отношению к CD19, и целевая клетка (например, раковая клетка) экспрессирует CD19. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки экспрессируют CAR, специфический по отношению к CD33, и целевая клетка (например, раковая клетка) экспрессирует CD33. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки экспрессируют CAR, специфический по отношению к ВСМА, и целевая клетка (например, раковая клетка) экспрессирует ВСМА.

Способы редактирования гена

Редактирование генов (включая редактирование генома) представляет собой тип генной инженерии, при котором нуклеотид(-ы)/нуклеиновую(-ые) кислоту(-ы) вставляют, удаляют и/или замещают в последовательности ДНК, например, в геноме целевой клетки. Целевое редактирование гена позволяет осуществлять вставку, делецию и/или замену в предварительно выбранных сайтах в геноме целевой клетки (например, в целевом гене или целевой последовательности ДНК). При редактировании последовательности эндогенного гена, например, путем делеции, вставки или замены нуклеотида(-ов)/нуклеиновой(-ых) кислоты(-от) эндогенный ген, содержащий затронутую последовательность, может быть подвергнут нокауту или нокдауну из-за изменения последовательности. Следовательно, целевое редактирование может использоваться для нарушения экспрессии эндогенных генов. "Целевая интеграция" относится к процессу, предусматривающему вставку одной или нескольких экзогенных последовательностей с или без делеции эндогенной последовательности в сайте вставки. Целевая интеграция может быть результатом целевого редактирования гена, если присутствует донорная матрица, содержащая экзогенную последовательность. Используемый в данном документе термин "нарушенный ген" относится к гену, содержащему вставку, делецию или замену относительно эндогенного гена, так что экспрессия функционального белка из эндогенного гена снижается или подавляется. Используемый в данном документе термин "нарушение гена" относится к способу вставки, делеции или замещения по меньшей мере одного(-ой) нуклеотида/нуклеиновой кислоты в эндогенном гене, так что экспрессия функционального белка из эндогенного гена снижается или подавляется. Способы нарушения гена известны

специалистам в данной области техники и описаны в данном документе.

Целевое редактирование может быть достигнуто либо с помощью независимого от нуклеазы подхода, либо с помощью зависимого от нуклеазы подхода. В подходе независимого от нуклеазы целевого редактирования гомологичная рекомбинация управляется гомологичными последовательностями, фланкирующими экзогенный полинуклеотид, который вводится в эндогенную последовательность посредством ферментативного механизма клетки-хозяина. С помощью экзогенного полинуклеотида можно осуществлять введение делеции, вставки или замены нуклеотидов в эндогенную последовательность.

В качестве альтернативы, зависимый от нуклеазы подход может обеспечить целевое редактирование с более высокой частотой за счет специфического введения двухнитевых разрывов (DSB) с помощью определенных редкощепящих нуклеаз (например, эндонуклеаз). В таком зависимом от нуклеазы целевом редактировании также используются механизмы репарации ДНК, например, негомологичное соединение концов (NHEJ), которое происходит в ответ на DSB. Репарация ДНК с помощью NHEJ часто приводит к случайным вставкам или делециям (инсерционно-делеционным мутациям) небольшого числа эндогенных нуклеотидов. В отличие от опосредованной NHEJ репарации репарация также может представлять собой репарацию, направляемую гомологией (HDR). Если присутствует донорная матрица, содержащая экзогенный генетический материал, фланкированный парой плеч гомологии, экзогенный генетический материал может быть введен в геном с помощью HDR, что приводит к целевой интеграции экзогенного генетического материала.

Доступные эндонуклеазы, способные вводить специфические и нацеленные DSB, включают без ограничения нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), и нуклеазу CRISPR-Cas9, управляемую РНК (CRISPR/Cas9; нуклеаза 9, ассоциированная с кластеризованными регулярно-расположенными короткими палиндромными повторами). Кроме того, для целевой интеграции также может использоваться система DICE (обмен кассетами с помощью двойной интегразы), использующая интегразы ϕ C31 и Vxb1 .

ZFN представляют собой целевые нуклеазы, включающие нуклеазу, слитую с ДНК-связывающим доменом "цинковый палец" (ZFB), представляющим собой полипептидный домен, который связывает ДНК специфическим для последовательности образом через один или несколько "цинковых пальцев". "Цинковый палец" представляет собой домен из приблизительно 30 аминокислот в связывающем домене "цинковый палец", структура которого стабилизируется за счет координации иона цинка. Примеры "цинковых пальцев" включают без ограничения "цинковые пальцы" C2H2, "цинковые пальцы" C3H и "цинковые пальцы" C4. Сконструированный домен "цинковый палец" представляет собой домен, не встречающийся в природе, конструкция/состав которого является главным образом результатом рациональных критериев, например, применения правил замещения и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей

информацию о существующих конструкциях ZFN и данных связывания. См., например, патенты США №№ 6140081, 6453242 и 6534261, см. также WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496. Выбранный домен "цинковый палец" представляет собой домен, не встречающийся в природе, получение которого в основном является результатом эмпирического процесса, такого как фаговый дисплей, интерактивная ловушка или гибридный отбор. ZFN более подробно описаны в патенте США № 7888121 и в патенте США № 7972854. Наиболее известным примером ZFN является результат слияния нуклеазы FokI с ДНК-связывающим доменом "цинковый палец".

TALEN представляет собой целевую нуклеазу, содержащую нуклеазу, слитую с эффекторным ДНК-связывающим доменом TAL. "Подобный активатору транскрипции эффекторный ДНК-связывающий домен", "эффекторный ДНК-связывающий домен TAL" или "ДНК-связывающий домен TALE" представляет собой полипептидный домен эффекторных белков TAL, который отвечает за связывание эффекторного белка TAL с ДНК. Эффекторные белки TAL секретируются растительными патогенами рода *Xanthomonas* во время инфицирования. Эти белки проникают в ядро растительной клетки, связывают специфические в отношении эффектора последовательности ДНК через свой ДНК-связывающий домен и активируют транскрипцию генов на этих последовательностях через их трансактивирующие домены. Специфичность эффекторного ДНК-связывающего домена TAL зависит от вариабельного среди эффекторов количества несовершенных повторов 34 аминокислот, которые содержат полиморфизмы в выбранных положениях повтора, называемые вариабельными последовательностями из двух остатков (RVD). Более подробно TALEN описаны в заявке на патент США № 2011/0145940. Наиболее известным примером TALEN в уровне техники является полипептид, образующийся в результате слияния нуклеазы FokI с эффекторным ДНК-связывающим доменом TAL.

Дополнительные примеры целевых нуклеаз, подходящих для применения, как предусмотрено в данном документе, включают без ограничения Vxb1, phiC31, R4, PhiBT1 и Wβ/SPBc/TP901-1, независимо от того, используются они по отдельности или в комбинации.

Другие неограничивающие примеры целевых нуклеаз включают встречающиеся в природе и рекомбинантные нуклеазы, например, CRISPR/Cas9, рестрикционные эндонуклеазы, мегануклеазы, хоуминг-эндонуклеазы и т. п.

Редактирование гена с помощью CRISPR-Cas9

Система CRISPR-Cas9 представляет собой встречающийся в природе защитный механизм у прокариот, который был переориентирован в управляемую РНК платформу для нацеливания на ДНК, используемую для редактирования гена. Она основана на ДНК-нуклеазе Cas9 и двух некодирующих РНК, crisprRNA (crRNA) и транс-активирующей РНК (tracrRNA), для нацеливания на расщепление ДНК. CRISPR является сокращением от кластеризованных регулярно расположенных коротких палиндромных повторов, семейства последовательностей ДНК, обнаруженных в геномах бактерий и архей, которые содержат фрагменты ДНК (спейсерную ДНК), сходные с чужеродной ДНК, ранее подвергавшейся

воздействию клетки, например, вирусами, которые инфицировали или атаковали прокариоты. Эти фрагменты ДНК используются прокариотами для обнаружения и уничтожения аналогичной чужеродной ДНК при повторном введении, например, из аналогичных вирусов во время последующих атак. Транскрипция локуса CRISPR приводит к образованию молекулы РНК, содержащей спейсерную последовательность, которая связывается с белками Cas (ассоциированные с CRISPR), способными распознавать и разрезать чужеродную экзогенную ДНК, и нацеливается на них. Были описаны многочисленные типы и классы систем CRISPR/Cas (см., например, Koonin et al., (2017) *Curr Opin Microbiol* 37:67-78).

CrRNA управляет распознаванием последовательности и специфичностью комплекса CRISPR-Cas9 посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, как правило, с 20-нуклеотидной (нукл.) последовательностью в целевой ДНК. Изменение последовательности 20 нуклеотидов на 5'-конце в crRNA позволяет нацеливать комплекс CRISPR-Cas9 на конкретные локусы. Комплекс CRISPR-Cas9 связывает только последовательности ДНК, которые содержат последовательность, соответствующую первым 20 нуклеотидам crRNA, одиночной направляющей РНК (sgRNA), если за целевой последовательностью следует определенный короткий мотив ДНК (с последовательностью NGG), называемый мотивом, примыкающим к протоспейсеру (PAM).

TracrRNA гибридизируется с 3'-концом crRNA с образованием структуры РНК-дуплекса, которая связывается эндонуклеазой Cas9 с образованием каталитически активного комплекса CRISPR-Cas9, который затем может расщеплять целевую ДНК.

Как только комплекс CRISPR-Cas9 связывается с ДНК в целевом сайте, каждый из двух независимых нуклеазных доменов в ферменте Cas9 расщепляет одну из нитей ДНК выше сайта PAM, оставляя двухнитевый разрыв (DSB), при этом обе нити ДНК заканчиваются парой оснований (тупым концом).

После связывания комплекса CRISPR-Cas9 с ДНК в определенном целевом сайте и образования сайт-специфического DSB следующим ключевым шагом является репарация DSB. Клетки используют два основных пути репарации ДНК для репарации DSB: негомологичное соединение концов (NHEJ) и направляемая гомологией репарация (HDR).

NHEJ представляет собой надежный механизм репарации, который проявляет высокую активность в большинстве типов клеток, включая неделящиеся клетки. NHEJ подвержен ошибкам и часто может приводить к удалению или добавлению от одного до нескольких сотен нуклеотидов в сайте DSB, хотя такие модификации обычно составляют < 20 нуклеотидов. Полученные в результате вставки и делеции (инсерционно-делеционные мутации) могут нарушать кодирующие или некодирующие области генов. В качестве альтернативы, HDR использует длинный отрезок гомологичной донорной ДНК, представленной эндогенно или экзогенно, для репарации DSB с высокой точностью. HDR активна только в делящихся клетках и происходит с относительно низкой частотой в большинстве типов клеток. Во многих вариантах осуществления настоящего изобретения NHEJ используется в качестве операнта репарации.

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9) происходит из *Streptococcus pyogenes*, хотя могут быть использованы другие гомологи Cas9. Следует учитывать, что могут быть использованы Cas9 дикого типа или могут быть использованы модифицированные версии Cas9 (например, развитые версии Cas9, или ортологи, или варианты Cas9), представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть замещена другой РНК-направляемой эндонуклеазой, такой как Cpf1 (из системы CRISPR/Cas II класса).

В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas содержит компоненты, полученные из системы типа I, типа II или типа III. Обновленные схемы классификации локусов CRISPR/Cas определяют системы CRISPR/Cas 1 класса и 2 класса, имеющие типы от I до V или VI (Makarova et al., (2015) Nat Rev Microbiol, 13(11):722-36; Shmakov et al., (2015) Mol Cell, 60:385-397). Системы CRISPR/Cas 2 класса имеют единичные белковые эффекторы. Белки Cas типов II, V и VI представляют собой однобелковые РНК-направляемые эндонуклеазы, называемые в данном документе "нуклеазами Cas 2 класса". К нуклеазам Cas 2 класса относятся, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 и C2c3. Нуклеаза Cpf1 (Zetsche et al., (2015) Cell 163: 1-13) гомологична Cas9 и содержит RuvC-подобный нуклеазный домен.

В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа II (например, белок Cas9 из системы CRISPR/Cas9). В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas 2 класса (однобелковая нуклеаза Cas, такая как белок Cas9 или белок Cpf1). Семейство белков Cas9 и Cpf1 представляет собой ферменты с ДНК-эндонуклеазной активностью, и они могут быть направлены на расщепление необходимой целевой нуклеиновой кислоты путем получения соответствующей направляющей РНК, как описано дополнительно в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может содержать более чем один нуклеазный домен. Например, нуклеаза Cas9 может содержать по меньшей мере один RuvC-подобный нуклеазный домен (например, Cpf1) и по меньшей мере один HNH-подобный нуклеазный домен (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 вводит DSB в целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 модифицирована для содержания только одного функционального нуклеазного домена. Например, нуклеаза Cas9 модифицирована так, что один из нуклеазных доменов является мутантным или полностью, или частично удален со снижением ее активности расщепления нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 модифицирована с отсутствием функционального RuvC-подобного нуклеазного домена. В других вариантах осуществления нуклеаза Cas9 модифицирована с отсутствием функционального HNH-подобного нуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления, в которых функционален только один из нуклеазных доменов, нуклеаза Cas9 представляет собой нуклеазу, способную вводить односторонний

разрыв ("ник") в целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислота в нуклеазном домене нуклеазы Cas9 замещается для снижения или изменения активности нуклеазы. В некоторых вариантах осуществления никаза нуклеазы Cas содержит аминокислотную замену в RuvC-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе нуклеазы Cas9 *S. pyogenes*). В некоторых вариантах осуществления никаза содержит аминокислотную замену в HNH-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе нуклеазы Cas9 *S. pyogenes*).

В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas является компонентом комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. Например, нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas3. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа IV. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа V. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа VI.

Направляющие РНК

В настоящем изобретении предусмотрена нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, которая может направлять формы активности ассоциированного с ней полипептида (например, сайт-направленного полипептида) на конкретную целевую последовательность в целевой нуклеиновой кислоте. Нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, может представлять собой РНК. РНК, нацеливающаяся на геном, в данном документе называется "направляющей РНК" или "gRNA". Направляющая РНК содержит по меньшей мере спейсерную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, и последовательность повтора CRISPR. В системах типа II gRNA также содержит вторую РНК, называемую последовательностью tracrRNA. В gRNA типа II последовательность повтора CRISPR и последовательность tracrRNA гибридизируются друг с другом с образованием дуплекса. В gRNA типа V crRNA образует дуплекс. В обеих системах дуплекс связывает сайт-направленный полипептид таким образом, что направляющая РНК и сайт-направленный полипептид образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, обеспечивает специфичность комплекса к мишени благодаря его ассоциации с сайт-направленным полипептидом. Таким образом, нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, направляет активность сайт-направленного полипептида.

Как понятно специалисту в данной области техники, каждая направляющая РНК сконструирована таким образом, что она содержит спейсерную последовательность, которая комплементарна ее геномной целевой последовательности. См. Jinek *et al.*, *Science*, 337, 816-821 (2012) и Deltcheva *et al.*, *Nature*, 471, 602-607 (2011).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на

геном (например, gRNA), представляет собой направляющую РНК, состоящую из двух молекул. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном (например, gRNA), представляет собой направляющую РНК, состоящую из одной молекулы.

Направляющая РНК, состоящая из двух молекул, содержит две нити РНК. Первая нить содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность и минимальную последовательность повтора CRISPR. Вторая нить содержит минимальную последовательность tracrRNA (комплементарную минимальной последовательности повтора CRISPR), 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA.

Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (называемая "sgRNA"), в системе типа II содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность, минимальную последовательность повтора CRISPR, линкер направляющей молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, минимальную последовательность tracrRNA, 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, может содержать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительные функциональные свойства (например, стабильность). Линкер направляющей нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, связывает минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность tracrRNA с образованием шпильчатой структуры. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, содержит одну или несколько шпилек.

Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы, в системе типа V содержит в направлении 5'-3' минимальную последовательность повтора CRISPR и спейсерную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность из 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность из менее чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность из более чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность переменной длины с 17-30 нуклеотидами на 5'-конце последовательности sgRNA (см. **таблицу 3**).

В некоторых вариантах осуществления sgRNA не содержит урацил на 3'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит один или несколько остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA. Например, sgRNA может содержать 1 остаток урацила (U) на 3'-конце последовательности sgRNA. SgRNA может содержать 2 остатка урацила (UU) на 3'-конце последовательности sgRNA. SgRNA может содержать 3 остатка урацила (UUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. SgRNA

В некоторых вариантах осуществления нарушение гена может происходить путем делеции геномной последовательности с использованием двух направляющих РНК. Известны способы использования технологии редактирования гена CRISPR-Cas для получения геномной делеции в клетке (например, для нокаута гена в клетке) (Bauer DE *et al. Vis. Exp.* 2015;95;e52118).

Спейсерная последовательность

В некоторых вариантах осуществления gRNA содержит спейсерную последовательность. Спейсерная последовательность представляет собой последовательность (например, последовательность из 20 нуклеотидов), которая определяет целевую последовательность (например, последовательности ДНК-мишени, такие как геномная целевая последовательность) целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит 15-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит 20 нуклеотидов.

"Целевая последовательность" прилегает к последовательности PAM и представляет собой последовательность, модифицируемую РНК-направляемой нуклеазой (например, Cas9). "Целевая нуклеиновая кислота" представляет собой двухнитевую молекулу: одна нить содержит целевую последовательность и называется "нитью, содержащей PAM", а другая комплементарная нить называется "нитью, не содержащей PAM". Специалист в данной области техники поймет, что спейсерная последовательность gRNA гибридизируется с последовательностью, обратной комплементарной целевой последовательности, которая расположена в нити, не содержащей PAM, целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Таким образом, спейсерная последовательность gRNA представляет собой РНК-эквивалент целевой последовательности. Например, если целевая последовательность представляет собой 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 86), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 98). Спейсер gRNA взаимодействует с целевой нуклеиновой кислотой, представляющей интерес, специфичным в отношении последовательности образом посредством гибридизации (т. е. спаривания оснований). Таким образом, нуклеотидная последовательность спейсера варьируется в зависимости от целевой последовательности целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес.

В системе CRISPR/Cas, описанной в данном документе, спейсерная последовательность предназначена для гибридизации с участком целевой нуклеиновой кислоты, который расположен в 5'-направлении от PAM для фермента Cas9, используемого в системе. Спейсер может полностью соответствовать целевой последовательности или может иметь несоответствия. Для каждого фермента Cas9 имеется конкретная последовательность PAM, которую он распознает в целевой ДНК. Например, *S. pyogenes*

распознает в целевой нуклеиновой кислоте PAM, который содержит последовательность 5'-NRG-3', где R представляет собой A либо G, где N представляет собой любой нуклеотид, и при этом N находится непосредственно рядом с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацеливается спейсерная последовательность, в 3'-направлении от нее.

В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит менее чем 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит более чем 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20 оснований непосредственно рядом с первым нуклеотидом PAM в 5'-направлении от него. Например, в последовательности, содержащей 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3', целевая нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая соответствует множеству N, где N представляет собой любой нуклеотид, а подчеркнутая последовательность NRG представляет собой PAM *S. pyogenes*.

Неограничивающие примеры gRNA, которые могут быть использованы, как представлено в данном документе, представлены в PCT/IB2018/001619, поданной 11 мая 2018 года, включенной в данный документ посредством ссылки.

Способы получения gRNA

gRNA в соответствии с настоящим изобретением получают с помощью подходящих средств, доступных в данной области, в том числе без ограничения способов транскрипции *in vitro* (IVT), синтеза и/или химического синтеза или их комбинации. Используют способы ферментативного (IVT), твердофазного, жидкофазного, комбинированного синтеза, синтеза небольших участков и способы лигирования. В одном варианте осуществления gRNA получают с использованием способов ферментативного синтеза IVT. Способы получения полинуклеотидов с помощью IVT известны из уровня техники и описаны в международной заявке PCT/US2013/30062. Соответственно, настоящее изобретение также включает полинуклеотиды, например, ДНК, конструкции и векторы, используемые для *in vitro* транскрибирования gRNA, описываемой в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления неприродные модифицированные нуклеотидные основания вводят в полинуклеотиды, например, gRNA, в ходе синтеза или после синтеза. В определенных вариантах осуществления модификации относятся к межнуклеозидным связям, пуриновым или пиримидиновым основаниям или сахару. В некоторых вариантах осуществления модификацию вводят на конце полинуклеотида с помощью химического синтеза или фермента полимеразы. Примеры модифицированных нуклеиновых кислот и их синтез раскрыты в PCT заявке № PCT/US2012/058519. Синтез

модифицированных полинуклеотидов также описан в Verma and Eckstein, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 76, 99-134 (1998).

В некоторых вариантах осуществления способы ферментативного или химического лигирования используют для конъюгирования полинуклеотидов или их областей с различными функциональными фрагментами, такими как нацеливающие средства или средства доставки, флуоресцентные метки, жидкости, наночастицы и т. д. Конъюгаты полинуклеотидов и модифицированных полинуклеотидов рассматриваются в Goodchild, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 1(3), 165-187 (1990).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения также представлены нуклеиновые кислоты, например, векторы, кодирующие gRNA, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую crRNA. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая crRNA, содержит спейсер, фланкированный всей или частью последовательности повтора из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую tracrRNA. В некоторых вариантах осуществления crRNA и tracrRNA кодируются двумя отдельными нуклеиновыми кислотами. В других вариантах осуществления crRNA и tracrRNA кодируются одной нуклеиновой кислотой. В других вариантах осуществления crRNA и tracrRNA кодируются противоположными нитями одной нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления crRNA и tracrRNA кодируются одной и той же нитью одной нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, представленные в настоящем изобретении, химически синтезируют любыми средствами, описанными в уровне техники (см. например, WO/2005/01248). Несмотря на то, что возможности процедур химического синтеза постоянно расширяются, очистка таких РНК с помощью таких процедур, как высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC, при которой не используются гели, такие как в PAGE), как правило, становится более сложной, поскольку длина полинуклеотидов значительно увеличивается, выходя за пределы примерно сотни нуклеотидов. Один из подходов, используемых для образования РНК большей длины, заключается в получении двух или более молекул, которые лигируются друг с другом.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, представленные в настоящем изобретении, синтезируют ферментативными способами (например, транскрипцией *in vitro*, IVT).

Различные типы модификаций РНК могут быть введены во время или после химического синтеза и/или ферментативного образования РНК, например, модификации, которые повышают стабильность, уменьшают вероятность или степень формирования врожденного иммунного ответа и/или усиливают другие признаки, как описано в уровне

техники.

В определенных вариантах осуществления более чем одна направляющая РНК может быть использована с нуклеазной системой CRISPR/Cas. Каждая направляющая РНК может содержать отличающуюся нацеливающуюся последовательность, так что система CRISPR/Cas расщепляет более чем одну целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько направляющих РНК могут обладать одинаковыми или различающимися свойствами, такими как активность или стабильность в комплексе Cas9 RNP. При использовании более чем одной направляющей РНК направляющая РНК может быть кодирована на одном и том же или на разных векторах. Промоторы, используемые для управления экспрессией более чем одной направляющей РНК, являются одинаковыми или разными.

Направляющая РНК может нацеливаться на любую представляющую интерес последовательность посредством нацеливающейся последовательности (например, спейсерной последовательности) crRNA. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между нацеливающейся последовательностью направляющей РНК и целевой последовательностью в целевой молекуле нуклеиновой кислоты составляет приблизительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в целевой молекуле нуклеиновой кислоты являются на 100% комплементарными. В других вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в целевой молекуле нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере одно несоответствие. Например, нацеливающаяся последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в целевой молекуле нуклеиновой кислоты может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 несоответствий. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в целевой молекуле нуклеиновой кислоты может содержать 1-6 несоответствий. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в целевой молекуле нуклеиновой кислоты может содержать 5 или 6 несоответствий.

Длина нацеливающейся последовательности может зависеть от используемых системы CRISPR/Cas9 и компонентов. Например, разные белки Cas9 из разных видов бактерий имеют варьирующие оптимальные длины нацеливающейся последовательности. Следовательно, нацеливающаяся последовательность может иметь длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или более чем 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность может иметь длину 18-24 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность может иметь длину 19-21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность может иметь длину 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением нуклеазная система CRISPR/Cas включает по меньшей мере одну направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК и белок Cas могут образовывать рибонуклеопротеин (RNP), например, комплекс CRISPR/Cas. Направляющая РНК может направлять белок Cas на целевую последовательность в целевой молекуле нуклеиновой кислоты (например, молекуле геномной ДНК), где белок Cas расщепляет целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas представляет собой комплекс Cpf1/направляющая РНК. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR представляет собой комплекс CRISPR/Cas9 типа II. В некоторых вариантах осуществления белок Cas представляет собой белок Cas9. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas9 представляет собой комплекс Cas9/направляющая РНК.

Доставка направляющей РНК и нуклеазы

В некоторых вариантах осуществления gRNA и РНК-направляемую нуклеазу доставляют в клетку отдельно, либо одновременно, либо последовательно. В некоторых вариантах осуществления gRNA и РНК-направляемую нуклеазу доставляют в клетку вместе. В некоторых вариантах осуществления предварительно образуют комплекс gRNA и РНК-направляемой нуклеазы для образования рибонуклеопротеина (RNP).

RNP применимы для редактирования гена по меньшей мере потому, что они минимизируют риск беспорядочных взаимодействий в богатой нуклеиновыми кислотами клеточной среде и защищают РНК от разрушения. Способы формирования RNP известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления RNP, содержащий РНК-направляемую нуклеазу (например, нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas9) и gRNA, нацеливающуюся на ген, представляющий интерес, доставляют в клетку (например, Т-клетку). В некоторых вариантах осуществления RNP доставляют в Т-клетку путем электропорации.

Как и используется в данном документе, "нацеливающийся на *TRAC* RNP" относится к gRNA, которая нацеливается на ген *TRAC*, предварительно образовавшей комплекс с РНК-направляемой нуклеазой. Как и используется в данном документе, "нацеливающийся на *β2M* RNP" относится к gRNA, которая нацеливается на ген *β2M*, предварительно образовавшей комплекс с РНК-направляемой нуклеазой. Как и используется в данном документе, "нацеливающийся на *CD70* RNP" относится к gRNA, которая нацеливается на ген *CD70*, предварительно образовавшей комплекс с РНК-направляемой нуклеазой. Как и используется в данном документе, "нацеливающийся на *PD-1* RNP" относится к gRNA, которая нацеливается на ген *PD-1*, предварительно образовавшей комплекс с РНК-направляемой нуклеазой.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся на *TRAC* RNP доставляют в клетку. В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся на *β2M* RNP доставляют в клетку. В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся на *CD70* RNP доставляют в клетку. В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся на *PD-1* RNP доставляют в клетку.

доставляют в клетку.

В некоторых вариантах осуществления более чем один RNP доставляют в клетку. В некоторых вариантах осуществления более чем один RNP доставляют в клетку отдельно. В некоторых вариантах осуществления более чем один RNP доставляют в клетку одновременно. В некоторых вариантах осуществления в клетку доставляют по меньшей мере один из следующих RNP:

- (i) нацеливающийся на *TRAC* RNP;
- (ii) нацеливающийся на $\beta 2M$ RNP;
- (iii) нацеливающийся на *CD70* RNP или
- (iv) нацеливающийся на *PD-1* RNP. В некоторых вариантах осуществления в клетку

доставляют по меньшей мере два из следующих RNP:

- (i) нацеливающийся на *TRAC* RNP;
- (ii) нацеливающийся на $\beta 2M$ RNP;
- (iii) нацеливающийся на *CD70* RNP или
- (iv) нацеливающийся на *PD-1* RNP.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемую нуклеазу доставляют в клетку в ДНК-векторе, который экспрессирует РНК-направляемую нуклеазу, РНК, которая кодирует РНК-направляемую нуклеазу, или белок. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающуюся на ген, доставляют в клетку в виде РНК- или ДНК-вектора, который экспрессирует gRNA.

Доставка РНК-направляемой нуклеазы, gRNA и/или RNP может быть осуществлена путем непосредственной инъекции или клеточной трансфекции с использованием известных способов, например, электропорации или химической трансфекции. Могут быть использованы другие способы клеточной трансфекции.

Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR)

Химерный антигенный рецептор относится к искусственному рецептору иммунных клеток, который сконструирован для распознавания и связывания антигена, экспрессируемого опухолевыми клетками. Обычно CAR разрабатывается для Т-клетки, и он представляет собой химеру из сигнального домена комплекса Т-клеточного рецептора (TcR) и антигенраспознающего домена (например, одноцепочечного фрагмента (scFv) антитела или другого фрагмента антитела) (Enblad et al., Human Gene Therapy. 2015; 26(8):498-505). Т клетка, которая экспрессирует CAR, называется Т-клеткой с CAR. CAR обладают способностью перенаправлять специфичность и реактивность Т-клеток в направлении выбранной мишени без рестриктирования по МНС. Распознавание антигена без рестриктирования по МНС придает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген без зависимости от процессинга антигена, тем самым обходя основной механизм ускользания опухоли. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR). CAR зачастую называют по антигену, который они связывают. Например, "CAR для CD19", "CAR для CD70", "CAR для CD33" и "CAR для BCMA" представляют

собой CAR, содержащие антигенсвязывающие домены, которые специфически связываются с CD19, CD70, CD33 или BCMA соответственно. Следовательно, такие термины являются взаимозаменяемыми с CAR к CD19, CAR к CD70, CAR к CD33 и CAR к BCMA. Специалисту в данной области техники будет понятно, что для CAR, который специфически связывает антиген, можно использовать любую терминологию из указанных.

Существует четыре поколения CAR, каждое из которых содержит различные компоненты. В CAR первого поколения соединены scFv, полученный из антитела, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (ζ или z) T-клеточного рецептора через шарнирный и трансмембранный домены. В CAR второго поколения включен дополнительный домен, например, CD28, 4-1BB (41BB) или ICOS, для обеспечения костимулирующего сигнала. В CAR третьего поколения содержатся два костимулирующих домена, слитых с цепью CD3- ζ TCR. Костимулирующие домены в молекулах третьего поколения могут включать, например, комбинацию CD3 ζ , CD27, CD28, 4-1BB, ICOS или OX40. В некоторых вариантах осуществления CAR содержат эктодомен, обычно полученный из одноцепочечного фрагмента из переменных доменов (scFv), шарнирный участок, трансмембранный домен и эндодомен с одним (первое поколение), двумя (второе поколение) или тремя (третье поколение) сигнальными доменами, происходящими из CD3Z и/или костимулирующих молекул (Maude et al., *Blood*. 2015; 125(26):4017-4023; Kakarla and Gottschalk, *Cancer J*. 2014; 20(2):151-155).

Как правило, CAR отличаются по своим функциональным свойствам. Сигнальный домен CD3 ζ T-клеточного рецептора, когда он задействован, будет активировать и индуцировать пролиферацию T-клеток, но может приводить к анергии (отсутствие реакции со стороны защитных механизмов организма, что приводит к прямой индукции толерантности периферических лимфоцитов). Лимфоциты считаются анергическими, когда они не отвечают на специфический антиген. Добавление костимулирующего домена в CAR второго поколения улучшило его репликативную способность и персистенцию модифицированных T-клеток. Аналогичные противоопухолевые эффекты наблюдаются *in vitro* в случае CAR с CD28 или 4-1BB, но доклинические *in vivo* исследования позволяют предположить, что CAR с 4-1BB могут обуславливать превосходную пролиферацию и/или персистенцию. Клинические испытания позволяют предположить, что оба этих CAR второго поколения способны индуцировать значительную пролиферацию T-клеток *in vivo*, но CAR, содержащие костимулирующий домен 4-1BB, по-видимому, персистируют дольше. В CAR третьего поколения объединено несколько сигнальных (костимулирующих) доменов для усиления эффективности.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор представляет собой CAR первого поколения. В других вариантах осуществления химерный антигенный рецептор представляет собой CAR второго поколения. В еще одних вариантах осуществления химерный антигенный рецептор представляет собой CAR третьего поколения.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный (экто) домен,

содержащий антигенсвязывающий домен (например, антитело, такое как scFv), трансмембранный домен и цитоплазматический (эндо) домен.

Эктодомен

Эктодомен представляет собой участок CAR, который подвергается воздействию внеклеточной жидкости, и в некоторых вариантах осуществления он включает антигенсвязывающий домен и необязательно сигнальный пептид, спейсерный домен и/или шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который включает VL и VH иммуноглобулинов, соединенные коротким линкерным пептидом. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидрофильные остатки с фрагментами из глицина и серина для гибкости, а также фрагментами из глутамата и лизина для дополнительной растворимости. Одноцепочечный фрагмент из варибельных доменов (scFv) в действительности не является фрагментом антитела, а представляет собой слитый белок из варибельных областей тяжелой (VH) и легкой цепей (VL) иммуноглобулинов, соединенных коротким линкерным пептидом длиной от десяти до примерно 25 аминокислот. Обычно линкер богат глицином для придания гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости и может соединять либо N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. В некоторых вариантах осуществления scFv по настоящему изобретению является гуманизированным. В других вариантах осуществления scFv является полностью человеческим. В других вариантах осуществления scFv представляет собой химеру (например, из мышиной и человеческой последовательности).

В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой scFv к CD70 (специфически связывается с CD70). Неограничивающие примеры белков scFv к CD70, которые могут быть использованы, как представлено в данном документе, могут включать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой scFv к BCMA (специфически связывается с BCMA). Неограничивающие примеры белков scFv к BCMA, которые могут быть использованы, как представлено в данном документе, могут включать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой scFv к CD19 (специфически связывается с CD19). Неограничивающие примеры белков scFv к CD19, которые могут быть использованы, как представлено в данном документе, могут включать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151.

В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой scFv к CD33 (специфически связывается с CD33). Неограничивающие примеры белков scFv к CD33, которые могут быть использованы, как представлено в данном документе, могут включать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 137.

Могут быть использованы другие белки scFv.

Сигнальный пептид может усиливать антигенную специфичность связывания CAR. Сигнальные пептиды могут быть получены из антител, таких как без ограничения CD8, а также эпитопных меток, таких как без ограничения GST или FLAG. Примеры сигнальных пептидов включают MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO: 88) и MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 89). Могут быть использованы другие сигнальные пептиды.

В некоторых вариантах осуществления спейсерный домен или шарнирный домен расположены между внеклеточным доменом (содержащим антигенсвязывающий домен) и трансмембранным доменом CAR или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом CAR. Спейсерный домен представляет собой любой олигопептид или полипептид, функции которого заключаются в связывании трансмембранного домена с внеклеточным доменом и/или цитоплазматическим доменом в полипептидной цепи. Шарнирный домен представляет собой любой олигопептид или полипептид, функции которого заключаются в обеспечении гибкости CAR или его доменов или в предупреждении стерических затруднений у CAR или его доменов. В некоторых вариантах осуществления спейсерный домен или шарнирный домен могут содержать не более 300 аминокислот (например, от 10 до 100 аминокислот или от 5 до 20 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления один или несколько спейсерных доменов могут быть включены в другие участки CAR. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой шарнирный домен CD8. Могут применяться другие шарнирные домены.

Трансмембранный домен

Трансмембранный домен представляет собой гидрофобную альфа-спираль, которая пронизывает мембрану. Трансмембранный домен обеспечивает стабильность CAR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR, представленный в данном документе, представляет собой трансмембранный домен CD8. В других вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28. В еще одних вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой химеру из трансмембранного домена CD8 и CD28. Могут применяться другие трансмембранные домены, представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8a

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR (SEQ ID NO: 90).

Могут применяться другие трансмембранные домены.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8a, содержащий аминокислотную последовательность IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO: 126).

Эндодомен

Эндодомен представляет собой функциональный конец рецептора. После распознавания антигена рецепторы образуют кластер и сигнал передается в клетку.

Наиболее часто используемым компонентом эндодомена является CD3-дзета, который содержит три (3) иммунорецепторных мотива активации на основе тирозина (ITAM). Он передает сигнал активации Т-клетке после связывания антигена. Во многих случаях CD3-дзета не может обеспечить полностью компетентный сигнал активации и, таким образом, применяется костимулирующая передача сигнала. Например, для передачи пролиферативного сигнала/сигнала выживания с CD3-дзета (CD3 ζ) можно применять CD28 и/или 4-1BB. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула CAR, представленного в данном документе, представляет собой костимулирующую молекулу CD28. В других вариантах осуществления костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления CAR включает CD3 ζ и CD28. В других вариантах осуществления CAR включает CD3-дзета и 4-1BB. В других вариантах осуществления CAR включает CD3 ζ , CD28 и 4-1BB. В **таблице 4** представлены примеры сигнальных доменов, полученных из 4-1BB, CD28 и CD3-дзета, которые могут быть использованы в данном документе.

Таблица 4

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAAC AACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAA GGAGGATGTGAACTG	18
	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL	19
CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAA TATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATT ACCAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTAC AGGTCC	121
	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR S	20
CD3-дзета	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATA TCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAAT TTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAAC GCCGGGGGAGAGACCCGAAATGGGGGGTAAACCCCG AAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTC CAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAG GTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGA TGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGAT	21

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
	ACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAG A	
	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	22

Раковые антигены

CD70

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с химерным антигенным рецептором (CAR), разработанным для нацеливания на CD70. CD70 сначала идентифицировали как лиганд для CD27, костимулирующий рецептор, вовлеченный в пролиферацию и выживание Т-клеток. CD70 обнаруживается только на небольшом проценте активированных Т-клеток и антигенпрезентирующих клеток в дренирующих лимфатических узлах во время вирусной инфекции. Многие опухоли человека также экспрессируют CD70, включающие без ограничения солидный рак, такой как светлоклеточный рак почки, рак молочной железы, рак желудка, рак яичника, глиобластома и гематологические злокачественные опухоли. Из-за ограниченного паттерна экспрессии в нормальных тканях и сверхэкспрессии при многих раковых заболеваниях CD70 является привлекательной терапевтической мишенью.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют для экспрессии CAR, содержащего антитело к CD70 (например, scFv к CD70). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, кодируемый последовательностью под SEQ ID NO: 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий VH, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий VL, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD70, кодируется последовательностью под SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD70, содержит последовательность под SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, кодируемый нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%

или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD70, кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD70, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 46.

BCMA

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с CAR, разработанным для нацеливания на BCMA. Антиген созревания В-клеток (BCMA, CD269) является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF). BCMA связывает активирующий В-клетки фактор (BAFF) и индуцирующий пролиферацию лиганд (APRIL). Среди незлокачественных клеток BCMA экспрессируется в основном плазматическими клетками и подгруппами зрелых В-клеток. BCMA селективно экспрессируется линией В-клеток, включая клетки множественной миеломы и неходжкинской лимфомы, поэтому BCMA также является привлекательной терапевтической мишенью.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют для экспрессии CAR, содержащего антитело к BCMA (например, scFv к BCMA). В некоторых вариантах осуществления антитело к BCMA представляет собой scFv к BCMA, кодируемый последовательностью под SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления антитело к BCMA представляет собой scFv к BCMA, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления антитело к BCMA представляет собой scFv к BCMA, содержащий VH, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления антитело к BCMA представляет собой scFv к BCMA, содержащий VL, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления CAR, включающий антитело к BCMA, кодируется последовательностью под SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащей антитело к BCMA, содержит последовательность под SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления антитело к BCMA представляет собой scFv

к ВСМА, кодируемый нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к ВСМА, кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к ВСМА, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 57.

CD19

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с CAR, разработанным для нацеливания на CD19. Кластер дифференцировки 19 (CD19) представляет собой антигенную детерминанту, обнаруживаемую на лейкозных клетках-предшественниках. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот человека и мыши можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотная последовательность CD19 человека может быть найдена под номером доступа в UniProt/Swiss-Prot P15391, а нуклеотидная последовательность, кодирующая CD19 человека, может быть найдена под номером доступа NM-001178098. CD19 экспрессируется на клетках линии В-клеток при большинстве видов рака, включая, например, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и неходжкинскую лимфому. Он также является ранним маркером предшественников В-клеток. См., например, Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют для экспрессии CAR, содержащего антитело к CD19 (например, scFv к CD19). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, кодируемый последовательностью под SEQ ID NO: 150.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 151. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий VH, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 152. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий VL, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 153. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD19, кодируется последовательностью под SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD19, содержит последовательность под SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, кодируемый нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 150. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 151. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 152. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 153. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD19, кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD19, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 149.

CD33

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с CAR, разработанным для нацеливания на CD33. CD33, также известный как Siglec3, представляет собой трансмембранный рецептор, экспрессируемый на клетках миелоидного происхождения, который, как известно, связывает сиаловые кислоты. Поскольку CD33 экспрессируется в раковых клетках (например, при остром миелоидном лейкозе), считается, что CD33 представляет собой маркер клеточной поверхности для нацеливания на эти злокачественные опухоли.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют для экспрессии CAR, содержащего антитело к CD33 (например, scFv к CD33). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, кодируемый последовательностью под SEQ ID NO: 138. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD19, содержащий VH, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий VL, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD33, кодируется последовательностью под SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD33, содержит последовательность под SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, кодируемый нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 138. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD19, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD33, кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD33, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 139.

Антитела

Антитело (взаимозаменяемо используется в форме множественного числа) представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную к специфическому связыванию с целью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т. д., по

меньшей мере через один сайт распознавания антигена, расположенный в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин "антитело" охватывает не только интактные (т. е. полноразмерные) моноклональные антитела, но также антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), их мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, диатела, линейные антитела, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела (например, антитела с V_HH верблюда или ламы), мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена с необходимой специфичностью, в том числе варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотных последовательностей антител и ковалентно модифицированные антитела.

Типичная молекула антитела включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), которые обычно участвуют в связывании антигена. Эти области/остатки, которые отвечают за связывание антигена, могут быть идентифицированы по аминокислотным последовательностям последовательностей VH/VL эталонного антитела (например, антитела к CD70 или антитела к BCMA, как описано в данном документе) с помощью способов, известных из уровня техники. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, также известные как "определяющие комплементарность области" ("CDR"), перемежающиеся с более консервативными областями, которые известны как "каркасные области" ("FR"). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Протяженность каркасной области и CDR может быть точно идентифицирована с использованием метода, известного из уровня техники, например, по определению Кабата, по определению Chothia, по определению AbM и/или по контактному определению, все из которых хорошо известны из уровня техники. Как и используется в данном документе, CDR может относиться к CDR, определяемой любым способом, известным из уровня техники. Два антитела, имеющие одинаковые CDR, означают, что эти два антитела имеют одинаковую аминокислотную последовательность этой CDR, как определено одним и тем же способом. См., например, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Chothia et al., (1989) *Nature* 342:877; Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948; и Almagro, J. *Mol. Recognit.* 17:132-143 (2004). См. также hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv, такой как scFv к CD70, scFv к BCMA, scFv к CD19 или scFv к CD33. Антитело включает антитело любого класса, такого как IgD, IgE, IgG, IgA или IgM (или их подкласса), и антитело не должно относиться к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена его тяжелых цепей антитела иммуноглобулины

можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Антитела, подлежащие применению, как представлено в данном документе, могут быть мышинового, крысиного, человеческого или любого другого происхождения (в том числе химерные или гуманизированные антитела). В некоторых примерах антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, которая является иммунологически инертной, например, не запускает опосредованный комплементом лизис или не стимулирует зависимость от антитела цитотоксичность (ADCC).

В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой гуманизированное антитело. Гуманизированные антитела относятся к формам отличным от человеческих (например, мышинных) антител, которые представляют собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулина или его антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из отличного от человеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентные антитела), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента, заменены остатками из CDR отличных от человеческих видов (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, обладающими необходимыми специфичностью, аффинностью и потенциалом. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяются соответствующими отличными от человеческих остатками. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которых нет ни в реципиентном антителе, ни во вставленных последовательностях CDR или каркасной области, но которые включены для дальнейшего улучшения и оптимизации характеристик антитела. В общем, гуманизированное антитело будет включать по сути все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по сути все области CDR соответствуют таковым отличного от человеческого иммуноглобулина и все или по сути все области FR являются таковыми из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально также будет включать по меньшей мере часть константной области или домена иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или несколько CDR (одну, две, три, четыре, пять или шесть), которые изменены по отношению к исходному антителу и которые также называются одной или несколькими CDR, "производными" одной или нескольких CDR из исходного антитела. Гуманизированные антитела могут также быть вовлечены в созревание аффинности.

В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с настоящим

изобретением представляет собой химерное антитело, которое может включать тяжелую константную область и легкую константную область человеческого антитела. Химерные антитела относятся к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области от первого вида и константную область от второго вида. Обычно в этих химерных антителах переменная область как легкой, так и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, происходящих от одного вида млекопитающих (например, отличного от человека млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части гомологичны последовательностям в антителах, полученных от другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации могут быть сделаны в переменной области и/или константной области.

В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением специфически связывает целевой антиген, такой как человеческий CD70, человеческий VCMA, человеческий CD19 или человеческий CD33. Антитело, которое "специфически связывается" с целью или эпитопом, подразумевает термин, хорошо известный из уровня техники, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны из уровня техники. Говорят, что молекула характеризуется "специфическим связыванием", если она реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным целевым антигеном, чем с альтернативными целями. Антитело "специфически связывается" с целевым антигеном, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, антитело, которое специфически (или предпочтительно) связывается с эпитопом CD70, VCMA, CD19 или CD33, представляет собой антитело, которое связывает этот эпитоп CD70, VCMA, CD19 или CD33 с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими эпитопами CD70, VCMA, CD19 или CD33, или эпитопами, отличными от CD70, отличными от VCMA, отличными от CD19 или отличными от CD33. При прочтении этого определения также понятно, что, например, антитело, которое специфически связывается с первым целевым антигеном, может или не может специфически или преимущественно связываться со вторым целевым антигеном. Соответственно, "специфическое связывание" или "преимущественное связывание" не обязательно требует (хотя оно может предусматривать) исключительное связывание. Обычно, но не обязательно, упоминание связывания означает преимущественное связывание.

В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_D) между антителом и CD70 составляет от 100 пМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления K_D между антителом и CD70 составляет от 1 нМ до 100 нМ.

В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_D) между антителом и VCMA составляет от 100 пМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления K_D между антителом и VCMA составляет от 1 нМ до 100 нМ.

В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_D) между антителом и CD19 составляет от 100 пМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления K_D между антителом и CD19 составляет от 1 нМ до 100 нМ.

В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_D) между антителом и CD33 составляет от 100 пМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления K_D между антителом и CD33 составляет от 1 нМ до 100 нМ.

Также в объем настоящего изобретения входят функциональные варианты любого из иллюстративных антител, раскрытых в данном документе. Функциональный вариант может содержать один или несколько вариантов аминокислотных остатков в VH и/или VL, или в одной или нескольких CDR VH и/или одной или нескольких CDR VL по сравнению с эталонным антителом, сохраняя при этом по сути аналогичное связывание и формы биологической активности (например, практически такую же аффинность связывания, специфичность связывания, ингибирующую активность, противоопухолевую активность или их комбинацию), как и у эталонного антитела.

В некоторых примерах раскрытое в данном документе антитело содержит CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, которые в совокупности содержат не более 10 аминокислотных вариаций (например, не более 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации) по сравнению с CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH эталонного антитела, такого как антитело А (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) или антитело В (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61). "В совокупности" означает, что общее число аминокислотных вариаций во всех из трех CDR VH попадает в определяемый диапазон. В качестве альтернативы или дополнения, антитело может содержать CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, которые в совокупности содержат не более 10 аминокислотных вариаций (например, не более 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации) по сравнению с CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL эталонного антитела.

В некоторых примерах раскрытое в данном документе антитело может содержать CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, по меньшей мере одна из которых содержит не более 5 аминокислотных вариаций (например, не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации), как у аналогичной CDR VH эталонного антитела, такого как антитело А (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) или антитело В (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61). В определенных примерах антитело содержит CDR3 VH, которая содержит не более 5 аминокислотных вариаций (например, не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации), как CDR3 VH эталонного антитела, такого как антитело А (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) или антитело В (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61). В качестве альтернативы или дополнения, антитело может содержать CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, по меньшей мере одна из которых содержит не более 5 аминокислотных вариаций (например, не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации), как у аналогичной CDR VL эталонного антитела. В определенных примерах антитело содержит CDR3 VL, которая содержит не более 5 аминокислотных вариаций (например, не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации), как CDR3 VL эталонного антитела.

В некоторых случаях вариации аминокислотных остатков могут быть консервативными заменами аминокислотных остатков. Как и используется в данном документе, "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не изменяет характеристики относительного заряда или размера белка, в котором выполнена аминокислотная замена. Варианты могут быть получены согласно способам изменения полипептидной последовательности, известным специалисту в данной области техники, таким как указанные в ссылках, в которых собраны такие способы, например *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 или *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, выполняемые среди аминокислот в следующих группах: (a) A □ G, S; (b) R □ K, H; (c) N □ Q, H; (d) D □ E, N; (e) C □ S, A; (f) Q □ N; (g) E □ D, Q; (h) G □ A; (i) H □ N, Q; (j) I □ L, V; (k) L □ I, V; (l) K □ R, H; (m) M □ L, I, Y; (n) F □ Y, M, L; (o) P □ A; (p) S □ T; (q) T □ S; (r) W □ Y, F; (s) Y □ W, F и (t) V □ I, L.

В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, может содержать CDR VH, которые в совокупности характеризуются по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичностью с CDR VH эталонного антитела, такого как антитело А (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) или антитело В (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61). В качестве альтернативы или дополнения, антитело может содержать CDR VL, которые совместно являются на по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95%, или 98%) идентичными с CDR VL эталонного антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать VH, которая характеризуется по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичностью с VH эталонного антитела, такого как антитело А (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) или антитело В (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61), и/или VL, которая характеризуется по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичностью с VL эталонного антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 51 и 52 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 51, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 51, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 52, где CDR определяют по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 51, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 52, где CDR определяют по Chothia. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID

NO: 51, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 52, где CDR определяют по AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 68, 70 и 72 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 62, 64 и 66. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 69, 71 и 73 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 63, 65 и 67. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 47.

В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 60 и 61 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 60, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 60, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 61, где CDR определяют по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 60, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 61, где CDR определяют по Chothia. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 60, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 61, где CDR определяют по AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 80, 82 и 84 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 74, 76 и 78. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 81, 83 и 85 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 75, 77 и 79. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность,

изложенную под SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 152 и 153 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 152, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 153. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 152, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 153, где CDR определяют по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 152, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 153, где CDR определяют по Chothia. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 152, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 153, где CDR определяют по AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 169, 170 и 171 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 166, 167 и 168 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 175, 176 и 177 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 151. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 150.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 140 и 141 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 140, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 140, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 141, где CDR определяют по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 140, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 141, где

CDR определяют по Chothia. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) из VH, изложенной под SEQ ID NO: 140, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) из VL, изложенной под SEQ ID NO: 141, где CDR определяют по AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 142, 143 и 144 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 145, 146 и 147. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 178, 179 и 180 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 145, 146 и 147. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 138.

Конструкция химерного антигенного рецептора, нацеливающаяся на антиген

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, содержат нацеливающийся на опухолевый антиген CAR. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой "ассоциированный с опухолью антиген", относящийся к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая обычно экспрессируется на более высоком уровне в опухолевых клетках, чем в не являющихся опухолевыми клетках, в которых она может не экспрессироваться вообще или только на низких уровнях. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью структуры, которые распознаются иммунной системой хозяина, несущего опухоль, называются антигенами, ассоциированными с опухолью. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с опухолью антиген является универсальным опухолевым антигеном, если он широко экспрессируется в большинстве опухолей. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью антигены представляют собой дифференцировочные антигены, мутационные антигены, сверхэкспрессированные клеточные антигены или вирусные антигены. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой "опухолеспецифический антиген" или "TSA", относящийся к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая является уникальной для опухолевой клетки. Опухолеспецифические антигены экспрессируются исключительно в опухолевых клетках. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген не является CD70.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, содержат CAR, не нацеливающийся на CD70 (например, CAR который не связывает CD70).

CAR для CD19

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в

данном документе, содержат нацеливающийся на CD19 CAR, также называемый в данном документе как CAR для CD19, CAR к CD19 или CAR к CD19 в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD19, (ii) трансмембранный домен и (iii) эндодомен, содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD19, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD19, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD19, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD19, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD19, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 151, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD19, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 152 и 153 соответственно, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 кодируется нуклеотидной последовательностью, изложенной

под SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 148.

CAR для CD33

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, содержат нацеливающийся на CD33 CAR, также называемый в данном документе как CAR для CD33, CAR к CD33 или CAR к CD33 в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD33, (ii) трансмембранный домен и (iii) эндодомен, содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD33, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD33, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD33, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD33, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD33, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 137, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD33, содержащий вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 140 и 141 соответственно, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит

костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 139. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 кодируется нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 136.

CAR для ВСМА

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, содержат нацеливающийся на ВСМА CAR, также называемый в данном документе как CAR для ВСМА, CAR к ВСМА или CAR к ВСМА в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен ВСМА, (ii) трансмембранный домен и (iii) эндодомен, содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен ВСМА, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен ВСМА, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен ВСМА, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен ВСМА, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 59, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и сигнальный домен CD3-дзета,

содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к ВСМА, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 60 и 61 соответственно, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА кодируется нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 56.

CAR для CD70

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, содержат нацеливающийся на CD70 CAR, также называемый в данном документе как CAR для CD70, CAR к CD70 или CAR к CD70 в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD70, (ii) трансмембранный домен и (iii) эндодомен, содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD70, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD70, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD70, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен CD70, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD70, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 50, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD70, содержащий вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 51 и 52 соответственно, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 126, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 кодируется нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 45.

Экспрессия конструкции химерного антигенного рецептора

Донорная матрица

Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, может быть доставлена в Т-клетку, которая содержит то, что в данном документе называется донорной матрицей (также называемой донорным полинуклеотидом). Донорная матрица может содержать негомологичную последовательность, такую как нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкированную двумя областями гомологии, чтобы обеспечить эффективную HDR в местоположении генома, представляющем интерес. В качестве альтернативы, донорная матрица может не иметь областей гомологии с целевым местоположением в ДНК и может быть интегрирована посредством NHEJ-зависимого соединения концов после расщепления в целевом сайте.

Донорная матрица может представлять собой ДНК или РНК, быть однострэндовой и/или двухстрэндовой, и может быть введена в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы донорной последовательности можно защитить (например, от экзонуклеолитического разрушения) с помощью способов, известных специалистам в данной области техники. Например, один или несколько дидезоксинуклеотидных остатков добавляют к 3'-концу линейной молекулы и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируют с одним или обоими концами. См.,

например, Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al., (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от разрушения включают без ограничения добавление концевой(ых) аминогруппы(групп) и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфоротиоатные, фосфорамидатные, и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы.

Донорная матрица может быть введена в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Более того, донорная матрица может быть введена в виде депротенизированной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты со средством, таким как липосома или поллоксамер, или может быть доставлена вирусами (например, аденовирусом, AAV, вирусом герпеса, ретровирусом, лентивирусом и лентивирусом с дефектом интегразы (IDLV)).

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица вставляется так, что ее экспрессия управляется эндогенным промотором в сайте интеграции, а именно промотором, который управляет экспрессией эндогенного гена, в который вставлен донор. Однако в некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит экзогенный промотор и/или энхансер, например, конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор EF1 α , содержащий последовательность под SEQ ID NO: 123. Могут быть использованы другие промоторы.

Кроме того, экзогенные последовательности также могут включать транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, внутренние участки посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды 2A и/или сигналы полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 55.

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 156. В некоторых вариантах осуществления

донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 156.

Другие способы

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, вводится в сконструированную клетку с помощью способов, известных специалистам в данной области техники. Например, CAR может быть введен в сконструированную клетку с помощью вектора. Для введения любой из нуклеиновых кислот или векторов экспрессии, раскрытых в данном документе, в иммунную эффекторную клетку можно использовать ряд различных способов, известных из уровня техники. Неограничивающие примеры способов введения нуклеиновой кислоты в клетку включают липофекцию, трансфекцию (например, трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию с использованием широко разветвленных органических соединений, трансфекцию с использованием катионных полимеров, трансфекцию на основе дендримеров, оптическую трансфекцию, трансфекцию на основе частиц (например, трансфекцию с помощью наночастиц) или трансфекцию с использованием липосом (например, катионных липосом)), микроинъекцию, электропорацию, сжатие клеток, сонопорацию, слияние протопластов, импалефекцию, гидродинамическую доставку, генную пушку, магнитофекцию, вирусную трансфекцию и нуклеофекцию.

Способы доставки и конструкции

Нуклеазы и/или донорные матрицы могут быть доставлены с использованием векторной системы, включающей без ограничения плазмидные векторы, миникольцевые ДНК, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы, герпесвирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы и их комбинации.

Для введения нуклеиновых кислот, кодирующих нуклеазы и донорные матрицы, в клетки (например, Т-клетки) можно использовать традиционные способы переноса генов с участием вирусов и без них. Невирусные векторные системы доставки включают ДНК-плазмиды, миникольцевые ДНК, депротенинизированную нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома или полуксамер. Вирусные векторные системы доставки включают ДНК- и РНК-вирусы, которые после доставки в клетку имеют либо эписомальные, либо интегрированные геномы.

Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатион или конъюгаты липида и нуклеиновой кислоты, депротенинизированную ДНК, депротенинизированную РНК, кэпированную РНК, искусственные вирионы и усиленный средством захват ДНК. Сонопорация с использованием, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar) также может быть использована для доставки нуклеиновых кислот. Ниже приведены некоторые конкретные примеры.

Доставка с помощью аденоассоциированного вируса

Донорная нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию CAR, может быть

доставлена в клетку с использованием аденоассоциированного вируса (AAV). AAV представляют собой небольшие вирусы, которые сайтспецифическим образом интегрируются в геном хозяина и поэтому могут доставлять трансген, такой как CAR. Инвертированные концевые повторы (ITR) присутствуют, фланкируя геном AAV и/или представляющий интерес трансген, и служат точками начала репликации. В геноме AAV также присутствуют белки гер и сар, которые при транскрибировании образуют капсиды, которые инкапсулируют геном AAV для доставки в целевые клетки. Поверхностные рецепторы на этих капсидах обеспечивают серотип AAV, который определяет, с какими целевыми органами капсиды будут в первую очередь связываться, и, таким образом, какие клетки будут наиболее эффективно заражаться AAV. В настоящее время известно двенадцать серотипов AAV человека. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV серотипа 6 (AAV6).

Аденоассоциированные вирусы входят в число наиболее часто используемых вирусов для генной терапии по нескольким причинам. Во-первых, AAV не вызывают иммунного ответа при введении млекопитающим, включая людей. Во-вторых, AAV эффективно доставляют в целевые клетки, особенно при рассмотрении выбора подходящего серотипа AAV. Наконец, AAV обладают способностью инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, поскольку геном может сохраняться в клетке-хозяине без интеграции. Эта особенность делает их идеальным кандидатом для генной терапии.

Направляемая гомологией репарация (HDR)

Донорная нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, вставляется путем репарации, направляемой гомологией (HDR), в локус целевого гена. Обе нити ДНК в целевом локусе разрезаются ферментом CRISPR Cas9. Затем происходит HDR для репарации двухнитевого разрыва (DSB) и вставки донорной ДНК. Для того чтобы это происходило правильно, донорная последовательность конструируется с фланкирующими остатками, которые комплементарны последовательности, окружающей сайт DSB в целевом гене (далее "плечи гомологии"). Эти плечи гомологии служат матрицей для репарации DSB и позволяют HDR быть практически безошибочным механизмом. Скорость репарации, направляемой гомологией (HDR), зависит от расстояния между мутацией и сайтом разрезания, поэтому важно выбрать перекрывающиеся или близлежащие сайты-мишени. Матрицы могут включать дополнительные последовательности, фланкированные гомологичными областями, или могут содержать последовательность, которая отличается от геномной последовательности, тем самым обеспечивая возможность ее редактирования.

Целевой ген может быть ассоциирован с иммунным ответом у субъекта, при этом необратимое удаление по меньшей мере части целевого гена будет модулировать иммунный ответ. Например, для получения Т-клетки с CAR целевой ген может представлять собой константную область TCR α (TRAC). Нарушение TRAC приводит к потере функции эндогенного TCR.

В некоторых вариантах осуществления целевой ген находится в локусе "безопасной

гавани".

Сконструированные Т-клетки

Сконструированные (с отредактированным геном) Т-клетки с CAR в соответствии с настоящим изобретением могут быть аутологичными ("своими") или неаутологичными ("чужими", например, аллогенными, сингенными или ксеногенными). Термин "аутологичный" относится к клеткам одного и того же субъекта. Термин "аллогенный" относится к клеткам того же вида, что и субъект, но генетически отличающимся от клеток субъекта. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают из млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают от человека.

Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая без ограничения мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, тимус, ткань из очага инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В определенных вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта с использованием любого числа методов, известных специалисту в данной области техники, таких как осаждение, например, разделение с помощью FICOLL™.

В некоторых вариантах осуществления используют выделенную популяцию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления после выделения мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты могут быть отсортированы на субпопуляции необученных, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо до, либо после активации, увеличения количества и/или генетической модификации.

Специфическая субпопуляция Т-клеток, экспрессирующая один или несколько из следующих маркеров клеточной поверхности: TCRab, CD3, CD4, CD8, CD27 CD28, CD38 CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD122, CD95, CD197, CCR7, KLRG1, белки MCH-I и/или белки MCH-II, может быть дополнительно выделена с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления конкретную субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующую один или несколько из маркеров, выбранных из группы, состоящей из TCRab, CD4 и/или CD8, дополнительно выделяют с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления популяции сконструированных Т-клеток не экспрессируют или по сути не экспрессируют один или несколько из следующих маркеров: CD70, CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, HM3 и LAG3. В некоторых вариантах осуществления субпопуляции Т-клеток могут быть выделены путем положительного или отрицательного отбора до процедуры генной инженерии и/или после процедуры генной инженерии.

В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция Т-клеток экспрессирует один или несколько из маркеров, включающих без ограничения CD3+, CD4+, CD8+ или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют у донора или субъекта и сначала активируют и стимулируют для пролиферации *in vitro* перед редактированием гена.

Для достижения достаточных терапевтических доз композиций на основе Т-клеток Т-клетки часто подвергают одному или нескольким циклам стимуляции, активации и/или увеличения количества. Т-клетки могут быть активированы и увеличены в количестве, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514 и 6867041. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и увеличивают в количестве в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 3 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 4 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 4 дней или приблизительно 1 дня, приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней или приблизительно 4 дней до введения редактирующих геном композиций в Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и увеличивают в количестве в течение приблизительно 4 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 24 часов, приблизительно 36 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 60 часов или приблизительно 72 часов до введения редактирующих геном композиций в Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют одновременно с введением редактирующих геном композиций в Т-клетки. Популяции Т-клеток или выделенные Т-клетки, полученные с помощью любого из способов редактирования гена, описываемых в данном документе, также попадают в объем настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена популяция Т-клеток, содержащая генетически сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный эндогенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), например, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген, экспрессируемый на патологической клетке. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает *CD70*. В других вариантах осуществления CAR не связывает *CD70*. Такая популяция Т-клеток может дополнительно содержать генетически сконструированные Т-клетки с одним или несколькими из следующих отредактированных генов: нарушенный эндогенный ген программируемой гибели клеток-1 (*PD-1*), нарушенный эндогенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*) и нарушенный эндогенный ген бета-2-микроглобулина (*$\beta 2M$*). В некоторых примерах нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, может быть вставлена в локус *TRAC*.

В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток, раскрытая в данном документе, содержит генетически сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает антиген, экспрессируемый на патологической клетке. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток, раскрытая в данном

документе, содержит генетически сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR связывает CD70. В других вариантах осуществления популяция Т-клеток раскрытая в данном документе, содержит генетически сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где CAR не связывает CD70. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток, раскрытая в данном документе, содержит генетически сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает антиген, экспрессируемый на патологической клетке, и дополнительно содержит нарушенный ген *PD1*. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает CD70. В некоторых вариантах осуществления CAR не связывает CD70. В некоторых аспектах CAR связывает CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает CD33. В некоторых аспектах CAR связывает VCMA. Любые из только что упомянутых сконструированных Т-клеток могут дополнительно содержать нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*) и/или нарушенный ген бета-2-микроглобулина (*β2M*).

В конкретных примерах в данном документе представлена популяция Т-клеток, содержащая генетически сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *CD70*, нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*), нарушенный ген бета-2-микроглобулина (*β2M*), нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), например, CAR к VCMA, CAR к CD19, CAR к CD33 или CAR к CD70, описанный в данном документе, и необязательно нарушенный ген программируемой гибели клеток-1 (*PD-1*). Любые из раскрываемых в данном документе сконструированных Т-клеток могут содержать нативные (ненарушенные) гены HLA.

В некоторых примерах по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) популяции Т-клеток экспрессируют CAR, раскрытый в данном документе, и не экспрессируют поверхностный CD70 на обнаруживаемом уровне. Такие клетки могут дополнительно обладать свойствами отсутствия экспрессии поверхностного TCR на обнаруживаемом уровне, поверхностного β2M на обнаруживаемом уровне и/или поверхностного PD-1 на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) популяции Т-клеток экспрессируют CAR, раскрытый в данном документе, и не экспрессируют поверхностный CD70 на обнаруживаемом уровне, поверхностный TCR на обнаруживаемом уровне и поверхностный β2M на обнаруживаемом уровне. В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) популяции Т-клеток экспрессируют CAR, раскрытый в данном документе, и не экспрессируют поверхностный CD70 на обнаруживаемом уровне, поверхностный TCR на обнаруживаемом уровне, поверхностный β2M на обнаруживаемом уровне и PD-1 на обнаруживаемом уровне.

Выделенная клетка, экспрессирующая CAR, описанный в данном документе, и не экспрессирующая поверхностный CD70 на обнаруживаемом уровне, также попадает в

объем настоящего изобретения. Такая выделенная клетка может не экспрессировать поверхностный TCR на обнаруживаемом уровне, поверхностный $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне и/или поверхностный PD-1 на обнаруживаемом уровне. В некоторых примерах выделенная клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, которая вставляется в локус *TRAC*.

Также в данном документе представлена популяция сконструированных Т-клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, содержащие РНК-направляемую нуклеазу, например, описанную в данном документе (например, нуклеазу Cas9), и направляющую РНК (gRNA), нацеливающуюся на ген *CD70* (например, описанную в данном документе). В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) Т-клеток в популяции Т-клеток содержат РНК-направляемую нуклеазу и gRNA, нацеливающуюся на ген *CD70*. Такая популяция сконструированных Т-клеток может дополнительно содержать сконструированные Т-клетки, содержащие gRNA, нацеливающуюся на ген *PD-1*, gRNA, нацеливающуюся на ген *TRAC*, gRNA нацеливающуюся на ген $\beta 2M$ и/или нуклеиновую кислоту (например, вектор), содержащую донорную матрицу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR (например, описанный в данном документе), которая необязательно фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении локуса гена *TRAC*. В некоторых примерах по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) Т-клеток в популяции Т-клеток содержат РНК-направляемую нуклеазу, gRNA, нацеливающуюся на ген *CD70*, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. Если нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, дополнительно содержит левое и правое плечи гомологии в отношении локуса гена *TRAC*, то Т-клетки также могут содержать gRNA, нацеливающуюся на ген *TRAC*. Кроме того, Т-клетки могут дополнительно содержать gRNA, нацеливающуюся на ген *PD-1*, gRNA, нацеливающуюся на ген $\beta 2M$, или их комбинацию.

Также в объем настоящего изобретения попадает выделенная сконструированная Т-клетка, содержащая РНК-направляемую нуклеазу, gRNA, нацеливающуюся на ген *CD70*, и необязательно одну или несколько из gRNA, нацеливающихся на ген *PD-1*, gRNA, нацеливающихся на ген *TRAC*, gRNA, нацеливающихся на ген $\beta 2M$, и нуклеиновую кислоту (например, вектор), содержащую донорную матрицу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR (например, описанный в данном документе). Нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, может быть фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении локуса гена *TRAC*.

Получение Т-клеток с CAR

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают путем модификации генома клеток. В некоторых вариантах осуществления индуцируют двухнитевый разрыв (DSB) по сайту в целевом гене. В некоторых вариантах осуществления DSB подвергают репарации с использованием одного или нескольких путей репарации эндогенной ДНК. В некоторых вариантах осуществления для пути репарации ДНК не требуется гомологичная последовательность (например, для

пути негомологичного соединения концов или пути NHEJ). В некоторых вариантах осуществления для пути репарации требуется гомологичная последовательность (например, для направляемого гомологией пути или пути HDR).

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают путем индуцирования DSB с помощью CRISPR-Cas9 в качестве эндонуклеазы и одной или нескольких некодирующих РНК и репарации DSB с использованием HDR и донорной полинуклеотидной матрицы, описываемой в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA, комплементарной последовательности целевого гена, который представляет собой TRAC. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA TRAC, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления gRNA TRAC, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 98, нацеливается на последовательность TRAC, изложенную под SEQ ID NO: 118. В некоторых вариантах осуществления gRNA TRAC, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 30, нацеливается на последовательность TRAC, изложенную под SEQ ID NO: 118.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA TRAC, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления gRNA TRAC, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 108, нацеливается на последовательность TRAC, изложенную под SEQ ID NO: 118. В некоторых вариантах осуществления gRNA TRAC, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40, нацеливается на последовательность TRAC, изложенную под SEQ ID NO: 118.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA, комплементарной последовательности целевого гена, который представляет собой $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA $\beta 2M$, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA $\beta 2M$, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления gRNA $\beta 2M$, содержащая последовательность,

вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA CD70, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA CD70, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления gRNA CD70, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 95, нацеливается на последовательность CD70, изложенную под SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления gRNA CD70, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27, нацеливается на последовательность CD70, изложенную под SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA CD70, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA CD70, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления gRNA CD70, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 105, нацеливается на последовательность CD70, изложенную под SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления gRNA CD70, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 37, нацеливается на последовательность CD70, изложенную под SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA, комплементарной последовательности целевого гена, который представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA PD-1, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA PD-1, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления gRNA PD-1, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 100, нацеливается на последовательность β 2M, изложенную под SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления gRNA PD-1, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, нацеливается на последовательность PD-1, изложенную под SEQ ID NO: 120.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA PD-1, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA PD-1, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления gRNA PD-1, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 110, нацеливается на

последовательность PD-1, изложенную под SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления gRNA PD-1, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 42, нацеливается на последовательность PD-1, изложенную под SEQ ID NO: 120.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 98, gRNA β 2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 99, gRNA CD70, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 94 или 95, и/или gRNA PD-1, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 108, gRNA β 2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 109, gRNA CD70, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 104 или 105, и/или gRNA PD-1, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 30, gRNA β 2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31, gRNA CD70, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 26 или 27, и/или gRNA PD-1, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40, gRNA β 2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 41, gRNA CD70, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 36 или 27, и/или gRNA PD-1, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки получают с использованием донорной матрицы, содержащей негомологичную последовательность, которая представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица состоит из плеч гомологии, которые соответствуют последовательностям в целевом гене, которым является TRAC. В некоторых вариантах осуществления 5'-плечо гомологии (левое плечо гомологии) донорной матрицы содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 122. В некоторых вариантах осуществления 3'-плечо гомологии донорной матрицы содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор EF1a, содержащий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 123. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 156. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность, изложенную под SEQ ID

NO: 44. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 55.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие gRNA, нуклеазы и донорные матрицы, вводят в клетки (например, Т-клетки) с использованием традиционных способов переноса генов с участием вирусов и без них.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, такой как gRNA, sgRNA, mRNA, кодирующая нуклеазу, или донорную матрицу доставляют в клетку с использованием невирусной векторной системы доставки. Примеры невирусной векторной системы доставки включают без ограничения ДНК-плазмиду, миникольцевую ДНК, депротенинированную нуклеиновую кислоту, липосому, рибонуклеопротеиновую частицу (RNP) или полоксамер. В некоторых вариантах осуществления способ введения полинуклеотидов в клетку с использованием невирусной векторной системы доставки включает электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику или усиленный средством захват.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, такой как gRNA, sgRNA, mRNA, кодирующая нуклеазу, или донорную матрицу доставляют в клетку с использованием вирусной векторной системы доставки. Примеры вирусной векторной системы доставки включают без ограничения ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы, герпесвирусные векторы и векторы аденоассоциированного вируса (AAV).

В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, кодирующую конструкцию CAR, доставляют в клетку в виде одного или нескольких полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, кодирующую конструкцию CAR, доставляют с помощью вирусного средства доставки. В некоторых вариантах осуществления вирусное средство доставки представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV).

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу (например, Cas9) доставляют в клетку в виде полипептида. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу (например, Cas9) доставляют в клетку отдельно от нацеливающейся на геном нуклеиновой кислоты (например, gRNA, sgRNA). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу (например, Cas9) доставляют в клетку в виде комплекса с одним или несколькими нацеливающимися на геном полинуклеотидами (например, gRNA, sgRNA). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу или предварительно составленную в комплекс эндонуклеазу доставляют с помощью невирусного средства доставки, который включает без ограничения наночастицу, липосому, рибонуклеопротеин, положительно заряженный пептид, конъюгат низкомолекулярной РНК, химеры аптамер-РНК или комплекс РНК-слитый белок. В некоторых вариантах осуществления способ введения полипептида, представляющего собой эндонуклеазу, или предварительно составленного в комплекс полипептида, представляющего собой эндонуклеазу, в клетку включает электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику или усиленный средством захват.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas9 предварительно составляют в комплексе с одной или несколькими sgRNA с образованием рибонуклеопротеиновой частицы (RNP). В некоторых вариантах осуществления RNP Cas9/sgRNA составляют с использованием липидной наночастицы. В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу составляют с использованием AAV вектора. В некоторых вариантах осуществления доставку в клетку составленной RNP Cas9/sgRNA выполняют с помощью электропорации клетки. В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, составленную в виде AAV вектора, доставляют до электропорации. В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, составленную в виде AAV вектора, доставляют в ходе электропорации. В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, составленную в виде AAV вектора, доставляют после электропорации.

В некоторых вариантах осуществления редактирование гена, выполненное с использованием эндонуклеазы CRISPR/Cas9, приводит к образованию сконструированной Т-клетки с нарушенным геном TRAC. В некоторых вариантах осуществления нарушение гена TRAC приводит к элиминированной или пониженной экспрессии продукта гена TRAC. В некоторых вариантах осуществления нарушение гена TRAC нарушает или ингибирует транскрипцию и трансляцию кодируемого геном продукта. В некоторых вариантах осуществления нарушение гена TRAC приводит к элиминированной или пониженной экспрессии продукта гена TRAC. В некоторых вариантах осуществления элиминированная или пониженная экспрессия гена TRAC ассоциирована с потерей функции TCR. В некоторых вариантах осуществления потеря функции TCR делает сконструированную Т-клетку пригодной для аллогенной трансплантации (т. е. минимизируется риск индуцирования GvHD). В некоторых вариантах осуществления нарушение гена TRAC опосредуется путем нокина CAR в гене TRAC (например, с использованием AAV вектора и донорной матрицы). В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена TRAC опосредуется с помощью gRNA, нацеливающих на геномную область TRAC, и нокина CAR в ген CAR. В некоторых вариантах осуществления нокин CAR обеспечивают с помощью донорной матрицы с плечами гомологии, которые отвечают последовательностям TRAC, окружающим сайт DSB.

В некоторых вариантах осуществления редактирование гена, выполненное с использованием эндонуклеазы CRISPR/Cas9, приводит к образованию сконструированной Т-клетки с нарушенным геном $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область $\beta 2M$, обуславливают инсерционно-делеционные мутации в гене $\beta 2M$, которые нарушают или ингибируют транскрипцию и трансляцию кодируемого геном продукта. В некоторых вариантах осуществления нарушение гена $\beta 2M$ приводит к элиминированной или пониженной экспрессии полипептида $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления элиминированная или пониженная экспрессия полипептида $\beta 2M$ ассоциирована с потерей функции комплекса MHC I. В некоторых вариантах осуществления потеря функции MHC I делает сконструированную Т-клетку пригодной для аллогенной трансплантации (т. е. минимизируется риск аллогенного Т-клеточного ответа

против хозяина). В некоторых вариантах осуществления потеря функции МНС I приводит к повышенной устойчивости сконструированной Т-клетки у аллогенного реципиента.

В некоторых вариантах осуществления редактирование гена, выполненное с использованием эндонуклеазы CRISPR/Cas9, приводит к образованию сконструированной Т-клетки с нарушенным геном CD70. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область CD70, обуславливают инсерционно-делеционные мутации в гене CD70, которые нарушают или ингибируют транскрипцию и трансляцию кодируемого геном продукта. В некоторых вариантах осуществления нарушение гена CD70 приводит к элиминированной или пониженной экспрессии полипептида CD70. В некоторых вариантах осуществления элиминированная или пониженная экспрессия полипептида CD70 ассоциирована с усиленной клеточной пролиферацией, усиленной устойчивостью *in vivo*, пониженным истощением и/или усиленной противоопухолевой эффективностью.

В некоторых вариантах осуществления редактирование гена, выполненное с использованием эндонуклеазы CRISPR/Cas9, приводит к образованию сконструированной Т-клетки с нарушенным геном PD-1. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область PD-1, обуславливают инсерционно-делеционные мутации в гене PD-1, которые нарушают или ингибируют транскрипцию и трансляцию кодируемого геном продукта. В некоторых вариантах осуществления нарушение гена PD-1 приводит к элиминированной или пониженной экспрессии полипептида PD-1.

Способы и композиции

В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения рака. Неограничивающие примеры раковых заболеваний, которые можно лечить, как предусмотрено в данном документе, включают множественную миелому, лейкоз (например, Т-клеточный лейкоз, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (B-ALL) и/или хронический лимфобластный лейкоз (C-CLL)), лимфому (например, В-клеточную неходжкинскую лимфому (B-NHL), лимфому Ходжкина и/или Т-клеточную лимфому) и/или светлоклеточную карциному почки (ccRCC). В некотором варианте осуществления способы предусматривают доставку Т-клеток с CAR (например, Т-клеток с CAR к BCMA, к CD19, к CD33 и/или к CD70) в соответствии с настоящим изобретением субъекту с множественной миеломой, лейкозом или лимфомой. Другие неограничивающие примеры раковых заболеваний (например, солидных опухолей), которые можно лечить, как предусмотрено в данном документе, включают рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак шейки матки, рак молочной железы, рак почки, рак щитовидной железы, носоглоточный рак, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластому и/или меланому.

CD70 также был обнаружен в гематологических опухолях и в карциномах. Ограниченный паттерн экспрессии CD70 в нормальных тканях и его широко распространенная экспрессия при различных злокачественных опухолях делают его привлекательной мишенью для терапевтических средств на основе антител. Однако

применение CAR-T-клеточной терапии для нацеливания на CD70⁺ раковые заболевания потенциально проблематично из-за экспрессии CD70 в Т-клетках. Для решения этой потенциальной проблемы в настоящем изобретении также представлены Т-клетки с CAR, которые были сконструированы с нарушением экспрессии эндогенного CD70, с экспрессией при этом связывающего фрагмента к CD70 (например, scFv к CD70).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой CD70⁺ рак. В других вариантах осуществления рак представляет собой BCMA⁺ рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой CD19⁺ рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой CD33⁺ рак. Следует учитывать, что другие раковые заболевания, при которых экспрессируются другие раковые антигены, можно лечить с использованием сконструированных нокаутных по CD70 Т-клеток с CAR в соответствии с настоящим изобретением.

Способы в некоторых вариантах осуществления предусматривают введение субъекту (например, пациенту с CD70⁺ раком, BCMA⁺ раком, CD19⁺ раком или CD33⁺ раком) популяции Т-клеток с CAR, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение субъекту популяции Т-клеток с CAR с нокаутом гена CD70. В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение субъекту популяции Т-клеток с CAR с нокаутом гена CD70 и нокаутом гена PD1. В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают имплантацию клеток субъекту. Эту стадию имплантации можно осуществить с помощью любого способа имплантации, известного из уровня техники. Например, сконструированные клетки можно инъецировать непосредственно в кровь субъекта или иным образом вводить субъекту.

Как показано в данном документе, Т-клетки с CAR с нокаутом гена CD70 характеризуются увеличенной пролиферацией и повышенной устойчивостью *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки с CAR с нокаутом гена CD70 характеризуются повышенной противоопухолевой эффективностью по сравнению с Т-клетками с CAR, экспрессирующими эндогенный CD70. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки с CAR с нокаутом гена CD70 характеризуются повышенной противоопухолевой эффективностью в отношении солидных опухолей по сравнению с Т-клетками с CAR, экспрессирующими эндогенный CD70. Без ограничения теорией, повышенная устойчивость *in vivo* Т-клеток с CAR с нокаутом гена CD70 может способствовать увеличению количества в солидных опухолях и, следовательно, обеспечивать повышенную противоопухолевую эффективность в таких опухолях по сравнению с Т-клетками с CAR, экспрессирующими эндогенный CD70.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения солидной опухоли с Т-клетками с CAR, описываемыми в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения солидной опухоли с Т-клетками CAR к CD70, описываемыми в данном документе.

Стадия введения может включать размещение (например, трансплантацию) клеток, например, сконструированных Т-клеток, в организме субъекта посредством способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в необходимом сайте, таком как опухоль, таким образом, что достигается(ются) требуемый(ые) эффект(ы). Сконструированные Т-клетки можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимое местоположение в организме субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от такого короткого, как от нескольких часов, например, двадцати четырех часов, до нескольких дней, до такого длинного, как несколько лет или даже вся продолжительность жизни субъекта, т. е. при долговременном приживлении. Например, в некоторых аспектах, описанных в данном документе, эффективное количество сконструированных Т-клеток вводят с помощью системного пути введения, такого как внутривенный или внутривенный путь.

Субъектом может быть любой субъект, для которого необходим диагноз, лечение или терапия. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

Донор представляет собой индивидуума, который не является подлежащим лечению субъектом. Донор представляет собой индивидуума, который не является пациентом. В некоторых вариантах осуществления донор является индивидуумом, у которого отсутствует рак, подлежащий лечению, или не имеется подозрение на него. В некоторых вариантах осуществления используют нескольких доноров, например, двух или более доноров.

В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных Т-клеток, вводимая согласно способам, описанным в данном документе, содержит аллогенные Т-клетки, полученные от одного или нескольких доноров. Термин "аллогенный" означает клетку, популяцию клеток или биологические образцы, содержащие клетки, полученные от одного или нескольких разных доноров из одного и того же вида, в которых гены в одном или нескольких локусах не являются идентичными генам реципиента (например, субъекта). Например, популяция сконструированных Т-клеток, вводимая субъекту, может быть получена от одного или нескольких неродственных доноров или от одного или нескольких неидентичных сиблингов. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться популяции сингенных клеток, такие как популяции, полученные от генетически идентичных доноров (например, идентичных близнецов). В некоторых вариантах осуществления клетки являются аутологичными клетками; то есть сконструированные Т-клетки получают или выделяют от субъекта и вводят этому же субъекту, т. е. донором и реципиентом является один и тот же субъект.

Термин "эффективное количество" означает количество сконструированных Т-клеток в популяции, необходимое для предупреждения или облегчения по меньшей мере одного или нескольких признаков или симптомов медицинского состояния (например,

рака), и относится к количеству композиции, достаточному для обеспечения необходимого эффекта, например, для лечения субъекта, имеющего медицинское состояние. Эффективное количество также включает количество, достаточное для предупреждения или задержки развития симптома заболевания, изменения хода развития симптома заболевания (например, без ограничения, замедления прогрессирования симптома заболевания) или устранения симптома заболевания. Понятно, что для любого данного случая подходящее эффективное количество может быть определено специалистом в данной области техники посредством проведения стандартных экспериментов.

Для применения в различных аспектах, описанных в данном документе, эффективное количество клеток (например, сконструированных Т-клеток) составляет по меньшей мере 10^2 клеток, по меньшей мере 5×10^2 клеток, по меньшей мере 10^3 клеток, по меньшей мере 5×10^3 клеток, по меньшей мере 10^4 клеток, по меньшей мере 5×10^4 клеток, по меньшей мере 10^5 клеток, по меньшей мере 2×10^5 клеток, по меньшей мере 3×10^5 клеток, по меньшей мере 4×10^5 клеток, по меньшей мере 5×10^5 клеток, по меньшей мере 6×10^5 клеток, по меньшей мере 7×10^5 клеток, по меньшей мере 8×10^5 клеток, по меньшей мере 9×10^5 клеток, по меньшей мере 1×10^6 клеток, по меньшей мере 2×10^6 клеток, по меньшей мере 3×10^6 клеток, по меньшей мере 4×10^6 клеток, по меньшей мере 5×10^6 клеток, по меньшей мере 6×10^6 клеток, по меньшей мере 7×10^6 клеток, по меньшей мере 8×10^6 клеток, по меньшей мере 9×10^6 клеток или имеет величину, кратную этим значениям. Клетки получают от одного или нескольких доноров или получают из аутологичного источника. В некоторых примерах, описанных в данном документе, увеличивают количество клеток в культуре перед введением субъекту, нуждающемуся в этом.

Способы введения включают инъекцию, инфузию, закапывание или проглатывание. Инъекция включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, внутриспинномозговую и внутригрудинную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления путь является внутривенным.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки вводят системно, что относится к введению популяции клеток не напрямую в целевой участок, ткань или орган, а таким образом, что вместо этого они достигают кровеносной системы субъекта и, следовательно, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам.

Эффективность лечения, включающего применение композиции для лечения медицинского состояния, может определить квалифицированный врач. Лечение считается "эффективным лечением", если какой-либо один или все признаки или симптомы, в качестве лишь одного примера, уровни функциональной мишени, изменяются благоприятным образом (например, повышаются на по меньшей мере 10%), или происходит улучшение или снижение тяжести других клинически приемлемых симптомов

или маркеров заболевания (например, рака). Эффективность также можно измерить по отсутствию ухудшения состояния субъекта, что оценивается по госпитализации или необходимости в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование заболевания останавливается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе. Лечение включает любое лечение заболевания у субъекта и включает: (1) ингибирование заболевания, например, остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение заболевания, например, вызывание регрессии симптомов; и (3) предупреждение или снижение вероятности развития симптомов.

Комбинированные терапевтические средства также охватываются настоящим изобретением. Например, антитела к CD70 и/или CD27 могут быть использованы для связывания и/или модулирования активности CD70 и/или CD27 на Т-клетках с CAR и обеспечения уменьшения истощения, увеличения количества Т-клеток с CAR и повышения эффективности уничтожения раковых клеток. Таким образом, антитела к CD70 и/или CD27 могут быть введены с любой Т-клеткой с CAR, известной из уровня техники, для улучшения функции Т-клетки с CAR. Например, любые сконструированные Т-клетки, представленные в данном документе, могут быть введены в комбинации с антителами к CD70, антителами к CD27 или комбинацией антител к CD70 и антител к CD27. В некоторых вариантах осуществления $TRAC^{-}/\beta 2M^{+} CAR^{+}$ Т-клетки (например, CAR к CD70 или CAR к ВСМА) вводят в комбинации с антителами к CD70 и/или к CD27. В некоторых вариантах осуществления $TRAC^{-}/\beta 2M^{+}/PD-1^{-}/CD70^{-} CAR^{+}$ Т-клетки (например, CAR к CD70 или CAR к ВСМА) вводят в комбинации с антителами к CD70 и/или к CD27. В некоторых вариантах осуществления $TRAC^{-}/\beta 2M^{+}/PD-1^{-} CAR^{+}$ Т-клетки (например, CAR к CD70 или CAR к ВСМА) вводят в комбинации с антителами к CD70 и/или к CD27. В некоторых вариантах осуществления $TRAC^{-}/\beta 2M^{+}/CD70^{-} CAR^{+}$ Т-клетки (например, CAR к CD70 или CAR к ВСМА) вводят в комбинации с антителами к CD70 и/или к CD27. В некоторых вариантах осуществления антитела, вводимые в комбинации, могут представлять собой варлилумаб.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ уменьшения истощения Т-клеток, предусматривающий нарушение гена *CD70* в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ усиления пролиферации Т-клеток, предусматривающий нарушение гена *CD70* в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ усиления цитотоксичности Т-клеток, предусматривающий нарушение гена *CD70* в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ преодоления ингибиторного эффекта иммунной контрольной точки (например, PD-1) в Т-клетках, предусматривающий нарушение гена *CD70* в Т-клетках.

Другие варианты осуществления

В настоящем изобретении предусмотрены следующие варианты осуществления. По всему данному разделу термин "вариант осуществления" сокращается как "Е", за которым следует порядковый номер. Например, "Е1" эквивалентно варианту осуществления 1.

E1. Сконструированная Т-клетка, содержащая нарушенный ген *CD70*, нарушенный ген программируемой гибели клеток-1 (*PD-1*) и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (*CAR*).

E2. Сконструированная Т-клетка, содержащая нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (*CAR*), который связывает *CD70*.

E3. Сконструированная Т-клетка, содержащая нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (*CAR*), который не связывает *CD70*.

E4. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 2 или 3, дополнительно содержащая нарушенный ген *PD-1*.

E5. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-4, дополнительно содержащая нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*).

E6. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-5, дополнительно содержащая нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).

E7. Сконструированная Т-клетка, содержащая:
нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*);
нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$);
нарушенный ген *CD70* и
нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (*CAR*).

E8. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 7, где нуклеиновая кислота, кодирующая *CAR*, вставлена в ген *TRAC*.

E9. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 7 или 8, дополнительно содержащая нарушенный ген *PD-1*.

E10. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-9, где *CAR* содержит эктодомен, который содержит антитело к *CD70*, необязательно где антитело к *CD70* представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (*scFv*) к *CD70*.

E11. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 10, где *scFv* к *CD70* содержит те же определяющие комплементарность области (*CDR*) переменной области тяжелой (*VH*) цепи и такие же *CDR* переменной области легкой (*VL*) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит *VH*, изложенную под SEQ ID NO: 51, и *VL*, изложенную под SEQ ID NO: 52.

E12. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 11, где *scFv* к *CD70* содержит те же *VH* и *VL*-цепи, что и эталонное антитело.

E13. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 11, где *scFv* к *CD70* содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50.

E14. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 11, где *scFv* к *CD70* содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

E15. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-9, где

CAR содержит эктодомен, который содержит антитело к BCMA, необязательно где антитело к BCMA представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) к BCMA.

E16. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 15, где scFv к BCMA содержит те же определяющие комплементарности области (CDR) VH и такие же CDR VL, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 60, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 61.

E17. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 16, где scFv к BCMA содержит те же VH и VL-цепи, что и эталонное антитело.

E18. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 16, где scFv к BCMA содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.

E19. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-18, где CAR содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и необязательно сигнальный домен CD3 ζ .

E20. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 5-19, где ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 44 или 55, и/или нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 45 или 56.

E21. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 6-20, где нарушенный ген $\beta 2M$ содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 9-14.

E22. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-21, где сконструированная Т-клетка сохраняет цитотоксичность после 5 повторных воздействий раковой клетки.

E23. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 22, где сконструированная Т-клетка сохраняет цитотоксичность после 10 повторных воздействий раковой клетки.

E24. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *CD70*, нарушенный ген программируемой гибели клеток-1 (PD-1) и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR).

E25. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает CD70.

E26. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который не связывает CD70.

E27. Популяция клеток по варианту осуществления 25 или 26, дополнительно содержащая нарушенный ген программируемой гибели клеток-1 (*PD-1*).

E28. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-27, дополнительно содержащая нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-

клеточного рецептора (*TRAC*).

Е29. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-28, дополнительно содержащая нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).

Е30. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*); нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$); нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (*CAR*).

Е31. Популяция клеток по варианту осуществления 30, где нуклеиновая кислота, кодирующая *CAR*, вставлена в ген *TRAC*.

Е32. Популяция клеток по варианту осуществления 30 или 31, где сконструированные Т-клетки дополнительно содержат нарушенный ген программируемой гибели клеток-1 (*PD-1*).

Е33. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24 или 27-32, где *CAR* содержит эктодомен, который содержит антитело к *CD70*, необязательно где антитело к *CD70* представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (*scFv*) к *CD70*.

Е34. Популяция клеток по варианту осуществления 33, где *scFv* к *CD70* содержит те же определяющие комплементарность области (*CDR*) *VH* и такие же *CDR VL*, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит *VH*, изложенную под SEQ ID NO: 51, и *VL*, изложенную под SEQ ID NO: 52.

Е35. Популяция клеток по варианту осуществления 34, где *scFv* к *CD70* содержит те же *VH* и *VL*-цепи, что и эталонное антитело.

Е36. Популяция клеток по варианту осуществления 35, где *scFv* к *CD70* содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50.

Е37. Популяция клеток по варианту осуществления 35, где *scFv* к *CD70* содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

Е38. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-32, где *CAR* содержит эктодомен, который содержит антитело к *BCMA*, необязательно где антитело к *BCMA* представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (*scFv*) к *BCMA*.

Е39. Популяция клеток по варианту осуществления 38, где *scFv* к *BCMA* содержит те же определяющие комплементарность области (*CDR*) *VH* и такие же *CDR VL*, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит *VH*, изложенную под SEQ ID NO: 60, и *VL*, изложенную под SEQ ID NO: 61.

Е40. Популяция клеток по варианту осуществления 39, где *scFv* к *BCMA* содержит те же *VH* и *VL*-цепи, что и эталонное антитело.

Е41. Популяция клеток по варианту осуществления 39, где *scFv* к *BCMA* содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.

Е42. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 28-41, где ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 44 или 55, и/или нуклеиновая

кислота, кодирующая CAR, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 45 или 56.

E43. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 29-42, где нарушенный ген $\beta 2M$ содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 9-14.

E44. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-43, где по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок CD70 на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок PD-1 на обнаруживаемом уровне и/или экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне.

E45. Популяция клеток по варианту осуществления 44, где 50% - 70%, сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок CD70 на обнаруживаемом уровне, не экспрессируют поверхностный белок PD-1 на обнаруживаемом уровне и/или экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне.

E46. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 28-45, где по меньшей мере 90%, необязательно 90%-100%, сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне.

E47. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 29-46, где по меньшей мере 60%, необязательно 60%-75%, сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

E48. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-47, где по меньшей мере 80%, необязательно 80%-100%, сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок CD70 на обнаруживаемом уровне.

E49. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 1-48, где по меньшей мере 80%, необязательно 80%-95%, сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне.

E50. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-49, где сконструированные Т-клетки характеризуются на по меньшей мере 20% большим клеточным пролиферативным потенциалом по сравнению с контрольными Т-клетками.

E51. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-50, где сконструированные Т-клетки характеризуются на по меньшей мере 20% большей способностью к клеточному лизису по сравнению с контрольными Т-клетками.

E52. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-51, где уровень цитокинов, секретируемых сконструированными Т-клетками, по меньшей мере в 2 раза превышает уровень цитокинов, секретируемых контрольными Т-клетками.

E53. Популяция по любому из вариантов осуществления 24-52, где сконструированные Т-клетки характеризуются пониженным клеточным истощением по

сравнению с контрольными Т-клетками.

E54. Популяция клеток по варианту осуществления 53, где сконструированные Т-клетки экспрессируют пониженные уровни LAG3 по сравнению с контрольными Т-клетками.

E55. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 54, где контрольные Т-клетки представляют собой сконструированные Т-клетки, которые экспрессируют эндогенный белок CD70.

E56. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-55, где сконструированные Т-клетки сохраняют цитокин-зависимую пролиферацию.

E57. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 24-56, где сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после 5 повторных воздействий раковой клетки.

E58. Популяция клеток по варианту осуществления 47, где сконструированные Т-клетки сохраняют цитотоксичность после 10 повторных воздействий раковой клетки.

E59. Способ, предусматривающий введение субъекту популяции клеток по любому из вариантов осуществления 24-58.

E60. Способ по варианту осуществления 59, где сконструированные Т-клетки представляют собой сконструированные Т-клетки человека.

E61. Способ по варианту осуществления 59 или 60, где у субъекта имеется рак.

E62. Способ по варианту осуществления 61, где рак характеризуется экспрессией CD70 и/или ВСМА.

E63. Способ по любому из вариантов осуществления 59-62, где популяцию клеток вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения рака.

E64. Способ по любому из вариантов осуществления 59-63, где рак представляет собой солидную злокачественную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

E65. Способ по варианту осуществления 64, где солидная злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, опухоли почки, опухоли легкого и опухоли желудочно-кишечного тракта.

E66. Способ по варианту осуществления 63, где популяцию клеток вводят субъекту в количестве, эффективном для снижения объема опухоли у субъекта.

E67. Способ получения сконструированной Т-клетки, при этом способ предусматривает:

(а) доставку в Т-клетку

РНК-направляемой нуклеазы,

gRNA, нацеливающейся на ген *CD70*, и

вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR; и

(b) получение сконструированной Т-клетки, содержащей нарушенный ген *CD70* и экспрессирующей CAR.

E68. Способ по варианту осуществления 67, дополнительно предусматривающий на стадии (a) доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген *PD-1*; где сконструированная Т-клетка из стадии (b) дополнительно содержит нарушенный ген *PD-1*.

E69. Способ по варианту осуществления 67 или варианту осуществления 68, дополнительно предусматривающий на стадии (a) доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген *TRAC*; где сконструированная Т-клетка из стадии (b) дополнительно содержит нарушенный ген *TRAC*.

E70. Способ по варианту осуществления 69, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении локуса гена *TRAC*; и где сконструированная Т-клетка из стадии (b) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, вставленную в локус гена *TRAC*.

E71. Способ по любому из вариантов осуществления 67-70, дополнительно предусматривающий на стадии (a) доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$; где сконструированная Т-клетка из стадии (b) дополнительно содержит нарушенный ген $\beta 2M$.

E72. Способ получения сконструированной Т-клетки, при этом способ предусматривает:

(a) доставку в Т-клетку

РНК-направляемой нуклеазы,

gRNA, нацеливающейся на ген *TRAC*,

gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$,

gRNA, нацеливающейся на ген *CD70*, и

вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR; и

(b) получение сконструированной Т-клетки.

E73. Способ по варианту осуществления 72, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении локуса гена *TRAC*.

E74. Способ по варианту осуществления 72 или 73 дополнительно предусматривающий доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген *PD-1*.

E75. Способ по любому из вариантов осуществления 67-74, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, необязательно нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*.

E76. Способ по любому из вариантов осуществления 69-75, где gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 98 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 118, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 30.

E77. Способ по любому из вариантов осуществления 71-76, где gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 99 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 119, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную

последовательность под SEQ ID NO: 31.

E78. Способ по любому из вариантов осуществления 67-77, где gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 94 или 95 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 114 или 115, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26 или 27.

E79. Способ по любому из вариантов осуществления 68-71 и 74-78, где gRNA, нацеливающаяся на ген *PD-1*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 100 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 120, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *PD-1*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 32.

E80. Способ по любому из вариантов осуществления 67-79, где CAR содержит эктодомен, который содержит антитело к CD70, необязательно где антитело к CD70 представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к CD70.

E81. Способ по варианту осуществления 80, где scFv к CD70 содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) VH и такие же CDR VL, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 51, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 52.

E82. Способ по варианту осуществления 81, где scFv к CD70 содержит те же VH и VL-цепи, что и эталонное антитело.

E83. Способ по варианту осуществления 81, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50.

E84. Способ по варианту осуществления 81, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

E85. Способ по любому из вариантов осуществления 67-79, где CAR содержит эктодомен, который содержит антитело к BCMA, необязательно где антитело к BCMA представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к BCMA.

E86. Способ по варианту осуществления 85, где scFv к BCMA содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) VH и такие же CDR VL, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 60, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 61.

E87. Способ по варианту осуществления 86, где scFv к BCMA содержит те же VH и VL-цепи, что и эталонное антитело.

E88. Способ по варианту осуществления 86, где scFv к BCMA содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.

E89. Способ по любому из вариантов осуществления 67-88, где CAR дополнительно содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и необязательно сигнальный домен CD3z.

E90. Способ по варианту осуществления 72, где вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 46.

Е91. Способ по варианту осуществления 72, где вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57.

Е92. Сконструированная Т-клетка, содержащая РНК-направляемую нуклеазу и gRNA, нацеливающуюся на ген *CD70*, необязательно где gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 94 или 95 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 114 или 115, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26 или 27.

Е93. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 92, дополнительно содержащая gRNA, нацеливающуюся на ген *PD-1*, необязательно где gRNA, нацеливающаяся на ген *PD-1*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 100 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 120, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *PD-1*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 32.

Е94. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 92 или 93, дополнительно содержащая gRNA, нацеливающуюся на ген *TRAC*, необязательно где gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 98 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 118, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 30.

Е95. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 92-94, дополнительно содержащая gRNA, нацеливающуюся на ген $\beta 2M$, необязательно где gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 99 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 119, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 31.

Е96. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 92-95, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, необязательно нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*.

Е97. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 92-96 дополнительно содержащая вектор, содержащий донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, необязательно где нуклеиновая кислота кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении локуса гена *TRAC*.

Е98. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 97, где CAR содержит эктодомен, который содержит антитело к CD70, необязательно где антитело к CD70 представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к CD70.

Е99. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 98, где scFv к CD70

содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) VH и такие же CDR VL, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 51, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 52.

E100. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 99, где scFv к CD70 содержит те же VH и VL-цепи, что и эталонное антитело.

E101. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 99, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50.

E102. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 99, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

E103. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 97 где CAR содержит эктодомен, который содержит антитело к ВСМА, необязательно где антитело к ВСМА представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к ВСМА.

E104. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 103, где scFv к ВСМА содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) VH и такие же CDR VL, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 60, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 61.

E105. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 104, где scFv к ВСМА содержит те же VH и VL-цепи, что и эталонное антитело.

E106. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 104, где scFv к ВСМА содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.

E107. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 97, где вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46 или 57.

E108. Способ усиления пролиферации или снижения истощения Т-клеток, при этом способ предусматривает нарушение гена *CD70* в Т-клетках.

E109. Способ по варианту осуществления 108, дополнительно предусматривающий нарушение в Т-клетках по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из гена программируемой гибели клеток-1 (*PD-1*), гена константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*) и гена бета-2-микроглобулина (*β 2M*).

E110. Способ по любому из вариантов осуществления 108-109, дополнительно предусматривающий экспрессию в Т-клетках нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR).

E111. Способ по любому из вариантов осуществления 108-110, где ген *CD70* нарушают путем редактирования генов с помощью CRISPR/Cas.

E112. Способ по любому из вариантов осуществления 110-111, где *PD-1*, *TRAC* и/или *β 2M* нарушают путем редактирования генов с помощью CRISPR/Cas.

E113. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение пациенту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, с лечением тем самым рака у субъекта.

E114. Способ по варианту осуществления 113, где CAR связывает CD70.

E115. Способ по варианту осуществления 113, где CAR не связывает CD70.

E116. Способ по любому из вариантов осуществления 113-115, где сконструированные Т-клетки дополнительно содержат нарушенный ген TRAC.

E117. Способ по любому из вариантов осуществления 113-116, где сконструированные Т-клетки дополнительно содержат нарушенный ген B2M.

E118. Способ по любому из вариантов осуществления 113-116, где сконструированные Т-клетки дополнительно содержат нарушенный ген PD-1.

E119. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение пациенту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген TRAC;

(ii) нарушенный ген B2M;

(iii) нарушенный ген CD70 и

(iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR;

за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта.

E120. Способ по любому из вариантов осуществления 113-114 и 116-119, где CAR содержит (a) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела к CD70, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и костимулирующий домен CD3z.

E121. Способ по варианту осуществления 119 или 120, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

E122. Способ по любому из вариантов осуществления 120-121, где антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70.

E123. Способ по варианту осуществления 122, где scFv к CD70 содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой (VH) цепи и такие же CDR вариабельной области легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 51, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 52.

E124. Способ по варианту осуществления 123, где scFv к CD70 содержит те же VH и VL-цепи, что и эталонное антитело.

E125. Способ по варианту осуществления 122, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50.

E126. Способ по варианту осуществления 122, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

E127. Способ по любому из вариантов осуществления 113 и 115-118, где CAR содержит эктодомен, который содержит антитело к BCMA, необязательно где антитело к BCMA представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к BCMA.

E128. Способ по варианту осуществления 127, где scFv к BCMA содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) VH и такие же CDR VL, что и эталонное

антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 60, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 61.

E129. Способ по варианту осуществления 128, где scFv к ВСМА содержит те же VH и VL-цепи, что и эталонное антитело.

E130. Способ по варианту осуществления 127, где scFv к ВСМА содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.

E131. Способ по любому из вариантов осуществления 113-130, где сконструированные Т-клетки представляют собой сконструированные Т-клетки человека.

E132. Способ по любому из вариантов осуществления 113-131, где рак характеризуется экспрессией CD70 и/или ВСМА.

E133. Способ по любому из вариантов осуществления 113-132, где популяцию клеток вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения рака.

E134. Способ по любому из вариантов осуществления 113-133, где рак представляет собой солидную злокачественную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

E135. Способ по варианту осуществления 134, где солидная злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, опухоли почки, опухоли легкого и опухоли желудочно-кишечного тракта.

E136. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

- (i) нарушенный ген TRAC;
- (ii) нарушенный ген бета-2-микроглобулина (B2M);
- (iii) нарушенный ген CD70;
- (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий (a) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела к CD70, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и костимулирующий домен CD3z.

E137. Популяция клеток по варианту осуществления 136, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

E138. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 136-137, где сконструированные Т-клетки представляют собой Т-клетки человека.

E139. Сконструированная Т-клетка, содержащая:

- (i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46;
- (ii) нарушенный ген B2M и
- (iii) нарушенный ген CD70.

E140. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 139, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, содержит последовательность, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на

по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентичную с SEQ ID NO: 45.

E141. Сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45;

(ii) нарушенный ген B2M и

(iii) нарушенный ген CD70.

E142. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 139-141, где нарушенный ген TRAC содержит донорную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 45, или SEQ ID NO: 44.

E143. Сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген TRAC, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 44;

(ii) нарушенный ген B2M и

(iii) нарушенный ген CD70.

E144. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 139-143, где Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Эффективный нокаут CD70 с помощью RNP Cas9:sgRNA в Т-клетках

В данном примере описывается эффективное редактирование гена *CD70* в первичных Т-клетках человека *ex vivo* с использованием редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9. Геномные сегменты гена *CD70*, содержащие первые три (3) экзона, кодирующих белок, использовали в качестве исходного материала в программном обеспечении для конструирования gRNA. Геномные сегменты также включали фланкирующие акцепторные/донорные последовательности сайта сплайсинга. Необходимыми gRNA являлись те, которые обеспечивали бы вставки или делеции в кодирующей последовательности с нарушением аминокислотной последовательности CD70, что приводит к выходу аллеля(ей) за пределы рамки считывания/потере функции аллеля(ей) (называемых аллелями с "нокаутом по CD70"). Синтезировали все семь (7) определяемых *in silico* спейсерных последовательностей gRNA, нацеливающихся на ген *CD70*, и gRNA специфически модифицировали, как показано в **таблице 5**. Хотя gRNA в **таблице 5** модифицировали с 2'-О-метилфосфоротиоатными модификациями, можно использовать немодифицированные gRNA или gRNA с другими модификациями. См. также РСТ/IB2018/001619, поданную 11 мая 2018 года, включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Таблица 5. Последовательности gRNA CD70/целевые последовательности

Последовательность gRNA		
Название	Немодифицированная	Модифицированная

	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
sgRNA CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACC AAUguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 23)	U*C*A*CCAAGCCCGCGA CCAAUguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 33)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACC AAU (SEQ ID NO: 91)	U*C*A*CCAAGCCCGCGA CCAAU (SEQ ID NO: 101)
sgRNA CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGAC CAAguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 24)	A*U*C*ACCAAGCCCGCG ACCAAguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 34)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGAC CAA (SEQ ID NO: 92)	A*U*C*ACCAAGCCCGCG ACCAA (SEQ ID NO: 102)
sgRNA CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCC UAUguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 25)	C*G*G*UGCGGCGCAGGC CCUAUguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 35)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCC UAU (SEQ ID NO: 93)	C*G*G*UGCGGCGCAGGC CCUAU (SEQ ID NO: 103)
sgRNA CD70 (E1_T7); также называется: T7	GCUUUGGUCCCAUUGGU CGCguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 26)	G*C*U*UUGGUCCCAUU GGUCGCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 36)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGU CGC (SEQ ID NO: 94)	G*C*U*UUGGUCCCAUU GGUCGC (SEQ ID NO: 104)
sgRNA CD70 (E1_T8);	GCCCGCAGGACGCACCC	G*C*C*CGCAGGACGCAC

также называется: T8	AUAguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 27)	CCAUAguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 37)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCC AUA (SEQ ID NO: 95)	G*C*C*CGCAGGACGCAC CCAUA (SEQ ID NO: 105)
sgRNA CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCG CACguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 28)	G*U*G*CAUCCAGCGCUU CGCACguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 38)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCG CA C (SEQ ID NO: 96)	G*U*G*CAUCCAGCGCUU CGCAC (SEQ ID NO: 106)
sgRNA CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCG UGAguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 29)	C*A*G*CUACGUAUCCA CGUGAguuuuagagcuagaaau agcaaguuaaaaaaaggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 39)
Спейсер sgRNA CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCG UGA (SEQ ID NO: 97)	C*A*G*CUACGUAUCCA CGUGA (SEQ ID NO: 107)
Целевые последовательности		
Название	Целевая последовательность (PAM)	
sgRNA CD70 (E1_T1)	TCACCAAGCCCGCGACCAAT (GGG) (SEQ ID NO: 111)	
sgRNA CD70 (E1_T3)	ATCACCAAGCCCGCGACCAA (TGG) (SEQ ID NO: 112)	
sgRNA CD70 (E1_T4)	CGGTGCGGCGCAGGCCCTAT (GGG) (SEQ ID NO: 113)	
sgRNA CD70 (E1_T7)	GCTTTGGTCCATTGGTCGC (GGG) (SEQ ID NO: 114)	
sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCATA (GGG) (SEQ ID NO: 115)	
sgRNA CD70 (E1_T10)	GTGCATCCAGCGCTTCGCAC (AGG) (SEQ ID NO: 116)	
sgRNA CD70 (E3_T1)	CAGCTACGTATCCATCGTGA (TGG) (SEQ ID NO: 117)	
sgRNA TRAC	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 118)	
sgRNA β2M	GCTACTCTCTTTCTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 119)	

sgRNA PD-1	CTGCAGCTTCTCCAACACAT (CGG) (SEQ ID NO: 120)
------------	---

*: остаток 2'-О-метилфосфориоата

Первичные Т-клетки человека трансфицировали (электропорировали) с помощью рибонуклеопротеиновой частицы (RNP), содержащей нуклеазу Cas9 и синтетическую модифицированную sgRNA, нацеливающуюся на ген *CD70* (последовательности в **таблице 5**), или контролей (без Cas9, без gRNA). Через четыре-шесть (4-6) дней после трансфекции клетки (1) подвергали анализу TIDE для оценки частоты инсерционно-делеционной мутации и (2) обрабатывали посредством проточной цитометрии (первичное антитело: антитело FITC к CD70 человека, клон 113-16, Biolegend) для оценивания уровней экспрессии CD70 на клеточной поверхности.

Семь (7) gRNA давали измеряемые данные с помощью анализа TIDE, как показано в **таблице 6**. Для четырех (4) последовательностей gRNA получали проценты инсерционно-делеционных мутаций (частоты редактирования) выше 85% при нокдауне экспрессии белка выше 80% (SEQ ID NO: 23, 26, 27 и 29), что указывает на высокую эффективность редактирования гена. Данные в **таблице 6** получены от одного (1) донора. Уровень экспрессии белка CD70 (оцениваемый по медиане интенсивности флуоресценции (MFI)) на тестируемый образец нормализовали по отношению к уровню экспрессии белка CD70, присутствующего в контрольных клетках.

Таблица 6. Последовательности gRNA CD70, значения эффективности разрезания и экспрессия поверхностного белка CD70 в Т-клетках с отредактированным геном

Название gRNA	Спейсерная последовательность gRNA	% инсерционно-делеционной мутации	R ²	% нокдауна экспрессии и белка
CD70 EXON1_T1 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGC GACCAAU (SEQ ID NO: 91)	89,3%	0,97	84,8%
CD70 EXON1_T3 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCG CGACCAA (SEQ ID NO: 92)	65,2%	0,93	84,0%
CD70 EXON1_T4 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCA GGCCCUAU (SEQ ID NO: 93)	81,6%	0,83	87,5%
CD70 EXON1_T7 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCA UUGGUCGC (SEQ ID NO: 94)	97,8%	0,98	87,7%

CD70 EXON1_T8 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGC ACCCAUA (SEQ ID NO: 95)	90,1%	0,94	88,1%
CD70 EXON1_T10 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGC UUCGCAC (SEQ ID NO: 96)	28,3%	0,30	83,9%
CD70 EXON3_T1 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCC AUCGUGA (SEQ ID NO: 97)	85,6%	0,93	87,2%

Анализ профилей направленных инсерционно-делеционных мутаций в Т-клетках

Анализ целевых ампликонов проводили в локусе CD70 после редактирования гена с использованием направляющей T7 (SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 36), нацеливающейся на ген CD70:

GCTTTGGTCCCATTTGGTCGC (SEQ ID NO: 160; целевая последовательность, с PAM SEQ ID NO: 114).

После редактирования гена анализ целевого ампликона проводили вокруг локуса CD70 в TRAC-/ β 2M-/CD70-/CAR к CD70+ клетках (полученных, как описано в примере 3).

Выполняли первоначальную ПЦР с использованием набора КАРА HiFi PCR (Кара Biosystems, Уилмингтон, Массачусетс). Объединяли 100 нг исходной gDNA с 10 мкМ каждого праймера. Праймеры CD70_F и CD70_R спаривали для амплификации локуса CD70 (таблица 7).

Таблица 7. Праймеры для получения библиотеки ампликонов CD70

CD70_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGcccaacttttccatctcaactcacc ccaagt (SEQ ID NO: 127)
CD70_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcccctcctgcgctagcgga (SEQ ID NO: 128)

Анализ локуса CD70 в популяции Т-клеток после редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9 для получения TRAC-/ β 2M-/CAR к CD70+ Т-клеток приводит к частотам специфических инсерционно-делеционных мутаций и появлению генетически отредактированных последовательностей в локусе CD70 (таблица 8; делеции представлены в виде прочерков, а вставки выделены жирным шрифтом). Получали две клеточные популяции отредактированных клеток из двух разных донорных Т-клеток (1 и 2). Популяции отредактированных Т-клеток от каждого донора анализировали в повторности: 1А/1В и 2А/2В.

Таблица 8.

SE Q	Генетически отредактированная последовательность	1А	1В	2А	2В	Сре днее	Ста ндар
------	--	----	----	----	----	----------	----------

ID NO :						знач ение	тное откл онен ие
129	CACACCACGAGGCAGATCACCAAG CCCGCG-- CAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAG GACG	10,4 %	11,1 %	14,4 %	14,8 %	12,7 %	0,022
130	CACACCACGAGGCAGATCACCAA GCCCGCGAACCAATGGGACCAAA GCAGCCCGCAGGACG	8,7%	10,0 %	11,3 %	11,1 %	10,3 %	0,012
131	CACACCACGAGGCAGATC----- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCG CAGGACG	8,2%	7,8%	7,1%	6,8%	7,5%	0,006
132	CACACCACGAGGCAGATCACCAA GCCCGCG- CCAATGGGACCAAAGCAGCCCGC AGGACG	3,9%	4,5%	4,2%	4,3%	4,2%	0,002
133	CACACCACGAGGCAGATCACCAA GCCCGC- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCG CAGGACG	2,2%	2,5%	2,4%	2,6%	2,4%	0,002
134	CACACCACGAGGCAGATCACCA--- -----AGCCCGCAGGACG	2,9%	2,3%	2,0%	2,0%	2,3%	0,004

Пример 2. Получение Т-клеток с нокаутами нескольких генов

В данном примере описывается применение технологии редактирования генов CRISPR/Cas9 для получения Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия двух, трех или четырех генов одновременно. В частности, ген Т-клеточного рецептора (TCR) (генетически отредактированный в константной области TCR альфа (TRAC)), ген $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2M$), ген кластера дифференцировки 70 (CD70) и/или ген программируемой гибели клеток 1 (PD-1 или PD1) редактировали с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9 для получения Т-клеток, дефицитных по двум или более из перечисленных генов. Для краткости и ясности в графических материалах используются следующие сокращения:

2X KO: TRAC⁻/ $\beta 2M$ ⁻

3X KO (PD-1): TRAC⁻/ $\beta 2M$ ⁻/PD-1⁻

3X KO (CD70): TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻

4X KO: TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻

Активированные первичные Т-клетки человека электропорировали с помощью комплексов RNP Cas9:gRNA. Смесь для нуклеофекции содержала раствор Nucleofector™, 5×10⁶ клеток, 1 мкМ Cas9 и 5 мкМ gRNA (как описано в Hendel *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2015; 33(9):985-989, PMID: 26121415). Для получения Т-клеток с нокаутом по двум генам (2X KO) клетки электропорировали с помощью двух разных комплексов RNP, каждый из которых содержал белок Cas9 и одну из следующих sgRNA: TRAC (SEQ ID NO: 40) и β2M (SEQ ID NO: 41) при концентрациях, указанных выше. Для получения Т-клеток с нокаутом по трем генам (3X KO) клетки электропорировали с помощью трех разных комплексов RNP, при этом каждый комплекс РНК содержал белок Cas и одну из следующих sgRNA: (a) TRAC (SEQ ID NO: 40), β2M (SEQ ID NO: 41) и PD-1 (SEQ ID NO: 42) при концентрациях, указанных выше; или (b) TRAC (SEQ ID NO: 40), β2M (SEQ ID NO: 41) и CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37) при концентрациях, указанных выше. Для получения Т-клеток с нокаутом по четырем генам (4X KO) клетки электропорировали с помощью четырех разных комплексов RNP, при этом каждый комплекс РНК содержал белок Cas9 и одну из следующих sgRNA: TRAC (SEQ ID NO: 40), β2M (SEQ ID NO: 41), PD-1 (SEQ ID NO: 42) и CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37) при концентрациях, указанных выше. Также можно использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 30, 31, 32, 26 и/или 27). Последовательности показаны в **таблицах 5 и 9**.

Таблица 9. Последовательности gRNA/целевые последовательности

Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
sgRNA TRAC	AGAGCAACAGUGCUGU GGCCguuuuagagcuagaaauag caaguuaaaaaggcuaguccguu aucaacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcUUUU (SEQ ID NO: 30)	A*G*A*GCAACAGUGCUGU GUGGCCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaggcuagucc guuaucuacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 40)
Спейсер sgRNA TRAC	AGAGCAACAGUGCUGU GGCC (SEQ ID NO: 98)	A*G*A*GCAACAGUGCUGU GUGGCC (SEQ ID NO: 108)
sgRNA β2M	GCUACUCUCUCUUUCUG GCCguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCCguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaggcuaguccgu uaucuacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U

	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 41)
Спейсер sgRNA β 2M	GCUACUCUCUCUUUCUG GCC (SEQ ID NO: 99)	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCC (SEQ ID NO: 109)
sgRNA PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACA CAUguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaauaaggcuaguccguuau саасиугааааагуггсассггугс ggugcUUUU (SEQ ID NO: 32)	C*U*G*CAGCUUCUCCA ACAUGuuuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaauaaggcuaguccgu uaucaасиугааааагуггсассгг gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 42)
Спейсер sgRNA PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACA CAU (SEQ ID NO: 100)	C*U*G*CAGCUUCUCCA ACAU (SEQ ID NO: 110)

Приблизительно через одну (1) неделю после электропорации клетки либо оставляли необработанными, либо обрабатывали РМА/иономицином в течение ночи. На следующий день клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии (см., например, Kalaitzidis D et al. J Clin Invest 2017; 127(4): 1405-1413) для оценивания уровней экспрессии TRAC, β 2M, PD-1 и CD70 на клеточной поверхности клеток из популяции отредактированных клеток. Использовали следующие первичные антитела (таблица 10).

Таблица 10. Антитела

Антител о	Клон	Флуоресцентны й краситель	№ по каталогу	Разведение	На 1
TCR	BW242/41 2	PE	130-091-236 (Miltenyi)	1:100	1 мкл
β 2M	2M2	PE-Cy7	316318 (Biolegend)	1:100	1 мкл
PD-1	EH12.2H7	PE	329906 (Biolegend)	1:100	1 мкл
CD70	113-16	FITC	355105 (Biolegend)	1:100	1 мкл

В **таблицах 11 и 12** показано высокоэффективное редактирование нескольких генов. Среди клеток с нокаутом по двух генах (2X KO; TRAC/ β 2M) у 83% жизнеспособных клеток отсутствовала экспрессия TCR и β 2M (**таблица 11; 3X KO (PD1)**). Среди клеток с нокаутом по трех генах у 70% жизнеспособных клеток отсутствовала экспрессия TCR, β 2M и PD-1 (**таблица 11**); и у 80% жизнеспособных клеток отсутствовала экспрессия TCR, β 2M и CD70, независимо от используемой gRNA CD70 (**таблица 12**). Среди клеток с нокаутом по четырем генам (4X KO) у 78% жизнеспособных клеток отсутствовала экспрессия TCR, β 2M, PD-1 и CD70 (**фиг. 1**).

Таблица 11. % жизнеспособных клеток с отсутствующей экспрессией в популяции клеток с 2КО и 3КО (PD1)

	TRAC KO	β 2M KO	PD1 KO	2 KO	3 KO (PD1)
2КО	98%	85%	н. д.	83%	н. д.

3 КО (PD1)	98%	73%	99%	н. д.	70%
------------	-----	-----	-----	-------	-----

Таблица 12. % жизнеспособных клеток с отсутствующей экспрессией в популяции клеток с ЗКО (CD70)

	TRAC КО	β 2М КО	КО CD70	ЗКО (CD70)
ЗКО (CD70) (Т7)	99%	79%	99%	80%
ЗКО (CD70) (Т8)	99%	82%	99%	80%

Чтобы оценить, влияет ли редактирование трех и четырех генов в Т-клетках на увеличение количества клеток, подсчитывали число клеток среди Т-клеток с редактированием двух, трех и четырех генов (неотредактированные Т-клетки использовали в качестве контроля) в течение двухнедельного периода после редактирования. Для каждого генотипа Т-клеток получали и высевали 5×10^6 клеток.

Как показано на **фиг. 2**, пролиферация (увеличение количества) клеток продолжалась на протяжении периода теста после электропорации. Подобную клеточную пролиферацию наблюдали среди Т-клеток с нокаутом по двум (β 2М-/TRAC-), трем (β 2М-/TRAC-/PD-1- или β 2М-/TRAC-/CD70-) и четырем генам (β 2М-/TRAC-/PD-1-/CD70), как показано числом жизнеспособных клеток. Эти данные указывают на то, что редактирование нескольких генов (до трех и четырех, с генами *CD70* и *PD-1*) не влияет на здоровое состояние Т-клеток, измеряемое по пролиферации Т-клеток.

Пример 3. Получение Т-клеток с CAR с отсутствующим CD70 и/или PD1

Получение Т-клеток с CAR к CD70 с несколькими нокаутами

В данном примере описывается получение аллогенных Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия гена *TCR*, гена β 2М, гена *CD70* и/или гена *PD1*, и экспрессируется химерный антигенный рецептор (CAR), нацеливающийся на CD70. Эти клетки обозначены как TCR-/ β 2М-/CD70-/CAR⁺ к CD70 или 3X КО (CD70) CD70 CAR⁺; TCR-/ β 2М-/PD1-/CAR⁺ к CD70 или 3X КО (PD1) CD70 CAR⁺; TCR-/ β 2М-/PD1-/CD70-/CAR⁺ к CD70 или 4X КО CD70 CAR⁺ в графических материалах.

Рекомбинантный аденоассоциированный аденовирусный вектор серотипа 6 (AAV6) (MOI 50, 000), содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 43 (содержащую донорную матрицу под SEQ ID NO: 44, кодирующая CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46) доставляли с помощью RNP Cas9:sgRNA (1 мкМ Cas9, 5 мкМ gRNA) в активированные аллогенные Т-клетки человека. Использовали следующие sgRNA: TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2М (SEQ ID NO: 41), CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37) и PD1 (SEQ ID NO: 42). Также можно использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 30, 31, 32, 26 и/или 27). Приблизительно через одну (1) неделю после электропорации клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии для оценивания уровней экспрессии TRAC, β 2М, CD70 и PD1 на клеточной поверхности клеток из популяции отредактированных клеток. Использовали следующие первичные антитела (**таблица 13**).

Таблица 13. Антитела

Антитело	Клон	Флуоресцентный краситель	№ по каталогу	Разведение
TCR	BW242/412	PE	130-091-236 (Miltenyi)	1:100
β 2M	2M2	PE-Cy7	316318 (Biolegend)	1:100
CD70	113-16	FITC	355105 (Biolegend)	1:100
PD-1	EH12.2H7	PE	329906 (Biolegend)	1:100

Анализ доли Т-клеток. Затем оценивали доли CD4⁺ и CD8⁺ клеток в популяции отредактированных Т-клеток посредством проточной цитометрии с использованием следующих антител (таблица 14).

Таблица 14. Антитела

Антитело	Клон	Флуоресцентный краситель	№ по каталогу	Разведение
CD4	RPA-T4	BV510	300545 (Biolegend)	1:100
CD8	SK1	BV605	344741 (Biolegend)	1:100

Высокой эффективности редактирования гена и экспрессии CAR достигали в популяции отредактированных Т-клеток с CAR к CD70. Кроме того, редактирование не оказывало отрицательного влияния на популяцию Т-клеток CD4/CD8. На **фиг. 3** показаны высокоэффективное редактирование гена и экспрессия CAR к CD70 в Т-клетке с CAR с нокаутом по трем генам. У более чем 55% жизнеспособных клеток отсутствовала экспрессия TCR, β 2M и CD70, а также экспрессировался CAR к CD70. На **фиг. 4** показано, что нормальные доли подгрупп CD4/CD8 Т-клеток поддерживались среди TRAC⁻/ β 2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 клеток, что указывает на то, что такие редактирования нескольких генов не влияют на биологию Т-клетки, как измерено с помощью доли подгрупп CD4/CD8 Т-клеток.

На **фиг. 5** показаны высокоэффективное редактирование гена и экспрессия CAR к CD70 в Т-клетке с CAR с нокаутом по четырем генам. У более чем 60% жизнеспособных клеток отсутствовала экспрессия TCR, β 2M, PD-1 и CD70, и экспрессировался CAR к CD70. На **фиг. 6** показано, что нормальные доли подгрупп CD4/CD8 Т-клеток сохранялись среди TRAC⁻/ β 2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 клеток, что указывает на то, что такое редактирование нескольких генов не влияет на биологию Т-клетки, как измерено с помощью доли подгруппы CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток.

Получение Т-клеток с CAR к ВСМА с несколькими нокаутами

В данном примере описывается получение аллогенных Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия гена *TCR*, гена *β 2M*, гена *PD-1* и/или гена *CD70*, а также экспрессируется химерный антигенный рецептор (CAR), нацеливающийся на антиген созревания В-клеток (BCMA).

Рекомбинантный аденоассоциированный аденовирусный вектор серотипа 6 (AAV6),

содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 54 (содержащую донорную матрицу под SEQ ID NO: 55, кодирующую CAR к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57) доставляли с помощью RNP Cas9:gRNA (1 мкМ Cas9 и 5 мкМ gRNA) в активированные аллогенные Т-клетки человека. Использовали следующие gRNA: TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), PD-1 (SEQ ID NO: 42) и CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37). Также можно использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 30, 31, 32, 26 и/или 27). Приблизительно через одну (1) неделю после электропорации клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии, как описывается выше для CAR⁺ к CD70 Т-клеток, со следующим отличием. Экспрессию CAR к ВСМА обнаруживали с использованием биотинилированного рекомбинантного человеческого ВСМА (ACROS, № по каталогу BC7-H82F0). Затем CAR⁺ к ВСМА клетки с нокаутом по двум и четырем генам характеризовали, как описывается в данном документе.

На фиг. 7А-7В показано высокоэффективное редактирование гена *TRAC*, гена β 2M, гена *CD70* и гена *PD-1*. На **фиг. 7С** показан высокий уровень экспрессии CAR⁺ к ВСМА клеток среди клеток с нокаутом по двум и четырем генам.

Получение Т-клеток с CAR к CD19 с несколькими нокаутами

Получали аллогенные Т-клетки человека, в которых экспрессируется химерный антигенный рецептор (CAR), нацеливающийся на CD19, и отсутствует экспрессия гена *TCR*, гена β 2M и необязательно гена *CD70*.

Для получения аллогенных Т-клеток активированные первичные Т-клетки человека электропорировали с помощью комплексов RNP Cas9:gRNA и инфицировали аденоассоциированными аденовирусными векторами (AAV), содержащими донорную матрицу CAR к CD19 с гомологией в отношении локуса *TRAC*. Рекомбинантный AAV серотипа 6 (AAV6), содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 155 (содержащую донорную матрицу под SEQ ID NO: 156, кодирующую CAR к CD19, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149) доставляли с помощью RNP Cas9:sgRNA (1 мкМ Cas9, 5 мкМ gRNA) в активированные Т-клетки человека. Следующие sgRNA использовали для нокаута соответствующих генов: *TRAC* (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), *CD70* (SEQ ID NO: 36). Также можно использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 30, 21 или 27). Приблизительно через одну (1) неделю после электропорации клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии, как описывается выше для CAR⁺ к CD70 Т-клеток, со следующим отличием. Экспрессию CAR к CD19 обнаруживали с использованием биотинилированного рекомбинантного человеческого CD19 (ACROBIOSYSTEMS INC; CD9-H825). Затем дефицитные по CD70 CAR⁺ к CD19 Т-клетки характеризовали, как описывается в данном документе.

Получение Т-клеток с CAR к CD33 с несколькими нокаутами

Получали аллогенные Т-клетки человека, в которых экспрессируется химерный антигенный рецептор (CAR), нацеливающийся на CD33, и отсутствует экспрессия гена Т-

клеточного рецептора (TCR) (с редактированием гена константной области TCR альфа (TRAC)), гена β 2-микроглобулина (β 2M) и необязательно гена CD70.

Для получения аллогенных Т-клеток активированные первичные Т-клетки человека электропорировали с помощью комплексов RNP Cas9:gRNA и инфицировали аденоассоциированными аденовирусными векторами (AAV), содержащими донорную матрицу CAR к CD33 с гомологией в отношении локуса TRAC. Рекомбинантный AAV серотипа 6 (AAV6), содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 87 (содержащую донорную матрицу под SEQ ID NO: 135, кодирующую CAR к CD33, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 139) доставляли с помощью RNP Cas9:sgRNA (1 мкМ Cas9, 5 мкМ gRNA) в активированные Т-клетки человека. Следующие sgRNA использовали для нокаута соответствующих генов: TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), CD70 (SEQ ID NO: 36). Также можно использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 30, 21 или 27).

Популяции TCR⁺ Т-клеток (без RNP) и TRAC⁻/ β 2M⁻ Т-клеток (дефицитных по TCR и β 2M Т-клеток без CAR) получали подобным образом для применения в качестве контролей. Приблизительно через одну (1) неделю после электропорации клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии, как описывается выше для CAR⁺ к CD70 Т-клеток, со следующим отличием. Экспрессию CAR к CD33 обнаруживали с использованием биотинилированного рекомбинантного человеческого CD33 (данные не показаны). Затем нокаутные по CD70 CAR⁺ к CD33 Т-клетки характеризовали, как описывается в данном документе.

Характеристика популяций CD4/CD8 клеток среди Т-клеток с CAR к CD33 с нокаутом по CD70

CD33 может экспрессироваться на Т-клетках с более высокими уровнями, наблюдаемыми на культивируемых CD4 клетках, чем на CD8 клетках. В процессе продуцирования Т-клеток с CAR к CD33 количество CD4 клеток существенно уменьшается из-за взаимного уничтожения. Как показано на **фиг. 8**, культуры Т-клеток с CAR к CD33 с интактным CD70 демонстрировали 97% снижение количества CD4⁺ клеток в течение 3-недельного периода культивирования, в то время как культуры клеток с нарушенным CD70 демонстрировали только 61% снижение количества в течение этого периода времени. Таким образом, нарушение гена CD70, по-видимому, снижает уровень взаимного уничтожения, наблюдаемого в культурах Т-клеток с CAR к CD33. Без ограничения теорией, этот эффект может происходить за счет иммуностимулирующей функции, которая может быть усилена взаимодействиями CD70/CD27, а генетическое нарушение CD70 приводит к более сбалансированным соотношениям CD4/CD8, которые могут быть более оптимальными в отношении терапевтического эффекта при злокачественной опухоли.

Пример 4. КО CD70 улучшает клеточную пролиферацию

Эффект КО CD70 в отношении клеточной пролиферации Т-клеток с CAR к CD33 *in vitro*

Для оценивания способности клеток увеличиваться в количестве в содержащей цитокин среде (IL-2+IL-7) использовали Т-клетки с CAR к CD33. В частности, в общей сложности 5×10^6 Т-клеток с CAR к CD33, включающих (TRAC-/B2M-) с нокаутом по двум генам или (TRAC-/B2M-/CD70-) с нокаутом по трем генам, получали, как описано в примере 3, высевали и обеспечивали их рост в 10-мл объеме содержащей цитокин среды. Через 1 неделю клетки подсчитывали. Затем 5×10^6 клеток из предыдущей культуры повторно помещали в 10-мл объем (свежей содержащей цитокин среды) и через 1 неделю подсчитывали общее количество клеток. Аллогенные Т-клетки с CAR к CD33, содержащие нарушение в гене CD70, увеличивали в количестве до более высоких уровней на первой и второй неделях пересева (фиг. 9). Эти данные показывают, что нокаут CD70 может привести к увеличению выхода клеток в культуре.

Эффект KO CD70 в отношении клеточной пролиферации Т-клеток с CAR к CD19 in vitro

Для дальнейшего оценивания способности клеток увеличиваться в количестве в содержащей цитокин среде (IL-2+IL-7) использовали Т-клетки с CAR к CD19. В частности, в общей сложности 5×10^6 Т-клеток с CAR к CD19, включающих (TRAC-/B2M-) с нокаутом по двум генам или (TRAC-/B2M-/CD70-) с нокаутом по трем генам, получали, как описано в примере 3, высевали и обеспечивали их рост в 10-мл объеме содержащей цитокин среды. Через 1 неделю клетки подсчитывали. Затем 5×10^6 клеток из предыдущей культуры повторно помещали в 10-мл объем (свежей содержащей цитокин среды) и через 1 неделю подсчитывали общее количество клеток. Аллогенные Т-клетки с CAR к CD19, содержащие нарушение в гене CD70, увеличивали в количестве до более высоких уровней на первой и второй неделях пересева по сравнению с контрольными клетками без нарушения гена CD70 (фиг. 10). Эти данные показывают, что нокаут CD70 может привести к увеличению выхода клеток в культуре.

Эффект KO CD70 в отношении управляемой цитокином пролиферации и апоптоза Т-клеток с CAR к BCMA in vitro

Управляемая цитокином пролиферация. Для оценки влияния нокаута CD70 и/или PD1 на пролиферацию клеток использовали Т-клетки с CAR к BCMA. Т-клетки с CAR к BCMA получали, как описано в примере 3. Получали следующие группы отредактированных Т-клеток:

- TRAC-/B2M-/CAR+ к BCMA (контроль; 2КО, BCMA CAR+),
- TRAC-/B2M-/CD70-/CAR+ к BCMA (3КО (CD70), BCMA CAR+),
- TRAC-/B2M-/PD1-/CAR+ к BCMA (3КО (PD1), BCMA CAR+),
- TRAC-/B2M-/CD70-/PD1-/CAR+ к BCMA (4КО, BCMA CAR+)

отредактированные клетки обогащали TRAC-/B2M- клетками путем магнитного истощения CD3+B2M+ клеток. Вкратце, клетки метили антителами к CD3 с биотином (Biolegend, № по каталогу 300404) и антителами к β 2M с биотином (Biolegend, № по каталогу 316308), каждое по 0,5 мкг на 1×10^6 клеток в 100-мкл объеме при 4°C в течение 15

минут, промывали и инкубировали с мечеными стрептавидином магнитными микрогранулами (Miltenyi Biotech, 130-048-101) в течение 15 минут при 4°C. Клетки повторно суспендировали в буфере и пропускали через колонки LS (Miltenyi Biotech, 130-042-401) в соответствии с протоколом производителя.

Чтобы определить эффект CD70 или PD1 в отношении пролиферации Т-клеток, управляемой IL-2/IL-7, отредактированные Т-клетки ($1E6$ клеток/мл) культивировали в ростовой среде (среда X-vivo (04-744, Lonza), дополненной 5% сыворотки АВ человека (HP1022, Valley Biomedical)), 50 нг/мл IL-2 (rhIL-2; 130-097-745, Miltenyi Biotech) и 10 нг/мл IL-7 (rhIL-7; Cellgenix 001410-050), на протяжении периода до четырех недель. В указанные дни клетки подсчитывали и пересевали в свежую среду при $1,5E6$ клеток/мл в соответствующие чашки для культивирования.

На **фиг. 11 и 12** показано, что нокаут CD70 улучшал управляемую IL-2/IL-7 пролиферацию Т-клеток с CAR к ВСМА *in vitro*, по сравнению с контролями с достаточным количеством CD70 (*m. e.* Т-клетками с CAR к ВСМА, содержащими эндогенный CD70). На **фиг. 11** также показано, что КО CD70 может улучшать здоровое состояние и способность к пролиферации Т-клеток с CAR к ВСМА, даже когда количество Т-клеток от этого донора, по-видимому, значительно снижается через 17 дней, когда ген CD70 остается интактным (как показано уменьшенным числом клеток донора 1 (**фиг. 11**) по сравнению с донором 2 (**фиг. 12**)). Это свойство поддержания здорового состояния Т-клеток (обеспечиваемое КО гена CD70) широко применимо ко многим аспектам разработки Т-клеток с CAR, в том числе к увеличению количества в ходе производства, повышению выхода и стабильности, сохранению истощенных/нездоровых Т-клеток, что обеспечивает снижение доз для пациентов и более устойчивые ответы, комбинацию с другими КО, которые могут быть более вредными для здорового состояния Т-клеток, но имеют другие преимущества, такие как преодоление подавления активности Т-клеток (например, КО PD1). Как показано на **фиг. 11 и 12**, делеция гена PD1 сама по себе не показывает преимущества в отношении увеличения количества Т-клеток с CAR, но в сочетании с КО CD70 демонстрирует синергические эффекты.

Апоптоз. Эффект КО CD70 в отношении апоптотической клеточной смерти Т-клеток с CAR+ к ВСМА после воздействия антигена оценивали в анализе повторного воздействия антигена. Вкратце, для достижения воздействия антигена Т-клетки с CAR+ к ВСМА подвергали воздействию прикрепленного к планшету рекомбинантного белка ВСМА. Планшеты с прикрепленным антигеном получали путем покрытия 24-луночных планшетов рекомбинантным белком ВСМА в 1х PBS (1 мкг/мл; биотинилированный человеческий белок ВСМА, ACRO Biosystems) в течение ночи при 4°C, а затем смывания несвязавшегося антигена. После промывания планшеты со связанным антигеном затем использовали для воздействия на Т-клетки с CAR+ к ВСМА либо с нокаутом CD70, либо без него. 2X КО (TRAC-/B2M-) CAR+ к ВСМА Т-клетки и 3X КО (TRAC-/B2M-/CD70-) CAR+ к ВСМА Т-клетки (1×10^6 клеток/мл) подвергали воздействию связанного с планшетом рекомбинантного белка ВСМА (1 мкг/мл) в течение 24 часов в ростовой среде

(среде X-vivo (04-744, Lonza) с 5% человеческой сывороткой крови АВ (HP1022, Valley Biomedical)), дополненной IL-2 (rhIL-2; 130-097-745, Miltenyi Biotec). Затем клетки промывали, подсчитывали и подвергали повторному воздействию (1×10^6 клеток/мл) свежего связанного с планшетом антигена каждые 24 часа, всего три последовательных повторных воздействия (24 часа, 48 часов и 72 часа). В конце каждого повторного воздействия аликвоту клеток промывали и окрашивали аннексином V, конъюгированным с флуорохромом, вместе с йодидом пропидия в связывающем аннексин V буфере (BioLegend) в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем клетки промывали и повторно суспендировали в связывающем аннексин V буфере для анализа посредством проточной цитометрии. Клетки подсчитывали в каждый момент времени и вычисляли количество клеток на мл. Для расчета кратности увеличения количества в каждый момент времени начальную кратность увеличения количества в момент времени 0 принимали за 1. Кратность увеличения количества для всех других моментов времени рассчитывали путем умножения количества клеток на мл в каждый момент времени на кратность увеличения количества на мл в предыдущий момент времени. Например, кратность увеличения количества через 72 часа рассчитывали путем умножения количества клеток на мл через 72 часа на кратность увеличения количества на мл через 48 часов.

На **фиг. 13** показано, что делеция CD70 (KO CD70) сохраняет T-клетки с CAR+ к ВСМА от апоптоза, о чем свидетельствует уменьшение процента апоптотических клеток после второго (48 часов) и третьего (72 часа) повторных воздействий. Кроме того, отсутствие экспрессии CD70 в T-клетках с CAR+ к ВСМА неожиданно усиливает интенсивность увеличения количества T-клеток с CAR+ к ВСМА в ответ на воздействие антигеном (**фиг. 14**).

Эффект KO CD70 в отношении клеточной пролиферации T-клеток с CAR к CD70 in vitro

Чтобы дополнительно оценить влияние нарушения гена CD70 на T-клетки с CAR, получали T-клетки с CAR к CD70, как описано в примере 3. В частности, 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) CAR к CD70 T-клетки получали с использованием двух разных gRNA (T7 (SEQ ID NO: 36) и T8 (SEQ ID NO: 37)). После электропорации оценивали увеличение количества клеток, как описано в примере 2, путем подсчета жизнеспособных клеток. На **фиг. 15** показано, что TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 T-клетки с нокаутом по трем генам, полученные либо с T7, либо с T8 gRNA, характеризовались большим увеличением количества клеток по сравнению с TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 T-клетками с нокаутом по двум генам. Эти данные позволяют предположить, что нокаут гена CD70 дает преимущество T-клеткам с CAR⁺ к CD70 в отношении клеточной пролиферации.

Увеличение количества клеток также оценивали среди TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 T-клеток с нокаутом по четырем генам. Эти клетки характеризовались большим увеличением количества по сравнению с TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 T-клетками с нокаутом по трем генам и TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 T-клетками с нокаутом по двум генам (**фиг. 16**).

Пример 5. KO CD70 повышает выносливость и эффективность Т-клеток с CAR in vitro

Клеточная функция уничтожения Т-клеток с CAR к CD19 с нокаутом по CD70

После получения отредактированных Т-клеток с CAR к CD19, как описано в примере 3, проверяли функциональную активность Т-клеток с CAR с использованием анализа цитотоксичности на основе проточной цитометрии. Т-клетки с CAR к CD19 (TRAC- β 2M-/CD19 CAR+ и TRAC- β 2M-/CD70-/CD19 CAR+) совместно культивировали с одной из двух линий раковых клеток, экспрессирующих CD19 (целевых клеток): Nalm6 (ATCC crl3273) или Raji (ATCC ccl-86). Целевые клетки метили с помощью 5 мкМ efluor670 (eBiosciences), промывали и инкубировали в совместных культурах с TRAC- β 2M-/CAR+ к CD19 или TRAC- β 2M-/CD70-/CAR+ к CD19 при варьирующих соотношениях (0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1:1 Т-клетки:целевые клетки). Целевые клетки высевали по 50000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном. Совместную культуру инкубировали на протяжении ночи. После инкубации лунки промывали и среду заменяли 200 мкл среды, содержащей 5 мг/мл DAPI (Molecular Probes) в разведении 1:500. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл гранул CountBright (Life Technologies), и культуры клеток анализировали на жизнеспособность клеток посредством проточной цитометрии (т. е. жизнеспособные клетки были отрицательными по окрашиванию DAPI).

Процент клеточного лизиса целевых клеток (например: клеток Nalm6 или Raji) затем определяли с использованием следующей формулы:

процент клеточного лизиса = $(1 - ((\text{общее число целевых клеток в тестируемом образце}) \div (\text{общее число целевых клеток в контрольном образце})) \times 100$;

где тестируемый образец представлял собой целевые клетки (например: клетки Nalm6 или Raji), культивируемые совместно с 1) TRAC- β 2M-/CD19 CAR+ Т-клетками или 2) TRAC- β 2M-/CD70-/CD19 CAR+ Т-клетками; и

контрольный образец представлял собой целевые клетки отдельно, которые не культивировали совместно.

Нарушение гена CD70 приводило к усилению цитолитической активности Т-клеток с CAR к CD19 против линии клеток Raji при низких соотношениях CAR-Т и цели (**фиг. 17**, нижняя панель). Нарушение CD70 не усиливало активность Т-клеток с CAR к CD19 против линии клеток Nalm6 (**фиг. 17**, верхняя панель). Следует отметить, что клеточная линия Nalm6 относительно легче лизируется этими Т-клетками с CAR (> 80% лизируется при соотношении Т-клеток с CAR и цели 0,1:1 для Nalm6 против 0% для Raji при этом соотношении для клеток дикого типа), что, вероятно, объясняет отсутствие полученной в результате повышенной эффективности из-за нарушения CD70 в этом анализе против клеток Nalm6. Повышенная активность, связанная с потерей CD70, против линии клеток Raji, указывает на то, что в воздействующих на опухоль условиях, особенно когда соотношения Т-клеток с CAR и опухоли низкие, потеря CD70 может иметь существенное преимущество для Т-клеток с CAR при уничтожении опухолевых клеток.

Клеточная функция уничтожения Т-клеток с CAR к CD33 с нокаутом по CD70

После получения отредактированных Т-клеток с CAR к CD33, как описано в примере 3, проверяли функциональную активность Т-клеток с CAR с использованием анализа цитотоксичности на основе проточной цитометрии. Т-клетки с CAR к CD33 (TRAC- β 2M-/CD33 CAR+ и TRAC- β 2M-/CD70-/CD33 CAR+) или контрольные Т-клетки (без RNP) совместно культивировали с линией раковых клеток MV4-11 (ATCC CRL-9591), экспрессирующих CD33. Целевые клетки метили с помощью 5 мкМ efluor670 (eBiosciences), промывали и инкубировали в совместных культурах с TRAC-/B2M-/CAR к CD33+, TRAC- β 2M-/CD70-/CAR+ к CD33 или контролями при варьирующих соотношениях (0,01:1, 0,03:1, 0,06:1, 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1 или 1:1 Т-клетки:целевые клетки). Целевые клетки высевали по 50000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном. Совместную культуру инкубировали на протяжении ночи. Через 48 часов лунки промывали и среду заменяли 200 мкл среды, содержащей 5 мг/мл DAPI (Molecular Probes) в разведении 1:500. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл гранул CountBright (Life Technologies), и культуры клеток анализировали на жизнеспособность клеток посредством проточной цитометрии (т. е. жизнеспособные клетки были отрицательными по окрашиванию DAPI).

Процент клеточного лизиса целевых клеток (например: MV4-11) затем определяли с использованием следующей формулы:

процент клеточного лизиса = $(1 - ((\text{общее число целевых клеток в тестируемом образце}) \div (\text{общее число целевых клеток в контрольном образце})) \times 100$;

где тестируемый образец представлял собой целевые клетки (например: клетки MV4-11), культивируемые совместно с 1) TRAC-/B2M-/CD33 CAR+ Т-клетками или 2) TRAC-/B2M-/CD70-/CD33 CAR+ Т-клетками, и

контрольный образец представлял собой целевые клетки отдельно, которые не культивировали совместно.

Хотя обе популяции Т-клеток с CAR к CD33 эффективно уничтожали клетки MV4-11, достигая почти 100% уничтожения клеток при соотношениях 0,5 Т-клетка с CAR: клетка MV4-11, TRAC-/B2M-/CD70-/CD33 CAR+ Т-клетки демонстрировали более высокий уровень уничтожения клеток при более низких соотношениях Т-клеток с CAR и раковых клеток (**фиг. 18**). Эти данные показывают, что аллогенные Т-клетки с CAR к CD33 с дополнительным нокаутом CD70 являются более эффективными при более низких соотношениях Т-клетки с CAR и целевой клетки.

Клеточная функция уничтожения Т-клеток с CAR к CD70 с нокаутом по CD70

Анализ клеточного уничтожения использовали для оценивания способности TRAC- β 2M-/CD70-/CAR+ к CD70 клеток и TRAC- β 2M-/PD-1-/CD70-/CAR+ к CD70 клеток уничтожать линию полученных из почечноклеточной карциномы (RCC) CD70+ адгерентных клеток (клеток A498). Адгерентные клетки высевали в 96-луночные планшеты при 50000 клеток на лунку и оставляли на протяжении ночи при 37°C. На следующий день добавляли отредактированные Т-клетки с CAR к CD70 в лунки, содержащие целевые клетки при указанных соотношениях. После указанного инкубационного периода Т-клетки

с CAR удаляли из культуры посредством аспирации и в каждую лунку планшета добавляли 100 мкл Cell titer-Glo (Promega) для оценки количества оставшихся жизнеспособных клеток. Количество света, испускаемого на каждую лунку, затем количественно определяли с использованием планшет-ридера. Клетки характеризовались эффективным уничтожением полученных из RCC клеток после 24-часовой совместной инкубации (фиг. 19). Т-клетки с CAR к CD70 демонстрировали более высокую эффективность при нокауте CD70, что четко видно при низких соотношениях Т-клетка: A498 (1:1 и 0,5:1), при этом клеточный лизис остается выше 90% для TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70, в то время как клеточный лизис падает ниже 90% для TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70. Это позволяет предположить, что нокаут гена CD70 обеспечивает более высокую эффективность уничтожения клеток Т-клетками с CAR⁺ к CD70.

Пример 6. Повторное воздействие дефицитных по CD70 Т-клеток с CAR *in vitro*
Нокаут CD70 улучшает уничтожение Т-клетками с CAR⁺ к CD33 при серийном повторном воздействии

Для оценивания способности клеток увеличивать количество после воздействия и повторного воздействия экспрессирующих антиген клеток (например, целевых клеток) получали Т-клетки с CAR к CD33, как описано в примере 3, и использовали. В частности, всего 5×10^6 Т-клеток высевали в присутствии 5×10^6 облученных целевых клеток (MV-4-11) и обеспечивали их рост в 10-мл объеме. Через 1 неделю клетки подсчитывали, затем 5×10^6 клеток из предыдущей культуры пересевали в 10-мл объем вместе со свежей аликвотой 5×10^6 облученных целевых клеток, а через 1 неделю подсчитывали общее количество клеток. Процесс повторяли, как указано, при этом каждое повторное воздействие начинали с 5×10^6 клеток. Подсчитывали число жизнеспособных клеток, как описано в примере 2. Аллогенные Т-клетки с CAR к CD33, содержащие нарушение в гене CD70, увеличивали в количестве до более высоких уровней на второй неделе после 2 воздействий клетками MV-4-11 (фиг. 20). Эти данные показывают, что CD70 может ограничивать увеличение количества Т-клеток в присутствии клеток, экспрессирующих антиген, и его потеря может привести к большему увеличению количества клеток после стимуляции антигеном.

Нокаут CD70 улучшает уничтожение Т-клетками с CAR к CD19⁺ при серийном повторном воздействии

Для дальнейшего оценивания способности клеток увеличивать количество после воздействия и повторного воздействия экспрессирующих антиген клеток (например, целевых клеток) получали Т-клетки с CAR к CD19, как описано в примере 3, и использовали. В частности, всего 5×10^6 Т-клеток высевали в присутствии 5×10^6 облученных целевых клеток (Nalm6) и обеспечивали их рост в 10-мл объеме. Через 1 неделю клетки подсчитывали, затем 5×10^6 клеток из предыдущей культуры пересевали в 10-мл объем вместе со свежей аликвотой 5×10^6 облученных целевых клеток, а через 1 неделю подсчитывали общее количество клеток. Процесс повторяли, как указано, при этом каждое повторное воздействие начинали с 5×10^6 клеток. Подсчитывали число жизнеспособных клеток, как описано в примере 2. Аллогенные Т-клетки с CAR к CD19,

содержащие нарушение в гене CD70, увеличивали в количестве до подобных количеств во время первых 2 воздействий. Однако при трех воздействиях аллогенные Т-клетки с CAR к CD19, содержащие нарушение в гене CD70, увеличивали в количестве до более высокого уровня при третьем воздействии клеток Nalm6 (**фиг. 21**). Эти данные показывают, что присутствие CD70 может ограничивать увеличение количества Т-клеток в присутствии клеток, экспрессирующих антиген, и его потеря может привести к большему увеличению количества клеток после повторной стимуляции антигеном.

Нокаут CD70 или PD-1 плюс CD70 сохраняет способность Т-клеток с CAR⁺ к CD70 к уничтожению при серийном повторном воздействии

Т-клетки с CAR⁺ к CD70, полученные, как указано выше, подвергали серийному повторному воздействию линии CD70⁺ клеток рака почки A498 и оценивали их способность уничтожать линии CD70⁺ клеток рака почки A498 или ACHN.

A498 клетки высевали в колбу T25 и смешивали при соотношении 2:1 (Т-клетка и A498) с 10×10^6 CAR⁺ к CD70 Т-клеток, содержащих или две (TRAC⁻/β2M⁻), три (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻), или (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), или четыре (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) отредактированные gRNA.

Через два или три дня после каждого воздействия клетки подсчитывали, промывали, повторно суспендировали в свежей среде для Т-клеток и на следующий день подвергали повторному воздействию с тем же соотношением двух Т-клеток с CAR⁺ к CD70 на одну клетку A498 (2:1, CAR⁺ Т:цель). Воздействие на Т-клетки с CAR⁺ к CD70 CD70⁺ клетками A498 повторяли 13 раз. Через три-четыре дня после каждого воздействия на клетки A498 (и до следующего повторного воздействия) отбирали аликвоты культуры и анализировали по способности Т-клеток с CAR уничтожать целевые клетки A498 или ACHN при соотношении 2:1 (Т-клетка с CAR: целевая клетка). Уничтожение клеток измеряли с использованием Cell titer-glo (Promega). До первого воздействия с помощью A498 каждые из CAR⁺ к CD70 Т-клеток с 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻), 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70), 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻) и 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) характеризовались уничтожением целевых клеток A498, приближающимся к 100%. Однако при девятом воздействии 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) и 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻) CAR⁺ к CD70 Т-клетки индуцировали уничтожение целевых клеток A498 ниже 40%, тогда как 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70) и 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) CAR⁺ к CD70 Т-клетки характеризовались уничтожением целевых клеток выше 60% (**фиг. 22А**). Уничтожение целевых клеток 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70) и 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) CAR⁺ к CD70 Т-клетками сохранялось выше 60% даже после 13 повторных воздействий клеток A498, что демонстрирует то, что эти CAR⁺ Т-клетки были устойчивыми к истощению.

Т-клетки с CAR к CD70 также оценивали по их способности уничтожать клетки ACHN при соотношении 2:1 (Т-клетка и ACHN) после серийного повторного воздействия клеток карциномы почки A498 (**фиг. 22В**). До первого воздействия с помощью A498 TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по двум генам, TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам, TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по

трем генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по четырем генам характеризовались эффективностью уничтожения клеток выше 62%, 47%, 73% и 81% соответственно.

После пятого воздействия TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по четырем генам все еще эффективно уничтожали свыше 55% клеток ACHN при соотношении 2:1 (Т-клетка к ACHN), тогда как способность TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клеток с нокаутом по двум генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам уничтожать клетки ACHN падала ниже 11%. Эта тенденция сохранялась, при этом TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по двум генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам не смогли выжить после 10 повторных воздействий. Напротив, TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по четырем генам продолжали увеличиваться в количестве в культуре и уничтожали более чем 30% клеток ACHN при соотношении 2:1 (Т-клетка к ACHN) после двух повторных воздействий.

Данные показывают, что 4х КО, CD70 CAR⁺ Т-клетки и 3х КО (CD70), CD70 CAR⁺ клетки являются более эффективными, чем 2Х КО, CD70 CAR⁺ Т-клетки или 3Х КО (PD1), CD70 CAR⁺ Т-клетки. Кроме того, 3Х (CD70) КО и 4Х КО предотвращает истощение Т-клеток.

После 5 повторных воздействий клетки оценивали по их способности уничтожать раковые клетки. Неожиданно, 3КО и 4КО CAR⁺ к CD70 Т-клетки оставались высокоэффективными в уничтожении раковых клеток (**фиг. 23А**) даже после нескольких воздействий раковых клеток. Эффект уничтожения клеток Т-клетками с CAR⁺ к CD70 в отношении клеток ACHN воспроизводится даже при пониженном соотношении эффекторных клеток к целевым клеткам 1:1, 0,5:1 и 0,25:1 (**фиг. 23А**).

Чтобы гарантировать долгосрочную пользу от лечения Т-клетками с CAR, Т-клетки с CAR должны быть способны идентифицировать и уничтожать свои целевые клетки в течение длительного периода времени, чтобы исключить возможность ускользания раковых клеток от опосредованного Т-клетками с CAR уничтожения клеток. Анализ повторного воздействия *in vitro* имитирует повторяющееся столкновение Т-клеток с CAR с целевыми клетками в течение нескольких циклов активации Т-клеток с CAR. Эти данные демонстрируют превосходство TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клеток с нокаутом по трем генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клеток с нокаутом по четырем генам в выживании нескольких воздействий клетками рака почки без демонстрации снижения их способности уничтожения целевых клеток по сравнению с TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетками с нокаутом по двум генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетками с нокаутом по трем генам.

Маркеры истощения и активации также измеряли посредством проточной цитометрии в Т-клетках с CAR⁺ к CD70 после повторного воздействия. После 8 воздействий Т-клетки с нокаутом по трем генам (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) и нокаутом по

четырем генам (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) KO CAR+ к CD70 характеризовались более высоким уровнем экспрессии маркера активации LAG3, чем Т-клетки с нокаутом по двум генам (TRAC-/β2M-) и с нокаутом по четырем генам (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) KO CAR+ к CD70, что соответствует их уровню высокой активности уничтожения клеток. Наблюдали, что экспрессия PD1 была ниже в (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетках с нокаутом по трем генам (подобно Т-клеткам (TRAC-/β2M-/PD1-) с нокаутом по трем генам и Т-клеткам (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) KO CAR+ к CD70 с нокаутом по четырем генам) по сравнению с (TRAC-/β2M-) CAR+ к CD70 Т-клетками с нокаутом по двум генам, что указывает на то, что нокаут CD70 влияет на подавление экспрессии маркера истощения PD1 в Т-клетках с CAR+ к CD70 (**фиг. 23В**).

Нокаут PD-1 и CD70 сохраняет способность Т-клеток с CAR+ к ВСМА к уничтожению при серийном повторном воздействии

На Т-клетки с CAR+ к ВСМА, полученные, как описано в примере 3, серийно повторно воздействовали и оценивали их способность уничтожать ВСМА+ клетки из линии клеток множественной миеломы MM.1S (ATCC CRL-2974). Способность секретировать цитокины при серийной активации Т-клеток посредством связывания CAR также измеряли после каждого повторного воздействия. Клетки MM.1S метили с помощью 5 мкМ eFlour670 и смешивали при соотношении 2:1 (MM.1S к Т-клетке) в 6-луночной чашке для тканевой культуры с 1×10^6 CAR+ к ВСМА Т-клеток, содержащих либо два (TRAC-/β2M-), либо четыре ((TRAC-/β2M-/PD-1-/CD70-) отредактированные gRNA. Через день после воздействия на клетки MM.1S отбирали аликвоту культуры и анализировали как на уничтожение целевых клеток, так и на секрецию IFN-γ Т-клетками с CAR. Для измерения высвобождения цитокина Т-клетки и целевые клетки совместно инкубировали в течение 24 часов в указанных соотношениях. Среду с надосадочной жидкостью собирали для использования в ELISA на предмет IL-2 или IFN γ (RD Systems) на новом планшете, следуя инструкциям производителя (RD Systems). Для количественного определения уничтожения клеток клетки промывали, среду заменяли на 200 мл среды, содержащей 5 мг/мл DAPI при разведении 1:500 (Molecular Probes) (для подсчета мертвых/погибающих клеток). Наконец, в каждую лунку добавляли 25 мл гранул CountBright (Life Technologies). Затем клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии.

1) Клетки/мл = ((количество событий с живыми целевыми клетками)/(количество событий с гранулами)) x ((заданное количество гранул из партии (гранулы/50 мкл))/(объем образца))

2) Общее количество целевых клеток рассчитывали путем умножения клетки/мл на общий объем клеток.

3) Процент клеточного лизиса затем рассчитывали с помощью следующего уравнения:

% клеточного лизиса = $(1 - ((\text{общее количество целевых клеток в тестовом образце}) / (\text{общее количество целевых клеток в контрольном образце}))) \times 100$.

Через два или три дня после каждого воздействия клетки подсчитывали,

промывали, повторно суспендировали в свежей среде для Т-клеток и подвергали повторному воздействию с тем же соотношением одной Т-клетки с CAR⁺ к ВСМА на две меченных eFlour670 клетки MM.1S. Воздействие на Т-клетки с CAR⁺ к ВСМА ВСМА⁺ клетками MM.1S повторяли 10 раз подряд. Перед воздействием клетками MM.1S совместная инкубация либо 2X KO (TRAC-/B2M-), либо 4X KO (TRAC-/B2M-/CD70-/PD-1-) CAR⁺ к ВСМА Т-клеток с клетками MM.1S приводила к полному уничтожению целевых клеток. Кроме того, продуцирование IFN γ и 2X KO, и 4X KO CAR⁺ к ВСМА Т-клетками было подобным. Однако после 4-го повторного воздействия клетками MM.1S уничтожение целевых клеток и продуцирование IFN γ 2X KO CAR⁺ к ВСМА Т-клетками снизились по сравнению с таковыми, индуцируемыми 4X KO CAR⁺ к ВСМА Т-клетками. При 8-ом повторном воздействии уничтожение целевых клеток составляло только приблизительно 20% для 2X KO CAR⁺ к ВСМА Т-клеток, в то время как и продуцирование IFN γ , и уничтожение целевых клеток 4X KO CAR⁺ к ВСМА Т-клетками оставались сопоставимыми с таковыми, наблюдавшимися до любого воздействия клеток MM.1S (фиг. 24А-24В). Кроме того, Т-клетки с CAR к ВСМА с нокаутом по четырем генам демонстрировали более высокую степень пролиферации в ответ на воздействие целевых клеток (фиг. 24С).

Чтобы гарантировать долгосрочную пользу от лечения Т-клетками с CAR, Т-клетки с CAR должны быть способны идентифицировать и уничтожать свои целевые клетки в течение длительного периода времени, чтобы исключить возможность ускользания раковых клеток от опосредованного Т-клетками с CAR уничтожения клеток. Анализ повторного воздействия *in vitro* имитирует повторяющееся столкновение Т-клеток с CAR с целевыми клетками в течение нескольких циклов активации Т-клеток с CAR, тем самым демонстрируя превосходство 4X нокаутных TRAC-/ β 2M-/PD-1-/CD70-/CAR⁺ к ВСМА Т-клеток в выдерживании нескольких воздействий целевых клеток без демонстрации снижения способности уничтожения клеток по сравнению с TRAC-/ β 2M-/CAR⁺ к ВСМА Т-клетками с нокаутом по двум генам (фиг. 24А-24С).

Пример 7. КО CD70 преодолевает воздействие избытка ингибиторных молекул
Сравнение эффектов Т-клеток с CAR⁺ к CD70 с множественным нокаутом в отношении клеток почечной карциномы A498-PD-L1

Анализ клеточного уничтожения Способность клеток с CAR⁺ к CD70 с несколькими отредактированными генами уничтожать клетки почечной карциномы A498, сверхэкспрессирующие PD-L1, определяли с использованием анализа клеточного уничтожения, описываемого в данном документе. Для получения клеток, сверхэкспрессирующих PD-L1 (CD274), клетки A498 инфицировали лентивирусом, кодирующим cDNA PD-L1 и ген устойчивости к пурамицину (Genescoreia). После отбора с помощью пурамицина клетки окрашивали антителом к PD-L1 для оценивания экспрессии PD-L1. Клетки A498, экспрессирующие PD-L1, обозначаются как A498-PD-L1, и их использовали в описанных функциональных анализах.

TRAC-/ β 2M-/CAR⁺ к CD70 (2X KO, CD70 CAR⁺), TRAC-/ β 2M-/PD-1-/CAR⁺ к CD70

(3X KO (PD-1), CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (4X KO, CD70 CAR⁺) Т-клетки инкубировали с клетками A498-PD-L1 при соотношении Т-клетка с CAR:целевые клетки A498-PD-L1 2:1 (фиг. 25A), 1:1 (фиг. 25B) или 0,5:1 (фиг. 25C). Нокаутные по CD70 клетки характеризовались эффективным уничтожением полученных из RCC клеток после 24-часовой совместной инкубации (фиг. 25A-25C). Клетки с нокаутом PD1 отдельно не лизировали клетки эффективно при наличии сверхэкспрессии PD-L1. Однако нокаут CD70 был способен сохранить нокаут PD1, и усиленный клеточный лизис наблюдали среди клеток CART с KO CD70 и KO PD1. Эти данные демонстрируют, что потеря CD70 на поверхности этих Т-клеток с CAR усиливает их функцию даже в присутствии экспрессируемых опухолевыми клетками молекул с высокой степенью иммуносупрессии, таких как PD-L1.

Анализ высвобождения цитокина. Анализ высвобождения цитокина проводили, как описано в данном документе. Способность CAR⁺ к CD70 Т-клеток с нокаутом по двум, трем и четырем генам продуцировать IL-2 и IFN-g при совместном культивировании в присутствии клеток A948-PD-L1 после 24-часовой совместной инкубации при соотношении (CAR Т-клетка:целевая клетка A948-PD-L1) 1:1 оценивали с помощью анализа ELISA. Измеряли уровень IFN и IL-2 из надосадочных жидкостей совместных клеточных культур. TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по четырем генам секретировали наивысшие уровни IFN-g (фиг. 26A) и IL-2 (фиг. 26B) при культивировании с клетками A948-PD-L1. Эти данные демонстрируют, что нокаут CD70 усиливает секрецию Т-клетками с CAR цитокинов даже в присутствии экспрессируемых опухолевыми клетками молекул с высокой степенью иммуносупрессии, таких как PD-L1. Нокаут CD70 вместе с нокаутом PD-1 в Т-клетках с CAR дополнительно усиливает эффект. Без ограничения теорией, полагают, что нокаут CD70 в Т-клетках с CAR⁺ к CD70 может сохранить вредные фенотипы с нокаутом других клеток (например: PD1). Эти данные демонстрируют, что нокаут CD70 в Т-клетках с CAR усиливает уничтожение целевых клеток и функцию Т-клеток с CAR в контексте высокой степени иммуносупрессии.

Пример 8. Нокаут CD70 повышает эффективность *in vivo*

Эффективность нокаута CD70 и PD1 в Т-клетках с CAR к CD70: модель подкожного опухолевого ксенотрансплантата почечно-клеточной карциномы у мышей NOG

Обработка на модели небольшой опухоли

Способность Т-клеток, экспрессирующих CD70 CAR, элиминировать клетки карциномы почки, которые экспрессируют высокие уровни CD70, оценивали *in vivo* с использованием модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата почечно-клеточной карциномы (A498) на мышах.

CRISPR/Cas9 и AAV6 применяли, как описано выше (см., например, пример 3), для получения Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия TCR, β2M, CD70 и/или PD1 с сопутствующей экспрессией из локуса TRAC с применением конструкции CAR,

нацеливающейся на CD70 (SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46). В этом примере активированные Т-клетки подвергали первой электропорации с помощью 2, 3 или 4 различных комплексов RNP Cas9:sgRNA, содержащих sgRNA, нацеливающиеся на TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), PD1 (SEQ ID NO: 42) и CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37). Двухнитевой разрыв ДНК в локусе TRAC подвергали восстановлению путем репарации, направляемой гомологией, с помощью доставляемой AAV6 ДНК-матрицы, включающей донорную матрицу (SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45) (кодирующая CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45), содержащей правое и левое плечи гомологии к локусу TRAC, фланкирующие кассету химерного антигенного рецептора (-/+ регуляторные элементы для экспрессии генов).

Полученные в результате модифицированные Т-клетки представляют собой 2Х КО (TRAC-/ β 2M-), 3Х КО (TRAC-/ β 2M-/PD1- или TRAC-/ β 2M-/CD70-) и 4Х КО (TRAC-/ β 2M-/PD1-/CD70-) CAR+ к CD70 (с костимуляторным доменом 41BB) Т-клетки. Способность этих Т-клеток с CAR+ к CD70 снижать тяжесть заболевания, вызванного линией CD70+ клеток почечной карциномы, оценивали на мышах NOG с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скотсдейл, Аризона). Вкратце, 12 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 5×10^6 клеток почечной карциномы A498/мышь в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли 25-75 мм³ (целевой ~50 мм³) мышей далее делили на 5 групп обработки, как показано в **таблице 15**. В день 1 группы обработки 2-5 получали однократную внутривенную дозу 200 мкл Т-клеток с CAR+ к CD70 согласно **таблице 15**.

Таблица 15. Группы обработки

Группа	CAR-Т	Клетки А498	Обработка Т-клетками (<i>i.v.</i>)	N
1	Отсутствует	5×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5
2	2Х КО, CAR+ к CD70 Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5
3	3Х КО (PD1), CAR+ к CD70 Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5
4	3Х КО (CD70), CAR+ к CD70 Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5
5	4Х КО (CD70, PD1), CAR+ к CD70 Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю от дня начала обработки. Ко дню 5

обработка всеми четырьмя типами Т-клеток с CAR к CD70 начала показывать уменьшение объема опухоли, а ко дню 22 все четыре типа Т-клеток с CAR к CD70 полностью элиминировали CD70+ опухоли рака почки в течение периода исследования до дня 91 (фиг. 27А). Эти данные показывают, что все четыре типа Т-клеток с CAR к CD70 могут обеспечивать регрессию CD70+ опухолей рака почки *in vivo*.

Для тестирования активности Т-клеток с CAR к CD70 после повторного воздействия выжившим мышам инокулировали подкожно в заднюю часть левого бока 5×10^6 клеток почечной карциномы А498/мышь в день 25 (таблица 16). Устойчивую эффективность оценивали со дня 46 и далее. Результаты показаны на фиг. 27В. В день 56 у 5 из 5 мышей, получавших обработку 2Х, CD70 CAR+ Т-клетками, наблюдали возобновление роста опухоли после повторного воздействия, у 4 из 5 мышей, получавших обработку 3Х (PD1), CD70 CAR+ Т-клетками, наблюдали возобновление роста опухолей после повторного воздействия, у 2 из 5 мышей, получавших обработку 4Х (CD70, PD1), CD70 CAR+ Т-клетками, наблюдали возобновление роста опухолей после повторного воздействия, в то время как ни у одной из мышей, получавших обработку 3Х (CD70), CD70 CAR+ Т-клетками, не наблюдали возобновление роста опухолей после повторного воздействия. Эта тенденция сохранялась, в день 70 у 4 из 5 мышей, получавших обработку 3Х (PD1), CD70 CAR+ Т-клетками, наблюдали возобновление роста опухолей после повторного воздействия, у 4 из 5 мышей, получавших обработку 4Х (CD70, PD1), CD70 CAR+ Т-клетками, наблюдали возобновление роста опухолей после повторного воздействия, в то время как только у одной из мышей, получавших обработку 3Х (CD70), CD70 CAR+ Т-клетками, наблюдали возобновление роста небольшой опухоли, который начал проявляться через 34 дня после повторного воздействия. Даже ко дню 91 только у 1 из 5 мышей, получавших обработку 3Х (CD70), CD70 CAR+ Т-клетками, начинали наблюдать возобновление роста опухоли, что указывает на то, что TRAC β 2M/CD70-/CAR+ к CD70 Т-клетки сохраняют более высокую эффективность *in vivo* после повторного воздействия на опухолевые клетки.

Таблица 16. Размер опухолей после повторного воздействия у не получавших обработку мышей или мышей, получавших обработку CD70 CAR-Т-клетками

Обработка Т-клетками с CAR	Субъект	Объем опухоли (мм ³) в день после введения дозы Т-клеток с CAR				
		День 77	День 81	День 84	День 88	День 91
2КО, CD70 CAR T	1	1044	1265	1853	1927	2150
	2	653	927	1040	1123	1256
	3	899	1267	1603	1678	2167
	4	701	1287	1672	1817	2490
	5	689	1146	1423	1525	1901

3KO (PD1), CD70 CAR T	1	385	692	983	1172	1369
	2	0	0	0	0	0
	3	566	738	1030	1537	1740
	4	712	1111	1337	1482	1832
	5	632	778	1017	1129	1289
3KO (CD70), CD70 CAR T	1	0	0	0	0	0
	2	34	56	75	104	135
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
4KO, CD70 CAR T	1	66	91	182	215	304
	2	56	85	119	126	155
	3	0	0	0	0	0
	4	76	175	218	256	316
	5	35	30	51	58	63
Без обработки	1	567	1263	1673	1751	2020
	2	882	1214	1535	1609	2047
	3	1158	1304	1676	1924	2389
	4	295	391	667	789	1078
	5	707	1213	1676	1766	2056

Обработка на модели большой опухоли

Исследовали эффективность *In vivo* Т-клеток с CAR к CD70 в отношении более крупных опухолей почечно-клеточной карциномы. Как описано выше, CRISPR/Cas9 и AAV6 использовали для получения Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия TCR, β 2M, CD70 и/или PD1 с сопутствующей экспрессией из локуса TRAC с применением конструкции CAR, нацеливающейся на CD70 (SEQ ID NO: 45). В этом примере активированные Т-клетки подвергали первой электропорации с помощью 2, 3 или 4 различных комплексов RNP Cas9:sgRNA, содержащих sgRNA, нацеливающиеся на TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), PD1 (SEQ ID NO: 42) и CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37). Двухнитевой разрыв ДНК в локусе TRAC подвергали восстановлению путем репарации, направляемой гомологией, с помощью доставляемой AAV6 ДНК-матрицы (SEQ ID NO: 43) (кодирующая CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5), содержащей правое и левое плечи гомологии к локусу TRAC, фланкирующие кассету химерного антигенного рецептора (-/+ регуляторные элементы для экспрессии генов).

Полученные в результате модифицированные Т-клетки представляют собой 2X КО

(TRAC-/β2M-), 3X КО (TRAC-/β2M-/PD1- или TRAC-/β2M-/CD70-) и 4X КО (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) CAR+ к CD70 (с костимуляторным доменом 41BB) Т-клетки. Способность этих Т-клеток с CAR+ к CD70 снижать тяжесть заболевания, вызванного линией CD70+ клеток почечной карциномы, оценивали на мышах NOG с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скотсдейл, Аризона). Вкратце, 12 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 5×10^6 клеток почечной карциномы A498/мышь. При достижении среднего размера опухоли 125-175 мм³ (целевой ~150 мм³) мышей далее делили на 5 групп обработки, как показано в **таблице 17**. В день 1 группы обработки 2-5 получали однократную внутривенную дозу 200 мкл Т-клеток с CAR+ к CD70 согласно **таблице 17**.

Таблица 17. Группы обработки

Группа	CAR-T	Клетки A498	Обработка Т-клетками (i.v.)	N
1	Отсутствует	5×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5
2	2X КО, CD70 CAR+ Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5
3	3X КО (PD1), CD70 CAR+ Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	4
4	3X КО (CD70,) CD70 CAR+ Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5
5	4X КО (CD70, PD1), CD70 CAR+ Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю от дня начала обработки. Ко дню 4 обработки только 3X КО (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетки и 4X КО (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетки начали демонстрировать уменьшение объема опухоли (**фиг. 27С**). Напротив, рост опухоли у животных, получавших обработку 2X КО (TRAC-/β2M-) CAR+ к CD70 Т-клетками или 3X КО (TRAC-/β2M-/PD1-) CAR+ к CD70 Т-клетками, был подобен таковому у не получающей обработку группы. Ко дню 23 обработки 3X КО (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетки полностью элиминировали CD70+ опухоли рака почки *in vivo*. Ко дню 23 обработки элиминирование опухолей в ответ на 4X КО (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетки было почти полным, при этом у 4 из 5 мышей не обнаруживали опухоли рака почки *in vivo*.

Эти данные показывают, что 3X КО (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетки и 4X КО (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетки могут значительно регрессировать большие CD70+ опухоли рака почки *in vivo*.

Модель опухоли in vivo для CAR к BCMA в контексте PD1, CD70 и PD1 с нокаутами CD70

Оценивали эффективность TRAC- β 2M-/к BCMA (костимулирующий домен 4-1BB) CAR+ Т-клеток, TRAC- β 2M-/PD-1-/к BCMA (костимулирующий домен 4-1BB), TRAC- β 2M-/CD70-/к BCMA (костимулирующий домен 4-1BB) и TRAC- β 2M-/PD-1-/CD70-/к BCMA (костимулирующий домен 4-1BB) CAR+ Т-клеток в отношении модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата из MM.1S у мышей NOG. Вкратце, 25 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. В день 1 25 мышей получали подкожную инокуляцию в правый бок 5×10^6 клеток MM.1S в 50% Matrigel/мышь. При достижении среднего объема опухоли от 75 до 125 мм³ мышей делили на 5 групп обработки (N=5) и вводили дозы популяций Т-клеток, содержащих ~ 50% Т-клеток с CAR⁺ к BCMA, как указано в **таблице 18**.

Таблица 18. Введение дозы

Группа	Т-клетка с CAR	Количество инъецированных Т-клеток	Т-клетки с CAR+ к BCMA	N
1	N/A	N/A	N/A	5
2	TRAC- β 2M-/к BCMA	1×10^7 клеток/мышь	5×10^6 (5 миллионов)	5
3	TRAC- β 2M-/PD-1-/к BCMA	1×10^7 клеток/мышь	5×10^6 (5 миллионов)	5
4	TRAC- β 2M-/CD70-/к BCMA	1×10^7 клеток/мышь	5×10^6 (5 миллионов)	5
5	TRAC- β 2M-/PD-1-/CD70-/к BCMA	1×10^7 клеток/мышь	5×10^6 (5 миллионов)	5

Объем опухоли и значения массы тела измеряли дважды в неделю и отдельных мышей умерщвляли, когда объем их опухоли достигал ≥ 2000 мм³.

Ко дню 16 все группы обработки демонстрировали регрессию опухоли по сравнению с исходными объемами, в то время как животные в контрольной группе имели опухоли объемом в среднем более 1500 мм³. К дню 27 все животные в контрольной группе достигли конечной точки объема опухоли ≥ 2000 мм³, в то время как все группы обработки имели средний объем опухоли менее 20 мм³ (**фиг. 28A**). В день 45 всех мышей из каждой группы обработки (группы 2-5) дополнительно подвергали второму воздействию опухоли (повторному воздействию). Мыши получали вторую подкожную инокуляцию в левый бок 5×10^6 клеток MM.1S в 50% Matrigel/мышь. Вводили новую группу контрольных мышей (N=5), которые также получали инокуляцию 5×10^6 клеток MM.1S в 50% Matrigel/мышь в

левый бок.

У всех мышей наблюдали за ростом как начальной опухоли в правом боку, так и опухоли после повторного воздействия в левом боку. У большинства субъектов во всех получавших обработку группах успешно ингибировался рост начальной опухоли в правом боку (**фиг. 28А; таблица 19**). Рост опухоли ингибировался всеми вариантами обработки как до, так и после повторного воздействия опухолью на протяжении эксперимента до дня 77. Только один субъект, получавший обработку TRAC-/ β 2M-/CD70-/PD1-/CAR⁺ к BCMA Т-клетками, характеризовался ростом опухоли в результате начального воздействия раковых клеток (**таблица 19**).

Неожиданно, рост опухоли после повторного воздействия в левый бок также значительно ингибировался во всех получавших обработку группах от даты повторного воздействия (день 45) до дня 77 (**фиг. 28В; таблица 19**). Эти данные показывают, что CAR⁺ Т-клетки сохраняются *in vivo*, ингибируя рост начальной опухоли, а также ингибируя рост новых опухолей после повторного воздействия дополнительными раковыми клетками, даже если этим мышам больше не доставляли Т-клетки с CAR. Например, три из четырех мышей, первоначально получавших обработку популяциями TRAC-/ β 2M-/CAR⁺ к BCMA Т-клеток, три из пяти мышей, первоначально получавших обработку TRAC-/ β 2M-/CD70-/CAR⁺ к BCMA Т-клетками, и три из пяти мышей, первоначально получавших обработку TRAC-/ β 2M-/PD1-/CAR⁺ к BCMA Т-клетками, не характеризовались ростом новой опухоли, несмотря на второе воздействие (повторное воздействие) новыми раковыми клетками. Эти данные показывают, что, неожиданно, Т-клетки с CAR⁺ к BCMA сохраняются в течение длительных периодов времени *in vivo*, например, по меньшей мере до 77 дней после инъекции, и сохраняют свою способность ингибировать рост опухолевых клеток и уменьшать объем опухоли в течение длительных периодов *in vivo*. Эти неожиданные результаты показывают, что применение таких TRAC-/ β 2M-/CAR⁺ к BCMA Т-клеток может обеспечить превосходный длительный противораковый эффект *in vivo*.

Определяли количество человеческих CD45⁺ клеток в крови мышей с использованием пробирок BD Trucount в соответствии с протоколом производителя и обнаружение осуществляли с использованием конъюгированных с Brilliant Violet 786 антител к человеческому CD45 (Biolegend, № по каталогу 368528). Все группы показали значения менее 100 huCD45⁺ клеток/мкл через 1 неделю. Через две недели после введения дозы количество циркулирующих CD45⁺ во всех группах достигло пикового значения перед падением до значений перед неделей 1 к неделе 3 (**фиг. 29**). После повторного воздействия в день 45 получавшие обработку Т-клеткой с CAR⁺ к BCMA субъекты были способны устранить или ингибировать рост опухоли без последующего увеличения количества циркулирующих CAR Т-клеток после повторного воздействия раковыми клетками. Эти данные показывают, что, неожиданно, Т-клетки с CAR⁺ к BCMA сохраняются в течение длительных периодов времени *in vivo*, например, по меньшей мере до 77 дней после инъекции, и сохраняют свою способность ингибировать рост опухолевых клеток и уменьшать объем опухоли в течение длительных периодов *in vivo*. Эти

неожиданные результаты показывают, что при применении TRAC- β 2M-/CAR+ к ВСМА Т-клеток, TRAC- β 2M-/CD70-/CAR+ к ВСМА Т-клеток и TRAC- β 2M-/PD1-/CAR+ к ВСМА Т-клеток будет достигаться превосходный длительный противораковый эффект *in vivo*.

Таблица 19. Размер опухолей у не получавших обработку мышей или мышей, получавших обработку Т-клетками с CAR к ВСМА

Обработка	Мышь	Объем опухоли в день 45 (мм ³)	Объем опухоли в день 77 (мм ³)	
		Правый бок	Правый бок	Левый бок
Без обработки	1	TS	TS	TS
	2	TS	TS	TS
	3	TS	TS	TS
	4	TS	TS	TS
	5	TS	TS	TS
TRAC- β 2M-/к ВСМА	1	0	0 (MS в день 59)	0 (MS в день 59:)
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	297
	5	FD-T в день 16	FD-T в день 16	FD-T в день 16
TRAC- β 2M-/PD1- /к ВСМА	1	0	0	1820
	2	0	0	0
	3	0	0	487
	4	0	0	0
	5	0	0	0
TRAC- β 2M- /CD70-/к ВСМА	1	10	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0 (TS в день 77)	2349 (TS в день 77)
	4	0	0	0
	5	0	0	258
TRAC- β 2M-/PD1- /CD70-/к ВСМА	1	0	0	1157
	2	0	0	1842
	3	0	0	1664
	4	0	0	0

	5	89	1583 (TS в день 73)	1560 (TS в день 73)
--	---	----	------------------------	------------------------

TS=умерщвлены из-за объема опухоли; MS=умерщвлены, как агонизирующие; FD-T=животное, найденное мертвым.

Модель опухоли *in vivo* для CAR к BCMA в контексте нокаута CD70: эффект КО CD70 в отношении умеренного введения дозы CAR T-клеток

Эффективность нескольких генотипов T-клетки с CAR⁺ к BCMA как с нокаутом CD70, так и без такового, оценивали в сравнении с моделью подкожного опухолевого ксенотрансплантата RPMI-8226 у мышей NOG. Вкратце, восемьдесят пять (85) самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. В 1-й день мыши получали подкожную инокуляцию 10×10^6 клеток RPMI-8226/мышь. Через десять (10) дней после инокуляции с помощью клеток RPMI-8226 мышей разделяли на 17 групп обработки (N=5) и вводили дозу популяций T-клеток, содержащих ~80% T-клеток с CAR⁺ к BCMA, как указано в **таблице 20**.

Таблица 20.

Группа	T-клетка с CAR к BCMA	Количество инъецированных T- клеток	T-клетки с CAR ⁺ к BCMA	N
1	N/A	N/A	N/A	5
2	TRAC-/ β 2M-/к BCMA	3×10^6 клеток/мышь	$2,4 \times 10^6$ (2,4 миллиона)	5
3	TRAC-/ β 2M-/к BCMA	1×10^6 клеток/мышь	8×10^5 (0,8 миллиона)	5
4	TRAC-/ β 2M-/к BCMA	3×10^5 клеток/мышь	$2,4 \times 10^5$ (0,24 миллиона)	5
5	TRAC-/ β 2M-/к BCMA	1×10^5 клеток/мышь	8×10^4 (0,08 миллиона)	5
6	TRAC-/ β 2M-/PD1-/к BCMA	3×10^6 клеток/мышь	$2,4 \times 10^6$ (2,4 миллиона)	5
7	TRAC-/ β 2M-/PD1-/к BCMA	1×10^6 клеток/мышь	8×10^5 (0,8 миллиона)	5
8	TRAC-/ β 2M-/PD1-/к BCMA	3×10^5 клеток/мышь	$2,4 \times 10^5$ (0,24 миллиона)	5
9	TRAC-/ β 2M-/PD1-/к BCMA	1×10^5 клеток/мышь	8×10^4	5

			(0,08 миллиона)	
10	TRAC-/ β 2M-/CD70-/к ВСМА	3×10^6 клеток/мышь	$2,4 \times 10^6$ (2,4 миллиона)	5
11	TRAC-/ β 2M-/CD70-/к ВСМА	1×10^6 клеток/мышь	8×10^5 (0,8 миллиона)	5
12	TRAC-/ β 2M-/CD70-/к ВСМА	3×10^5 клеток/мышь	$2,4 \times 10^5$ (0,24 миллиона)	5
13	TRAC-/ β 2M-/CD70-/к ВСМА	1×10^5 клеток/мышь	8×10^4 (0,08 миллиона)	5
14	TRAC-/ β 2M-/PD1-/CD70-/к ВСМА	3×10^6 клеток/мышь	$2,4 \times 10^6$ (2,4 миллиона)	5
15	TRAC-/ β 2M-/PD1-/CD70-/к ВСМА	1×10^6 клеток/мышь	8×10^5 (0,8 миллиона)	5
16	TRAC-/ β 2M-/PD1-/CD70-/к ВСМА	3×10^5 клеток/мышь	$2,4 \times 10^5$ (0,24 миллиона)	5
17	TRAC-/ β 2M-/PD1-/CD70-/к ВСМА	1×10^5 клеток/мышь	8×10^4 (0,08 миллиона)	5

Объем опухоли и массу тела измеряли дважды в неделю и отдельных мышей умерщвляли, когда объем опухоли достигал $\geq 2000 \text{ мм}^3$. Ко дню 22 данные показывают статистически значимое уменьшение объема опухоли в ответ на более высокие дозы Т-клеток с CAR к ВСМА (дозы 1×10^5 - 3×10^6 клеток) по сравнению с любым генотипом Т-клеток с CAR к ВСМА, вводимым дозой 100000 клеток (группы 5, 9, 13 и 17) (**фиг. 30; таблица 21**).

В день 36 TRAC-/ β 2M-/CD70-/CAR+ к ВСМА Т-клетки, вводимые в умеренной дозе 3×10^5 клеток, характеризовались более значительным эффектом в отношении снижения объема опухоли, чем Т-клетки с CAR+ к ВСМА без КО CD70 (например, TRAC-/ β 2M-/CAR+ к ВСМА Т-клетки, TRAC-/ β 2M-/PD1-/CAR+ к ВСМА Т-клетки или TRAC-/ β 2M-/PD1-/CD70-/CAR+ к ВСМА Т-клетки) (**фиг. 30**). Все более высокие дозы 1×10^6 клеток или большая часть Т-клеток CAR+ к ВСМА (**фиг. 30**; 1 мил., 3 мил.) демонстрировали полную регрессию в объеме опухоли. Эта тенденция сохранялась до дня 57 исследования.

Эти результаты демонстрируют, что ингибирование активности CD70 (например, путем нокаута CD70) увеличивает эффективность и активность CAR+ Т-клеток *in vivo*. Этот эффект не зависит от присутствия CAR к CD70.

Таблица 21.

	ВСМА	она)										
15		8 x10 ⁵ (0,8 милли она)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16		2,4 x10 ⁵ (0,24 милли она)	100	100	91	19	20	478	576	82	131	289
17	8 x10 ⁴ (0,08 милли она)	310	310	319	345	451	152 8	216 0	284 3	255 7	149 9	

Пример 9. Т-клетки с CAR с множественным нокаутом сохраняют зависимость от цитокинов

Зависимость от цитокинов. Чтобы определить, приводит ли редактирование гена к нежелательному редактированию вне цели, вследствие которого могут образовываться клетки с неблагоприятными свойствами, такими как неконтролируемый рост клеток, оценивали способность Т-клеток с CAR с отредактированными генами расти в отсутствие цитокинов и/или сыворотки крови.

Т-клетки с CAR к CD70. Оценивали способность TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 клеток расти в отсутствие цитокинов и/или сыворотки крови. Высевали 5×10⁶ TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 клеток через ~ 2 недели после получения клеток (день 0). Количество жизнеспособных клеток подсчитывали через 7 и 14 дней после посева в цельную среду, в 5% человеческую сыворотку крови без цитокинов (IL-2 и IL-7), или в базовую среду без сыворотки крови и цитокинов. В культурах, в которых отсутствовали цитокины, через 14 дней после посева не обнаруживали клеток, что свидетельствует о том, что какие-либо потенциальные внецелевые эффекты, связанные с редактированием генома, не индуцировали роста/пролиферации клеток, независимых от фактора роста (фиг. 31). Клетки пролиферировали только в присутствии цитокинов (например, в цельной среде, содержащей цитокины) и не пролиферировали в присутствии только сыворотки крови. Таким образом, клетки *in vivo*, скорее всего, не будут расти в отсутствие стимуляции цитокинами, факторами роста или антигенами вследствие какого-либо нецелевого редактирования генома.

Также оценивали способность TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD1⁻ CAR⁺ к CD70 клеток расти в отсутствие цитокинов и/или сыворотки крови. Высевали 2×10⁶ клеток через ~ 2 недели после получения клеток (день 0). Количество жизнеспособных клеток подсчитывали через

26 дня после посева в цельную среду, в 5% человеческую сыворотку крови без цитокинов (IL-2 и IL-7), или в базовую среду без сыворотки крови и цитокинов. В культурах, в которых отсутствовали цитокины, через 26 дней после посева не обнаруживали клеток, что свидетельствует о том, что какие-либо потенциальные внецелевые эффекты, связанные с редактированием генома, не индуцировали роста/пролиферации клеток, независимых от фактора роста (**фиг. 32**). Клетки пролиферировали только в присутствии цитокинов (например, в цельной среде, содержащей цитокины) и не пролиферировали в присутствии только сыворотки крови. Таким образом, редактирование генома не индуцировало нежелательные события, что позволяло клеткам расти в отсутствие стимуляции цитокином, фактором роста или антигеном.

T-клетки с CAR+ к ВСМА. Также оценивали способность TRAC β 2M/CD70/PD-1-CAR β к ВСМА клеток расти в отсутствие цитокинов и/или сыворотки крови. TRAC β 2M/CD70/PD-1-CAR β к ВСМА клетки также называют 4X KO, ВСМА CAR β клетками. Высеивали 1×10^6 4X KO, ВСМА CAR β клеток после 10 повторных воздействий, описанных в **примере 6**. Количество жизнеспособных клеток подсчитывали через 7 и 14 дней после посева в цельную среду, в 5% человеческую сыворотку крови без цитокинов (IL-2 и IL-7), или в базовую среду без сыворотки крови и цитокинов. В культурах, в которых отсутствовали цитокины, через 13 дней после посева не обнаруживали клеток, что свидетельствует о том, что какие-либо потенциальные внецелевые эффекты, связанные с редактированием генома, не индуцировали роста/пролиферации клеток, независимых от фактора роста (**фиг. 33**). Клетки пролиферировали только в присутствии цитокинов (например, в цельной среде, содержащей цитокины) и не пролиферировали в присутствии только сыворотки крови. Таким образом, клетки *in vivo*, скорее всего, не будут расти неконтролируемым образом.

Другие T-клетки с CAR. Ранее было показано, что T-клетки с CAR β к CD33 и T-клетки с CAR β к CD19, представленные в данном документе, пролиферируют только в присутствии цитокинов и не пролиферируют в присутствии сыворотки крови отдельно. Таким образом, эти клетки *in vivo*, скорее всего, не будут расти неконтролируемым образом.

Анализ высвобождения цитокина. Для измерения высвобождения цитокина T-клетки и целевые клетки совместно инкубировали в течение 24 часов в указанных соотношениях. Среду с надосадочной жидкостью собирали для использования в ELISA на предмет IL-2 или IFN γ (RD Systems) на новом планшете, следуя инструкциям производителя (RD Systems).

Способность TRAC β 2M/CD70/CAR β к CD70 клеток продуцировать интерлейкин-2 (IL-2) при совместном культивировании в присутствии клеток A498 анализировали с использованием анализа ELISA. И TRAC β 2M/CD70/CAR β к CD70 T-клетки с нокаутом по трем генам, и TRAC β 2M/CAR β к CD70 T-клетки с нокаутом по двум генам секретируют высокие уровни IL-2. Поразительно, что TRAC β 2M/CD70/CAR β к CD70 клетки секретируют более высокие уровни IL-2, чем TRAC β 2M/CAR β к CD70 клетки при культивировании с клетками A498 (**фиг. 34**). Эти результаты позволяют предположить,

что нокаут гена *CD70* дает преимущество, которое позволяет Т-клеткам с *CAR*⁺ к *CD70* секретировать больше ИЛ-2.

Пример 10. Эффект множественного нокаута в Т-клетках с *CAR*⁺ к *CD70* в отношении клеток почечной карциномы A498

Эффект множественного нокаута в отношении функции Т-клеток с *CAR*⁺ к *CD70*

Анализ клеточного уничтожения. Способность редактирования нескольких генов уничтожать клетки почечной карциномы A498 определяли с использованием анализа клеточного уничтожения, описанного выше. Вкратце, TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 (2X KO, CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 (3X KO (PD-1), CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (4X KO, CD70 CAR⁺) клетки инкубировали с линией адherentных полученных из RCC CD70⁺ клеток (клеток A498) при различных соотношениях Т-клетка с *CAR*:целевые клетки A498.

TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 клетки характеризовались эффективным уничтожением полученных из RCC клеток после 24-часовой совместной инкубации (**фиг. 35**). TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по четырем генам демонстрировали более высокую эффективность уничтожения клеток, чем TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам, которые демонстрировали более высокую эффективность, чем TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по двум генам (что обнаруживается при низком соотношении Т-клетка: A498 0,5:1 и 0,25:1). Результаты показывают, что нокаут обоих генов *CD70* и *PD-1* обеспечивал *CAR*⁺ к *CD70* клеткам более высокую эффективность уничтожения клеток.

Клетки с отредактированными генами также характеризовались эффективным уничтожением полученных из RCC клеток после 24-часовой совместной инкубации при соотношении Т-клетка с *CAR*:целевая клетка A948 0,24:1 (**фиг. 36**). В частности, TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по четырем генам демонстрировали более высокую эффективность, чем TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по двум генам или TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам. Эти данные показывают, что нокаут *CD70* в контексте *CAR* к *CD70* улучшал способность Т-клеток с *CAR*⁺ к *CD70* к уничтожению клеток.

Анализ высвобождения цитокина. Анализ высвобождения цитокина проводили, как описано выше. Способность Т-клеток с *CAR*⁺ к *CD70* с нокаутом по двум, трем и четырем генам продуцировать ИЛ-2 и интерферон-гамма (IFN-гамма (IFN-g)) при совместном культивировании в присутствии клеток A498 после 24-часовой совместной инкубации при соотношении (Т-клетка с *CAR*:целевая клетка A498) 0,25:1 оценивали с помощью анализа ELISA. Измеряли уровень IFN и ИЛ-2 из надосадочных жидкостей совместных клеточных культур. TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по четырем генам секретируют наивысшие уровни IFN-g (**фиг. 37А**) и ИЛ-2 (**фиг. 37В**) при культивировании

с клетками A498.

Эффект нокаута CD70 в отношении экспрессии маркера истощения

Оценивали уровни маркеров истощения PD-1 и LAG3 на TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 (2X KO, CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 (3X KO (PD-1), CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (4X KO, CD70 CAR⁺) Т-клетках, используемых в приведенных выше примерах. CD4⁺ Т-клетки оценивали по экспрессии PD-1 (**фиг. 38**), а CD8⁺ Т-клетки и CD4⁺ Т-клетки оценивали по экспрессии LAG3 (**фиг. 39А** и **фиг. 39В**, соответственно) посредством проточной цитометрии.

Данные показывают, что КО CD70 снижает экспрессию маркера истощения в Т-клетках с CAR. Данные на **фиг. 38** показывают, что экспрессия PD-1 снижается, как и ожидалось, при нокауте PD-1, а также она снижается при нокауте CD70.

Данные на **фиг. 39А** и **39В** показывают, что нокаут CD70 снижает экспрессию маркера LAG3 в клетках CD4 и CD8.

Данные показывают, что нокаут CD70, в частности, может снижать потенциальное истощение CD8⁺ и CD4⁺ популяций из CAR⁺ Т-клеток с отредактированными генами, что приводит к улучшению терапевтических средств.

Пример 11. КО CD70 улучшает уничтожение клеток для нескольких типов клеток

Экспрессия CD70 в различных линиях раковых клеток. Относительную экспрессию CD70 измеряли в различных линиях раковых клеток для дальнейшего оценивания способности Т-клеток с CAR⁺ к CD70 уничтожать различные типы раковых клеток. Экспрессию CD70 измеряли с помощью анализа FACS с использованием антитела Alexa Fluor 647 к человеческому CD70 (BioLegend, № по каталогу 355115). На **фиг. 40А** (левый график) показана относительная экспрессия CD70 в клетках ACHN, измеренная с помощью FACS, по сравнению с другими линиями клеток рака почки A498, 786-О, saski-1 и Saki-2. Кроме того, линии клеток, не являющиеся линиями клеток рака почки, оценивали по экспрессии CD70 с помощью анализа FACS (**таблица 22**, **фиг. 40А** и **фиг. 40В**) с использованием либо антитела Alexa Fluor 647 к человеческому CD70 (BioLegend, № по каталогу 355115; **фиг. 40А**, правая панель), либо антитела к человеческому CD70 FITC (BioLegend, № по каталогу 355105) на **фиг. 40В**. SNU-1 (клетки рака желудочно-кишечного тракта) характеризовались высокими уровнями экспрессии CD70, которые были подобны таковым у клеток A498 (**фиг. 40А**, правая панель). Линии клеток SKOV-3 (яичника), HuT78 (лимфомы), NCI-H1975 (легкого) и Hs-766Т (поджелудочной железы) характеризовались уровнями экспрессии CD70, которые были подобны таковым или превышали таковые клеток ACHN, но были ниже, чем у клеток A498 (**таблица 22**, **фиг. 40В**).

Таблица 22.

Клеточная линия	Тип рака	Относительная экспрессия CD70
-----------------	----------	-------------------------------

A498	Карцинома почки	Высокая
ACHN	Почки (полученный из метастаза)	Средняя - низкая
SK-OV-3	Аденокарцинома яичника	Средняя
NCI-H1975	Аденокарцинома легкого (NSCLC)	Средняя
Calu-1	Карцинома легкого	Низкая
DU 145	Карцинома предстательной железы	Низкая
SNU-1	Карцинома желудка	Высокая
Hs 766T	Карцинома поджелудочной железы	Средняя
MJ	T-клеточная лимфома	Высокая
HuT78	T-клеточная лимфома	Средняя
HuT102	T-клеточная лимфома	Средняя
PANC-1	Карцинома поджелудочной железы	Низкая
U937	AML	Отсутствие экспрессии
K562	Хронический миелогенный лейкоз	Отсутствие экспрессии (отрицательный контроль)

Анализ клеточного уничтожения Способность CAR⁺ к CD70 клеток с несколькими отредактированными генами уничтожать клетки почечной карциномы ACHN определяли с использованием анализа клеточного уничтожения, описываемого выше. TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD70 (2X KO, CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ к CD70 (3X KO (PD-1), CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (4X KO, CD70 CAR⁺) клетки инкубировали с линией адгезивных полученных из RCC клеток, экспрессирующих низкие уровни антигена CD70 (клеток ACHN) (На **фиг. 40А** показана относительная экспрессия CD70 в клетках ACHN, измеренная с помощью FACS, по сравнению с другими линиями клеток рака почки A498, 786-O, saski-1 и Saki-2) при соотношении T-клетка с CAR:целевые клетки ACHN 0,5:1 (**фиг. 40С**) и 0,25:1 (**фиг. 40D**). Клетки с отредактированными генами характеризовались эффективным уничтожением полученных из RCC клеток после 24-часовой совместной инкубации (**фиг. 40С и 40D**). Клетки демонстрировали более высокую эффективность при нокауте PD-1, при нокауте CD70 и даже чуть более высокую эффективность при нокауте и PD-1, и CD70. В заключение, нокаут PD-1 или CD70 или обоих PD-1 и CD70 вместе улучшает способность CAR⁺ к CD70 клеток уничтожать клетки ACHN.

Хотя было обнаружено, что клетки ACHN экспрессируют уровни CD70 от умеренных до низких, они неожиданно оказались чувствительными к уничтожению 3X KO (PD-1), CD70 CAR⁺ T-клетками, 3X KO (CD70), CD70 CAR⁺ T-клетками и 4X KO CD70 CAR⁺ T-клетками (**фиг. 40С и 40D**). Это указывает на то, что высокий уровень экспрессии CD70 не является необходимостью для эффективного уничтожения целевой клетки T-

клетками с редактируемыми генами, которые экспрессируют CAR к CD70. Кроме того, учитывая, что уровни экспрессии CD70 на клеточных линиях SNU-1, SK-OV-3, NCI-H1975 и HS-766T оказались аналогичными или превышали таковые в ACHN, ожидалось, что Т-клетки с CAR⁺ к CD70 будут также особенно эффективным в уничтожении этих типов раковых клеток. Действительно, выяснили, что TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (4X KO, CD70 CAR⁺) и TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) характеризовались неожиданно эффективным уничтожением клеток многих линий клеток солидной опухоли всего лишь через 24 часа совместного культивирования (на **фиг. 40E** показано уничтожение 4X KO CAR⁺ Т-клетками, а на **фиг. 40F** показано уничтожение 3X KO CAR⁺ Т-клетками). И 3X KO, CD70 CAR⁺, и 4X KO, CD70 CAR⁺ Т-клетки уничтожали > 60% клеток опухоли почки, поджелудочной железы и яичника (A498, ACHN, SK-OV-3 и Hs-766T) при соотношении 4:1 эффекторная:целевая клетка и > 50% при соотношении 1:1 эффекторная:целевая клетка. Уничтожение линий раковых клеток, которые характеризовались экспрессией CD70 (NCI-H1975, Calu-1 и DU 145) от средней до низкой, по-прежнему оставалось эффективным с уничтожением > 30% при соотношении эффекторная клетка:целевая клетка 4:1 в течение 24 часов совместного культивирования (**фиг. 40E** и **40F**). Более длительное воздействие (т. е. 96 часов) либо 3X KO, либо 4X KO, CD70 CAR⁺ Т-клетками приводило к усилению уничтожения раковых клеток среди всех типов клеток, в частности, клеток SKOV-3, Hs-766T и NCI-H1975, при этом уничтожение составляло > 80% при соотношении эффекторная:целевая клетка 1:1 (**фиг. 40G**).

Уничтожение клеток SNU-1 оценивали визуально.

Уничтожение целевых клеток после длительного воздействия Т-клеток с CAR⁺ также оценивали посредством микроскопии для раковых клеток SNU-1. Клетки SNU-1 высевали с плотностью 1 миллион клеток на лунку в 6-луночный планшет и смешивали при соотношении эффектор:цель 4:1 с 3X KO (CD70), CAR⁺ к CD70 Т-клетками. Совместную культуру инкубировали в течение шести (6) дней и наличие жизнеспособных раковых клеток оценивали с помощью микроскопа. Все целевые клетки карциномы желудка (SNU-1) были элиминированы в лунках, содержащих TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки, по сравнению с контрольными лунками, что указывает на то, что раковые клетки были полностью элиминированы Т-клетками с CAR⁺ к CD70 с увеличением их количества в совместной культуре.

Определяли способность Т-клеток с CAR⁺ к CD70 селективно уничтожать экспрессирующие CD70 клетки. Разрабатывали анализ проточной цитометрии для тестирования уничтожения суспензионных линий раковых клеток (например, раковых клеток K562, MM.1S и HuT78, которые называются "целевыми клетками") 3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) CAR⁺ к CD70 Т-клетками. Две из используемых линий целевых клеток представляли собой линии раковых клеток, экспрессирующие CD70 (например, MM.1S и HuT78), тогда как у третьей, клетки которой использовали в качестве раковых клеток отрицательного контроля, экспрессия CD70 отсутствовала (например, K562). TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки совместно культивировали либо с экспрессирующими

CD70 линиями клеток MM.1S или HuT78, либо с отрицательной по CD70 линией клеток K562. Целевые клетки метили с помощью 5 мкМ efluor670 (eBiosciences), промывали и высевали с плотностью 50000 целевых клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном. Целевые клетки совместно культивировали с TRAC⁻/B2M⁻/CD70⁻ CAR⁺ к CD70 Т-клетками при варьирующих соотношениях (0,5:1, 1:1, 2:1 и 4:1 CAR⁺ Т-клеток и целевых клеток) и инкубировали на протяжении ночи. Уничтожение целевых клеток определяли после 24 часов совместного культивирования. Клетки промывали и в каждую лунку добавляли 200 мкл среды, содержащей разбавление 1:500 5 мг/мл DAPI (Molecular Probes) (для подсчета мертвых/умирающих клеток). Затем клетки анализировали посредством проточной цитометрии и определяли количество оставшихся живых целевых клеток.

На **фиг. 40H**, **фиг. 40I** и **фиг. 40J** показано селективное уничтожение целевых клеток TRAC⁻/B2M⁻/CD70⁻ CAR⁺ к CD70 Т-клетками. 24-часовое совместное культивирование с 3X КО (CD70) CAR⁺ Т-клетками приводило к почти полному уничтожению клеток Т-клеточной лимфомы (HuT78), даже при низком соотношении CAR⁺ Т-клетки и экспрессирующей CD70 целевой клетки 0,5:1 (**фиг. 40J**). Подобным образом, 24-часовое совместное культивирование приводило к почти полному уничтожению клеток множественной миеломы (MM.1S) при всех тестируемых соотношениях CAR⁺ Т-клетки и целевой клетки (**фиг. 40I**). Выяснили, что уничтожение целевых клеток было селективным в том отношении, что TRAC⁻/B2M⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки не индуцировали уничтожение CD70-дефицитных клеток K562, что было выше уровня в контрольных образцах (например, либо раковые клетки отдельно, либо в совместной культуре с Т-клетками без RNP) при любом тестируемом соотношении эффекторная:целевая клетка (**фиг. 40H**).

Анализ высвобождения цитокина. Анализ высвобождения цитокина проводили, как описано выше. Способность CAR⁺ к CD70 Т-клеток с нокаутом по двум, трем и четырем генам продуцировать IL-2 и IFN-g при совместном культивировании в присутствии клеток ACHN после 24-часовой совместной инкубации при соотношении (Т-клетка с CAR:целевая клетка ACHN) 0,25:1 оценивали с помощью анализа ELISA. Измеряли уровень IFN и IL-2 из надосадочных жидкостей совместных клеточных культур. TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по трем генам и TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клетки с нокаутом по четырем генам секретировали наивысшие уровни IFN-g (**фиг. 41**) и IL-2 (**фиг. 41B**) при культивировании с клетками ACHN. В заключение, нокаут CD70 или PD-1 и CD70 вместе улучшает способность CAR⁺ к CD70 клеток уничтожать клетки ACHN.

Пример 12. Эффективность КО CD70 в Т-клетках с CAR⁺ к CD70: модель опухолевого ксенотрансплантата на мышах NOG

Обработка на модели опухоли яичника

Способность Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD70, элиминировать клетки аденокарциномы яичника, которые экспрессируют умеренные уровни CD70, оценивали *in vivo* с использованием модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата карциномы яичника (SKOV-3) на мышах.

CRISPR/Cas9 и AAV6 применяли, как описано выше (см., например, пример 3), для получения Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия TCR, $\beta 2M$, CD70 с сопутствующей экспрессией из локуса TRAC с применением конструкции CAR, нацеливающейся на CD70 (SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46. В этом примере активированные Т-клетки подвергали первой электропорации с помощью 3 разных комплексов RNP Cas9:sgRNA, содержащих sgRNA, нацеливающиеся на TRAC (SEQ ID NO: 40), $\beta 2M$ (SEQ ID NO: 41) и CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37). Двухнитевой разрыв ДНК в локусе TRAC подвергали восстановлению путем репарации, направляемой гомологией, с помощью доставляемой AAV6 ДНК-матрицы, включающей донорную матрицу (SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45) (кодирующая CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45), содержащей правое и левое плечи гомологии к локусу TRAC, фланкирующие кассету химерного антигенного рецептора (-/+ регуляторные элементы для экспрессии генов).

Полученные модифицированные Т-клетки представляют собой 3X KO (TRAC-/ $\beta 2M$ -/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетки. Способность этих Т-клеток с CAR+ к CD70 снижать тяжесть заболевания, вызванного линией CD70+ клеток карциномы яичника, оценивали на мышях NOG с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скотсдейл, Аризона). Вкратце, 12 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1}Sug/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 5×10^6 клеток карциномы яичника SKOV-3/мышь в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли 25-75 мм³ (целевой ~50 мм³) мышей далее делили на 5 групп обработки, как показано в **таблице 23**. В день 1 группа обработки 2 получала однократную внутривенную дозу 200 мкл Т-клеток с CAR+ к CD70 согласно **таблице 23**.

Таблица 23. Группы обработки

Группа	CAR-Т	Клетки SKOV-3	Обработка Т-клетками (<i>i.v.</i>)	N
1	Отсутствует	5×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5
2	3X KO (CD70), CAR+ к CD70 Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю от дня начала обработки. В день 9 после инъекции опухоли, которые обрабатывали Т-клетками с CAR к CD70, начинали демонстрировать снижение объема относительно опухолей у не получавших обработку животных. В день 17 после инъекции CD70+ опухоли рака яичника у мышей, получавших обработку Т-клетками с CAR к CD70, были полностью элиминированы. Эта полная регрессия роста опухоли сохранялась у получавших обработку животных до дня 44 после инъекции, после чего у 4 из 5 мышей, получавших обработку Т-клетками с CAR к CD70,

опухоли отсутствовали до конца наблюдения (день 69) (фиг. 42А). Эти данные демонстрируют, что 3Х КО (TRAC-/β2М-/CD70-) CAR+ к CD70 клетки являются высокоэффективными *in vivo* для лечения опухолей яичников человека.

Обработка на модели опухоли немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC)

Способность Т-клеток, экспрессирующих CD70 CAR, элиминировать клетки аденокарциномы легкого, которые экспрессируют умеренные уровни CD70, оценивали *in vivo* с использованием модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата карциномы легкого (NCI-H1975) на мышах.

CRISPR/Cas9 и AAV6 применяли, как описано выше (см., например, пример 3), для получения Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия TCR, β2М, CD70 с сопутствующей экспрессией из локуса TRAC с применением конструкции CAR, нацеливающейся на CD70 (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44). В этом примере активированные Т-клетки подвергали первой электропорации с помощью 3 разных комплексов RNP Cas9:sgRNA, содержащих sgRNA, нацеливающиеся на TRAC (SEQ ID NO: 40), β2М (SEQ ID NO: 41) и CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37). Двухнитевой разрыв ДНК в локусе TRAC подвергали восстановлению путем репарации, направляемой гомологией, с помощью доставляемой AAV6 ДНК-матрицы (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44) (кодирующая CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45), содержащей правое и левое плечи гомологии к локусу TRAC, фланкирующие кассету химерного антигенного рецептора (-/+ регуляторные элементы для экспрессии генов).

Полученные модифицированные Т-клетки представляют собой 3Х КО (TRAC-/β2М-/CD70-) CAR+ к CD70 (с костимуляторным доменом 41BB) Т-клетки. Способность этих Т-клеток с CAR+ к CD70 снижать тяжесть заболевания, вызванного линией CD70+ клеток карциномы легкого, оценивали на мышах NOG с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скотсдейл, Аризона). Вкратце, 12 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Sug}/ JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 5×10^6 клеток карциномы легкого NCI-H1975/мышь в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли 25-75 мм³ (целевой ~50 мм³) мышей далее делили на 2 группы обработки, как показано в **таблице 24**. В день 1 группа обработки 2 получала однократную внутривенную дозу 200 мкл Т-клеток с CAR+ к CD70 согласно **таблице 24**.

Таблица 24. Группы обработки

Группа	CAR-T	Клетки NCI-H1975	Обработка клетками (<i>i.v.</i>)	T- N
1	Отсутствует	5×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5

2	3X KO (CD70), CAR+ к CD70 T- клетки	5×10 ⁶ клеток/мышь	1×10 ⁷ клеток/мышь	5
---	--	----------------------------------	-------------------------------	---

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю от дня начала обработки. В день 12 после инъекции опухоли, которые обрабатывали Т-клетками с CAR к CD70, начинали демонстрировать снижение объема относительно опухолей у не получавших обработку животных. Такая полная регрессия опухолей у получавших обработку животных наблюдалась до дня 33 после инъекции. Лечение с помощью Т-клеток с CAR к CD70 приводило к сильной активности против развившихся ксенотрансплантатов рака легкого H1975 через 40 дней после инъекции (повторный рост опухоли подавлялся у всех мышей до дня 40 с размером опухоли < 100 мм³), после чего опухоли начинали расти (**фиг. 42В**). Эти данные демонстрируют, что 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ к CD70 клетки обладают сильной активностью против CD70+ опухолей рака легкого человека *in vivo*.

Обработка на модели опухоли поджелудочной железы

Способность Т-клеток, экспрессирующих CD70 CAR, элиминировать клетки карциномы поджелудочной железы, которые экспрессируют умеренные уровни CD70, оценивали *in vivo* с использованием модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата поджелудочной железы (Hs 766T) на мышах.

CRISPR/Cas9 и AAV6 применяли, как описано выше (см., например, пример 3), для получения Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия TCR, β2M, CD70 с сопутствующей экспрессией из локуса TRAC с применением конструкции CAR, нацеливающейся на CD70 (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44). В этом примере активированные Т-клетки подвергали первой электропорации с помощью 3 разных комплексов RNP Cas9:sgRNA, содержащих sgRNA, нацеливающиеся на TRAC (SEQ ID NO: 40), β2M (SEQ ID NO: 41) и CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37). Двухнитевой разрыв ДНК в локусе TRAC подвергали восстановлению путем репарации, направляемой гомологией, с помощью доставляемой AAV6 ДНК-матрицы (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44) (кодирующая CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45), содержащей правое и левое плечи гомологии к локусу TRAC, фланкирующие кассету химерного антигенного рецептора (-/+ регуляторные элементы для экспрессии генов).

Полученные модифицированные Т-клетки представляют собой 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетки. Способность этих Т-клеток CAR+ к CD70 снижать тяжесть заболевания, вызванного линией CD70+ клеток карциномы поджелудочной железы, оценивали на мышах NOG с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скотсдейл, Аризона). Вкратце, 12 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 5×10⁶ клеток карциномы поджелудочной железы Hs766T в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли 25-75 мм³ (целевой ~50 мм³) мышей далее делили на 2 группы

обработки, как показано в **таблице 25**. В день 1 группа обработки 2 получала однократную внутривенную дозу 200 мкл Т-клеток с CAR+ к CD70 согласно **таблице 25**.

Таблица 25. Группы обработки

Группа	CAR-T	Клетки Hs766T	Обработка Т-клетками (<i>i.v.</i>)	N
1	Отсутствует	5×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5
2	3X KO (CD70), CAR+ к CD70 Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю от дня начала обработки. Ко дню 15 после инъекции опухоли, которые обрабатывали Т-клетками с CAR к CD70, начинали демонстрировать снижение объема у всех получавших обработку животных. Обработка с помощью Т-клеток с CAR+ к CD70 эффективно снижала размер CD70+ опухолей рака поджелудочной железы у всех тестируемых мышей ($< 37 \text{ мм}^3$) без признаков дальнейшего роста в течение всего исследования (до дня 67) (**фиг. 42С**). Эти данные демонстрируют, что 3X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-) CAR+ к CD70 клетки индуцируют регрессию CD70+ опухолей рака поджелудочной железы человека *in vivo* с высокой активностью против развившихся ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы Hs766T и со стойкими ответами в течение 60 дней после начала обработки.

Обработка на модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата Т-клеточной лимфомы

Способность Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD70, элиминировать Т-клеточную лимфому оценивали *in vivo* с использованием модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата Т-клеточной лимфомы (Hu T78) на мышах.

CRISPR/Cas9 и AAV6 применяли, как описано выше (см., например, пример 3), для получения Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия TCR, β 2M, CD70 с сопутствующей экспрессией из локуса TRAC с применением конструкции CAR, нацеливающейся на CD70 (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44). В этом примере активированные Т-клетки подвергали первой электропорации с помощью 3 разных комплексов RNP Cas9:sgRNA, содержащих sgRNA, нацеливающиеся на TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41) и CD70 (SEQ ID NO: 36 или 37). Двухнитевой разрыв ДНК в локусе TRAC подвергали восстановлению путем репарации, направляемой гомологией, с помощью доставляемой AAV6 ДНК-матрицы (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44) (кодирующая CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45), содержащей правое и левое плечи гомологии к локусу TRAC, фланкирующие кассету химерного антигенного рецептора (-/+ регуляторные элементы для экспрессии генов).

Полученные модифицированные Т-клетки представляют собой 3X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-) CAR+ к CD70 Т-клетки. Способность этих Т-клеток с CAR+ к CD70 снижать

тяжесть заболевания, вызванного линией CD70+ клеток Т-клеточной лимфомы, оценивали на мышах NOG с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скотсдейл, Аризона). Вкратце, 12 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 3×10^6 клеток Т-клеточной лимфомы HuT78 в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли 25-75 мм³ (целевой ~50 мм³) мышей далее делили на 2 группы обработки, как показано в **таблице 26**. В день 1 группа обработки 2 получала однократную внутривенную дозу 200 мкл Т-клеток с CAR+ к CD70 согласно **таблице 26**.

Таблица 26. Группы обработки

Группа	CAR-T	Клетки HuT78	Обработка Т-клетками (<i>i.v.</i>)	N
1	Отсутствует	3×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5
2	3X KO (CD70,) CAR+ к CD70+ Т-клетки	3×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	4

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю от дня начала обработки. Ко дню 12 после инъекции опухоли, которые обрабатывали Т-клетками с CAR к CD70, начинали демонстрировать снижение объема у всех получавших обработку животных. Обработка с помощью Т-клеток с CAR+ к CD70 эффективно уменьшало размер опухоли CD70+ Т-клеточной лимфомы у всех тестируемых мышей ко дню 15 (**фиг. 42С**). Эти данные демонстрируют, что 3X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-) CAR+ к CD70 клетки индуцируют регрессию опухолей CD70+ Т-клеточной лимфомы человека *in vivo* с высокой активностью против развившихся ксенотрансплантатов Т-клеточной лимфомы HuT78.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Инсерционно-делеционная мутация TRAC	AAGAGCAACAAATCTGACT
2	Инсерционно-делеционная мутация TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT
3	Инсерционно-делеционная мутация TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT

		cuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuuu
16	sgRNA	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaaaagg cuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc
17	sgRNA	n ₍₁₇₋ 30)guuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuug aaa aaguggcaccgagucggugc ₍₁₋₈₎
18	Нуклеотидная последовательность 4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACA ACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGG AGGATGTGAACTG
19	Аминокислотная последовательность 4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL
20	Аминокислотная последовательность CD28	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S
21	Нуклеотидная последовательность CD3-z	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATA TCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATT TGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGC CGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCGAA GAAAGAATCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCA GAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGT ATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATG GCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACG TACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCAGA
22	Аминокислотная последовательность CD3-z	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHGDLGQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
23	sgRNA CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACCAAUguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U

24	sgRNA CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGACCAAguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U
25	sgRNA CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCCUAUguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U
26	sgRNA CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCEAUUGGUCGCGuuuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U
27	sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCAUAguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U
28	sgRNA CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGCACguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U
29	sgRNA CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGUGAguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U
30	sgRNA TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U
31	sgRNA β 2M	GCUACUCUCUCUUCUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U
32	sgRNA PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACACAUguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUU U
33	sgRNA CD70 (E1_T1)	U*C*A*CCAAGCCCGCGACCAAUguuuuagagcuagaaauagcaa guuaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
34	sgRNA CD70 (E1_T3)	A*U*C*ACCAAGCCCGCGACCAAguuuuagagcuagaaauagcaa guuaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
35	sgRNA CD70	C*G*G*UGCGGCGCAGGCCCUAUguuuuagagcuagaaauagcaa

	(E1_T4)	guaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
36	sgRNA CD70 (E1_T7)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuagagcuagaaauagcaa guaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
37	sgRNA CD70 (E1_T8)	G*C*C*CGCAGGACGCACCCAUAguuuuagagcuagaaauagcaa guaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
38	sgRNA CD70 (E1_T10)	G*U*G*CAUCCAGCGCUUCGCACguuuuagagcuagaaauagcaa guaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
39	sgRNA CD70 (E3_T1)	C*A*G*CUACGUAUCCAUCGUGAguuuuagagcuagaaauagcaa guaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
40	sgRNA TRAC	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaa guaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
41	sgRNA β 2M	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaa guaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
42	sgRNA PD-1	C*U*G*CAGCUUCUCCAACACAguuuuagagcuagaaauagcaa guaaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU *U*U*U
43	CD70 rAAV, (CD70B scFV c 41BB)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTC CATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGAGATGT AAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAG TAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGA TTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCT CCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACA TACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAG TTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTG CTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTTACTCTGC

	CAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATT AAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCA TTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGT GAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTG ATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGA GCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCA TGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCT TGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGG GCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCC TCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGT GTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTG TCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGT CACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAA ACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCG GTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTC CCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGGCAATTGAACCG GTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAG TGATGTCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGG GGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAAC GTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTA CGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTG GCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTG GAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTG GGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTT CGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATT TAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG CAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCCGGGCGGGCGACGGGG CCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGGC CTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCG CCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCG
--	---

CTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGAC
GCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACA
CAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTGCTTC
ATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACC
TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTTTAG
GTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCAC
ACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGC
ACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTGGAGT
TTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTC
AAAGTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACCAT
GGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGC
TGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAGTTGGTG
CAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAACCCGGCGCTTCCG
TGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTACAG
AACTACGGGATGAATTGGGTTCCGCAAGCGCCGGGGC
AGGGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCTACAC
CGGCGAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGA
GTCACTATGACGCGGATACCAGCATATCCACCGCATA
CATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTG
TCTACTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATG
GACTACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAG
TGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGAAGCGGAGGA
GGGGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGA
TAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTA
ATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATAT
TCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACC
GCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGT
CTGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGA
ACTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCAGTGCAGGCTGA
GGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAG
TCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAATT
AAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCC
AAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACC
CGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCC
CGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATA

		CGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGG GCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCA CTCGTTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAA ACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAA CCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGG AGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAG ACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTAT AACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACG TGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGG GGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCAAGAAGGACTC TACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCT ACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGG AAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACG GCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGG CCCTGCCTCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCG AAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAAC AAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAG CATTATCCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGGTA AGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTT CAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATG ATGTCTAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATC CATTGCCACCAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTG AGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAA AAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGT GGCCAGCCTCAGTCTCTCCA ACTGAGTTCCTGCCTGC CTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCT AGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCT TATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAGCTCAC TAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAAACCACCAAT CACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGA AGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCC AGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCATCTGTC AGCTGGGAAAAGTCCAATAACTTCAGATTGGAATGTG TTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGAC
--	--	--

		AAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTT GAAGATAACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCC TATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGTA ACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTA GGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC GCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
44	CD70 LHA-RHA (CD70B scFV c 41BB)	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTA TATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGT GTTCTGATTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGA GCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATG CCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAG CCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTAC AGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTA CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGAT CCTATTAATAAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGC CCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCT GGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCA AGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCAT CACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATA AAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC GCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGT TGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTG ATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGC CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATG TGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC AAAACGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCT CCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACA GTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAA CCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGG TGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGA ACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG

GTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTT
ACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACT
GGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTT
GGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG
AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTG
GGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTT
CGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATT
TAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG
CAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC
TGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGG
CCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGC
CTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCG
CCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC
CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGC
TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACG
CGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACAC
AAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCA
TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCT
CGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG
TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACA
CTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCAC
TTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTT
GGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCA
AAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGACCACCATG
GCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTG
TTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAGTTGGTGCA
AAGCGGGGCGGAGGTGAAAAACCCGGCGCTTCCGTG
AAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTACGAA
CTACGGGATGAATTGGGTTCGCCAAGCGCCGGGGCAGG
GACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCTACACCGGC
GAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTCAC
TATGACGCGGATAACCAGCATATCCACCGCATAACATGG
AGCTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTAC
TATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTA

		CTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTG GAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGG GTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCAGATAGT TTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTG TCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTT TTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCCG AAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGG GTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAACTGA CTTTACGCTCACGATCAGTTCCTGCAGGCTGAGGATG TAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCC TGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAATTA GTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAAC CGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCT CCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAG GCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATACGAG GGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCC GTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGT TATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGG GCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTT ATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCT GTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATG TGAAGTGCAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTC CGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGA ACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTG ATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAA ACCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAAT GAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAG AAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGG TCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCA AAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCT CCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGA TGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGAC TTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCC AGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCT TTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGG
--	--	---

		<p>CCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAA ACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCAC CAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTT TGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATG AAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCT CAGTCTCTCCAAGTGGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCT CAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATT TAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCT GTCTGCCAAAAAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCAGTCT CACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTG CCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAAT TAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCAC CATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAA GTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAG GGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGG GAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAG CCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCT GGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG</p>
45	<p>Нуклеотидная последовательность CD70 CAR (CD70B scFV с 41BB)</p>	<p>ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGC GCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAGTTGG TGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACC CGGCGCTTC CGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTCA CGAACTACGGGATGAATTGGGTTTCGCCAAGCGCCGGGG CAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCTACA CCGGCGAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGA GTCACTATGACGCGGATAACCAGCATATCCACCGCATA CATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTG TCTACTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATG GACTACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAG TGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGA GGGGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGA TAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTA ATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATAT TCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACC GCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTC</p>

		<p>TGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAA CTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCACTGCAGGCTGAG GATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGT CCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAATTA AAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCA AACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCC GCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCC GAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATAC GAGGGGCTTGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGC TCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACT CGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAAC GGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGG CTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGA TGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGC TCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACG AACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTT GATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTA AACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAA TGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCA GAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAG GTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACC AAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCC TCCCAGATAA</p>
46	<p>Аминокислотн ая последователь ность CD70 CAR (CD70B scFV с 41BB)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASV KVSKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTY GEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVY YCARDYGDYGM DYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGSGGG GSGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFM HWYQQKPGQPPKLLIYLAASNLESGVPDRFSGSGGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIKSAAAFV PVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK</p>

		RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
47	CD70A Нуклеотидная последовательность scFv	GATATAGTTATGACCCAATCACCCGATAGTCTTGCGGT AAGCCTGGGGGAGCGAGCAACAATAAACTGTCTGGGCA TCAAATCCGTCAGTACAAGCGGGTATTCATTCATGCA CTGGTATCAACAGAAACCCGGTCAGCCACCCAAGCTCC TGATTTATCTTGCGTCTAATCTTGAGTCCGGCGTCCCAG ACCGGTTTTCCGGCTCCGGGAGCGGCACGGATTTTACT CTTACTATTTCTAGCCTTCAGGCCGAAGATGTGGCGGT ATACTACTGCCAGCATTCAAGGGAAGTTCCTTGGACGT TCGGTCAGGGCACGAAAGTGGAATTAAGGCGGGGG GGGATCCGGCGGGGGAGGGTCTGGAGGAGGTGGCAGT GGTCAGGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGGGCAGAGGTAA AAAAACCCGGCGCGTCTGTAAAGGTTTCATGCAAGGCC AGTGGATATACTTTCACCAATTACGGAATGAACTGGGT GAGGCAGGCCCTGGTCAAGGCCTGAAATGGATGGGA TGGATAAACACGTACACCGGTGAACCTACCTATGCCGA TGCCTTTAAGGGTCGGGTACGATGACGAGAGACACCT CCATATCAACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGATTGAGG AGTGACGATACGGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGACTA CGGCGATTATGGCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACTA CAGTAACCGTTTCCAGC
48	CD70A Аминокислотная последовательность scFv (линкер подчеркнут)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR <u>ASKSVSTSGYSEMH</u> WY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFLTISSL QAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK <u>GGGGSGGGG</u> <u>SGGGSGQVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> SCKASGYTFTN YGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRV TMTRDTSISTAYMELSR LR SDDTAVYYCARDYGDYGM YWGQGT TV VSS
49	CD70B Нуклеотидная последовательность scFv	CAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAA AACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCC GGTTATACGTTACGAACTACGGGATGAATTGGGTTCG CCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGG ATAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGACGC TTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCGATAACCAGCA

		TATCCACCGCATAACATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTCA GACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGGACTATGG CGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGACTG TAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGG GGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGGTGACATAGTTATG ACCCAATCCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGA GAGGGCAACGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTT CAACGAGCGGATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAA AAACCCGGACAACCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGC TTCAAATCTTGAGTCTGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGG TAGTGGAAGCGGAAGTACTTTACGCTCACGATCAGTT CACTGCAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAG CACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCAC GAAAGTAGAAATAAA
50	CD70B Аминокислотн ая последователь ность scFv (линкер подчеркнут)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYGMNWVR QAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADAFKGRVTMTRDTSI STAYMELSRRLSDDTAVYYCARDYGDYGM ^Y WGWGQGT VTVSSGGGGSGGGSGGGSGDIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL ESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQHSREV PWTFGQGTKVEIK
51	CD70 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYGMNWVR QAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADAFKGRVTMTRDTSI STAYMELSRRLSDDTAVYYCARDYGDYGM ^Y WGWGQGT VTVSS
52	CD70 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFLTISL QAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK
53	Линкер	GGGGSGGGSGGGGSG
54	BCMA rAAV	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTC CATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGAGATGT AAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAG TAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGA

	TTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCT CCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACA TACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGT TGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGC TTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCC AGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTA AATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCAT TTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTG AACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGA TAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGC AGCTGGTTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATG AGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTG TCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGC AAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTC TTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGT ACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTC TGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAATGTGTCA CAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGT GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCC CGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGT GCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTG ATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGG GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTT CTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTG CAGTACGTGATTCTTGATCCCAGCTTCGGGTTGGAAG TGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCC CTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGGCGCT GGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC TGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAT TTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGAT AGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTAT TTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTG
--	---

		CGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGA GCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAG CTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCG TGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTC GGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCC GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGG AAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGA CTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATT AGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGG GGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAG TGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATC TTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGACCACCATGGCGCTT CCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCTC CACGCAGCAAGGCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCG GAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTGAAGGT GAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCCTGACCAACTAC GTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCGGCCAAAGGCT GGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGACCTGA CCAAGTACAGCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATC ACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGAGCT GAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACT GTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGG GGCCAGGGCACAAACAGTGACCGTCAGCAGCGGCGGGCG GAGGCAGCGGCGGCGGCGGCGGAGGCGGAAG CGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCG TGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGCT AGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACACCCACCT GCACTGGTACCAGCAGAGACCCGGACAGGCTCCCAGG CTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGT GCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACT TTACCCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCGAGGACTTC GCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTTA
--	--	---

CACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAGTG
CTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGA
CCACGACTCCC GCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCC
ACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCA
TGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATAACGAGGGG
CTTGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTT
GGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACCTCGTTAT
TACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCA
GAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG
AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTA
GCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGA
ACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGG
CATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTG
AATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAA
ACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCC
CGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAAC
TCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAAT
AGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCAC
GATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGA
TACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCA
GATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTG
TGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTG
CATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCAGAA
GACACCTTCTTCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGG
TGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAG
GTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTC
CTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAA
ACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGC
AGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGA
GAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGT
CTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGA
CTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAG
CCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTG
CCAAAAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACG
CAGTCACTCATTAAACCACCAATCACTGATTGTGCCGG

		<p>CACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATT CTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCC AAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTT GAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAG GGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCT ACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGA CAGGAGCTCAATGAGAAAGGTAACCACGTGCGGACCG AGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGAT GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCGGGC TTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG</p>
55	BCMA RHA-LHA	<p>GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTA TATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGT GTTCTGATTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGA GCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATG CCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAG CCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTAC AGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTA CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGAT CCTATTAATAAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGC CCTGCATTTACAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCT GGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCA AGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCAT CACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATA AAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC GCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGT TGGGGCAAAGAGGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTG ATCCTCTTGTCACACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGC CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATG TGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC AAAACGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCT CCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACA</p>

GTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAA
CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA
AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGG
TGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGA
ACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG
GTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTT
ACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACT
GGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTT
GGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG
AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTG
GGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTT
CGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATT
TAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG
CAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC
TGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGG
CCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGC
CTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCG
CCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC
CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGC
TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACG
CGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACAC
AAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCCTCAGCCGTCGCTTCA
TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCT
CGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG
TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACA
CTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCAC
TTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTT
GGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCA
AAGTTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACCATG
GCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTGGCGCTG
TTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTGCAGCTGGTGCA
GAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTG
AAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCCTGACCA
ACTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCGGCCAA

AGGCTGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGA
CCTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTG
ACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTG
TACTACTGTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGA
CCCCTGGGGCCAGGGCACAAACAGTGACCGTCAGCAGC
GGCGGGCGGAGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCGGGCGGAG
GCGGAAGCGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCAC
ACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCT
GCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAA
CACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCGGACAGG
CTCCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGTTC
TCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGG
CACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCG
AGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCCAC
ATCCCTTACACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGC
CAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACAC
CCGCTCCCACCATCGCCTCTAACCTCTTAGTCTTCGCC
CCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTTCAT
ACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGG
GCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGGCGTCCTTTTGTGTCA
CTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAA
CGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACC
ATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATG
GCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGG
ATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACG
CTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAAC
GAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCT
TGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGT
AAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACA
ATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTC
AGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAA
GGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAAC
CAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGC

		<p>GAGGCGGAAGCGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGC CACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCT CCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGC AACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCGGACA GGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGT TCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGC GGCACCGACTTTACCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTC CGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCC ACATCCCTTACACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAG ATCAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCA GCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCGCGCCCTCCGAC ACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCG CCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTT ATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTT GGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGT CACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCA AACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAA CCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGA TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGA GGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCGAAGCGCAGA CGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATA ACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTG CTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGG GTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTA CAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTAC TCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAA AAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCA ACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCT GCCTCCAGA</p>
57	Аминокислотная последовательность ВСМА CAR	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAELKKPGASV KVSCKASGNTLTNYVIHWVRQAPGQRLEWMGYILPYND LTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSLRSEDNAVYYC TRWDWDGFFDPWGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSE IVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHWY QQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTDFTLTISSV</p>

		ESEDFAVYYCSQTSHPYTFGGGTKLEIKSAAAFVPVFLPA KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
58	BCMA Нуклеотидная последовательн ость scFv	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGA AGCCCGGAGCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAG CGGCAACACCCTGACCAACTACGTGATCCACTGGGTGA GACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCTA CATCCTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGA AGTTCCAGGGCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAG CGCCTCCACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGA GCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTACAAGGTGGGAC TGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCAGGGCACAAC AGTGACCGTCAGCAGCGGCGGCGGAGGCAGCGGCGGC GGCGGCAGCGGCGGAGGCGGAAGCGAAATCGTGATGA CCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAG AGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGT GCACAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAGC AGAGACCCGGACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGC GTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAG CGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCA GCAGCGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGC AGCCAGACCAGCCACATCCCTTACACCTTCGGCGGCGG CACCAAGCTGGAGATCAAA
59	BCMA Аминокислотн ая последователь ность scFv (линкер подчеркнут)	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKKASGNTLTNYVIHWVR QAPGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSAS TAYMELSSLRSED ^{AVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTTVT} VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERASIS CRASQSLVHSNGNTHLHWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSE V ^{PARFSGSGGTDFLT} ISSVESEDFAVYYCSQTSHPYTFG GGTKLEIK
60	BCMA VH	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKKASGNTLTNYVIHWVR

		QAPGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTTVT VSS
61	BCMA VL	EIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHW YQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTDFTLTISS VESEDFAVYYCSQTSHIPYTFGGGKLEIK
62	CD70 CDR1 VL (Kabat)	RASKSVSTSGYSFMH
63	CD70 CDR1 VL (Chothia)	<u>SKSVSTSGYSF</u>
64	CD70 CDR2 VL (Kabat)	LASNLES
65	CD70 CDR2 VL (Chothia)	LAS
66	CD70 CDR3 VL (Kabat)	QHSREVPWT
67	CD70 CDR3 VL (Chothia)	SREVPW
68	CD70 CDR1 VH (Kabat)	NYGMN
69	CD70 CDR1 VH (Chothia)	GYTFTNYGMN
70	CD70 CDR2 VH (Kabat)	WINTYTGEPTYADAFKG
71	CD70 CDR2 VH (Chothia)	NTYTGE
72	CD70 CDR3 VH (Kabat)	DYGDYGMDY
73	CD70 CDR3 VH	CARDYGDYGMDYWG

	(Chothia)	
74	BCMA CDR1 VL (Kabat)	RASQSLVHSNGNTHLH
75	BCMA CDR1 VL (Chothia)	RASQSLVHSNGNTHLH
76	BCMA CDR2 VL (Kabat)	SVSNR
77	BCMA CDR2 VL (Chothia)	SVSNR
78	BCMA CDR3 VL (Kabat)	SQTSHIPYT
79	BCMA CDR3 VL (Chothia)	SQTSHIPYT
80	BCMA CDR1 VH (Kabat)	NYVIH
81	BCMA CDR1 VH (Chothia)	GNTLTNY
82	BCMA CDR2 VH (Kabat)	YILPYNDLTKYSQKFQG
83	BCMA CDR2 VH (Chothia)	LPYNDL
84	BCMA CDR3 VH (Kabat)	WDWDGFFDP
85	BCMA CDR3 VH	WDWDGFFDP

	(Chothia)	
86	Целевая последовательность TRAC	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC
87	CAR к CD33 rAAV	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTC CATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGAGATGT AAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAG TAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGA TTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCT CCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACA TACCATAAACCTCCCATTTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGT TGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGC TTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCC AGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTA AATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCAT TTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTG AACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGA TAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGC AGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATG AGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTG TCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGC AAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTC TTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGT ACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTC TGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCA CAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAggctccggtgccgt cagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttggggggaggggtcgga attgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgctgtactg gtccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaac gtctttttcgcaacggggttgccgccagaacacagtaagtccggtgtgtgggtcccgagg gcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattactccactggctgcagtacg tgattcttgatcccagcttcggggttgaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaa

		<p> ggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgcccgcgtg cgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgctttcgataagtctctagccatttaaatttt tgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagtcttgaatgcgggccaagatctgc acactggattttcggtttttggggccgcgggcgggcagcggggcccgtgctcccagcgca catgttcggcgaggcggggcctgagcgcggccaccgagaatcgagcgggggtagtc tcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgctgtatgccccgcctgg gcggcaaggctggcccggcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccgg ccctgctgcagggagctcaaagtggaggacgcggcgctcgggagagcggggcggtgag tcaccacacaaaggaaaaggcctttccgtcctcagccgtcgttcatgtgactccacgga gtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagtctcagcctttggagtacgtcgtcttagg ttggggggaggggtttatgcatggagtttcccacactgagtggtggagactgaagtta ggccagcttggcactgatgaattctccttgaattgcccttttgagttggatcttggctcatt ctcaagcctcagacagtgggtcaaagttttttcttccatttcaggtgctgtaCCACCAT GGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCT GTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGAAATCGTCCTCACAC AATCCCCGGGGAGCCTCGCAGTCAGTCCTGGGGAACGA GTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTGTTTTTTC TCAAGTAGCCAGAAGAACTACCTCGCATGGTACCAACA AATACCGGGGCAATCTCCCCGCTTGCTTATATACTGGG CAAGTACCCGCGAATCCGGCGTACCGGATCGATTCACG GGATCTGGGTCAGGTAAGTACTGATTTCACTTTGACTATCAGC TCTGTTACGCCTGAAGATTTGGCAATTTACTACTGTCAC CAATACTTGAGTAGCCGAACCTTCGGCCAGGGCACGAA GCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGAGGTTCTGGTGGG GGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAAGTACAGTTGCA ACAGCCAGGGGCGGAGGTCGTAAAACCTGGGGCGTCT GTCAAGATGAGCTGTAAAGCAAGTGGATACACCTTCAC CTCCTACTATATACATTGGATTAAGCAAACCTCCGGGTC AGGGGCTGGAATGGGTTGGCGTTATATACCCCGGGAAC GATGATATATCATACAACCAAAAATTTCAAGGCAAGGC GACTCTGACTGCCGATAAGAGTAGCACAACAGCTTACA TGCAGCTTTCTTCCCTGACCAGCGAAGATTCAGCAGTTT ACTACTGCGCTCGGGAAGTGCGCCTGCGATACTTTGAT GTCTGGGGTCAAGGAACTACAGTTACTGTATCAAGCAG TGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTAATTTCTCCAGCCAAACC </p>
--	--	--

GACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTC
CCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGG
CATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATAACGAGG
GGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCG
TTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTT
ATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGG
CAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTA
TGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT
AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTG
AACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCG
GCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACT
GAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATA
AACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACC
CCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAA
CTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAA
TAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCA
CGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAG
ATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCC
AGATAATAATAAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGT
GTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTT
GCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGA
AGACACCTTCTTCCCAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTG
GTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCA
GGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACT
CCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAA
AACCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGG
CAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAG
AGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAG
TCTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAG
ACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAA
GCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCT
GCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCAC
GCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCG
GCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAA
AAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCAT

		TCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTC CAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGT TGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAA GGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCC TACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGG ACAGGAGCTCAATGAGAAAGGTAACCACGTGCGGACC GAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGA TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGG CTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG
88	Сигнальный пептид	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
89	Сигнальный пептид	MALPVTALLPLALLHAARP
90	Трансмембран ный домен CD8a	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG G AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN R
91	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACCAAU
92	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGACCAA
93	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCCUAU
94	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC
95	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCAUA

96	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGCAC
97	Спейсер sgRNA CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGUGA
98	Спейсер TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC
99	Спейсер sgRNA β2M	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC
100	Спейсер sgRNA PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACACAU
101	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T3)	U*C*A*CCAAGCCCGCGACCAAU
102	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T4)	A*U*C*ACCAAGCCCGCGACCAA
103	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T7)	C*G*G*UGCGGCGCAGGCCCUAU
104	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T8)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGC
105	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T10)	G*C*C*CGCAGGACGCACCCAUA
106	Спейсер sgRNA CD70 (E3_T10)	G*U*G*CAUCCAGCGCUUCGCAC
107	Спейсер sgRNA CD70 (E1_T3)	C*A*G*CUACGUAUCCAUCGUGA
108	Спейсер TRAC	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC
109	Спейсер	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC

	sgRNA β 2M	
110	Спейсер sgRNA PD-1	C*U*G*CAGCUUCUCCAACACAU
111	sgRNA CD70 (E1_T1) c PAM	TCACCAAGCCCGCGACCAATGGG
112	sgRNA CD70 (E1_T3) c PAM	ATCACCAAGCCCGCGACCAATGG
113	sgRNA CD70 (E1_T4) c PAM	CGGTGCGGCGCAGGCCCTATGGG
114	sgRNA CD70 (E1_T7) c PAM	GCTTTGGTCCCATTGGTCGCGGG
115	sgRNA CD70 (E1_T8) c PAM	GCCCGCAGGACGCACCCATAGGG
116	sgRNA CD70 (E1_T10) c PAM	GTGCATCCAGCGCTTCGCACAGG
117	sgRNA CD70 (E3_T1) c PAM	CAGCTACGTATCCATCGTGATGG
118	sgRNA TRAC c PAM	AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG
119	sgRNA β 2M c PAM	GCTACTCTCTTTCTGGCCTGG
120	sgRNA PD-1 c PAM	CTGCAGCTTCTCCAACACATCGG
121	Нуклеотидная последовательн ость CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAA TATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATT ACCAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTAC AGGTCC
122	TRAC-LHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTA TATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGT GTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGA GCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATG CCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAG CCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTAC

		<p>AGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTA CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGAT CCTATTAATAAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGC CCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCT GGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCA AGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCAT CACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATA AAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC GCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGT TGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTG ATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGC CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATG TGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC AAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCA</p>
123	Промотор EF1 α	<p>GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCC CACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAAT TGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACT GGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCG AGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGC CGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAA CACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGC CTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTACT TCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTC GGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTG TAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTG GCCTGGGGCGCTGGGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGC ACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAG CCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTT TCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTG CACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGA CGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGG GTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCC TCGCGCCGCGTGATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGG</p>

		<p>CTGGCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATG GCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGA GGACGCGGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACC CACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCG CTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGG CACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCT TTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCC CCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTT GGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTG AGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGG TTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA</p>
124	Синтетический сигнал поли(А)	<p>AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGG TTTTTTGTGTG</p>
125	TRAC-RHA	<p>TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTT CAACAACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCTTCCCA GCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGT TTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTC TGGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTC GGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAG AAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACA CGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGA GGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACTGAGTTC CTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACT GCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTG CCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCC CAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAAC CCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCA GGTGTGGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAGGG GTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCC CATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATT GGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACC TTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAA TGCTACTTGAAGATAACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAG AGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAG</p>

		AAAGG
126	Трансмембранный CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
127	Прямой праймер CD70	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGcccaactttccatctcaactcacccaagtg
128	Обратный праймер CD70	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcccctcctgctgtagcgga
129	Инсерционно-делеционная мутация CD70	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG-CAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG
130	Инсерционно-делеционная мутация CD70	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCGAACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG
131	Инсерционно-делеционная мутация CD70	CACACCACGAGGCAGATC-----ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG
132	Инсерционно-делеционная мутация CD70	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG-CCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG
133	Инсерционно-делеционная мутация CD70	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGC-ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG
134	Инсерционно-делеционная мутация CD70	CACACCACGAGGCAGATCACCA-----AGCCCGCAGGACG
135	CAR к CD33 Донор ЛНА-RNA Костимулирующий домен 41BB	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCA GCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAG

		<p>CCCTGCATTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCC TGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCC AAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCC ATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTA TAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGC CCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCT GGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAA CCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGA CCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG ACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAA CAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATC ACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT CAggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatgccacagtccccgagaagtt ggggggaggggtcggaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgg gaaagtgatgctgtactggctccgccttttccgagggtgggggagaaccgtatataag tgcagtatgcccgtgaacgttcttttcgcaacggggttccgccagaacacaggttaagt ccgtgtgtggtcccgcgggcctggcctctttacgggttatggccttgcgtgccttgaatta cttccactggctgcagtacgtgattcttgatcccagcttccgggttggaaagtgggtgggaga gttcgaggccttgcgttaaggagcccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctggg cgctggggccgcccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgctttcgataa gtctctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagtcttga aatgcggggccaagatctgcacctggtatctgggttttggggccgcccggggcgacggg gcccgtgcgtcccagcgcatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccga gaatcggacggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgc cgtgtatcggcccgcctgggcccgaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcg gaaagatggccgcttccggccctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcggcgctc gggagagcgggcccgggtgagtcaccacacaaaggaaaaggcctttccgtcctcagcc gtcgttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcga gcttttggagtacgtcgtcttttaggttggggggaggggtttatgcgatggagttccccaca ctgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgaattctccttgaattg ccctttttagtttggatcttgggtcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttctcca ttcaggtgctgtaCCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTG CTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCC GGAAATCGTCCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCGCAG TCAGTCCTGGGGAACGAGTCACTATGAGCTGCAAATCC</p>
--	--	--

AGTCAGAGTGTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGAATA
CCTCGCATGGTACCAACAAATACCGGGGCAATCTCCCC
GCTTGCTTATACTGGGCAAGTACCCGCGAATCCGGC
GTACCGGATCGATTACGGGATCTGGGTGAGTACTGA
TTTCACTTTGACTATCAGCTCTGTTGAGCCTGAAGATTT
GGCAATTTACTACTGTCACCAATACTTGAGTAGCCGAA
CTTTCGGCCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGG
AGGGGGAGGTTCTGGTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGA
GGAAGCCAAGTACAGTTGCAACAGCCAGGGGCGGAGG
TCGTAAAACCTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAA
GCAAGTGGATACACCTTCACCTCCTACTATATACATTG
GATTAAGCAAACCTCCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTT
GGCGTTATATACCCCGGGAACGATGATATATCATAAA
CCAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCCGATA
AGAGTAGCACAAACAGCTTACATGCAGCTTTCTTCCCTG
ACCAGCGAAGATTCAGCAGTTTACTACTGCGCTCGGGA
AGTGCGCCTGCGATACTTTGATGTCTGGGGTCAAGGAA
CTACAGTTACTGTATCAAGCAGTGCTGCTGCCTTTGTCC
CGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCC
CCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCACCATCGCCTCTCA
ACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCG
CCGGGGGTGCTGTTCATAACGAGGGGCTTGACTTCGCT
TGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTG
CGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTG
TAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTC
CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACA
AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTT
CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAA
GTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAG
GACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGC
CGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGA
GAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAA
TCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGAT
AAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGG
GCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTA

		<p>CCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGAT GCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATA AAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTT TTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAA ACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTC TTCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGC AGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCC CAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATT GGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCTCT TTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCA GAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGG TGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCC AACTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTT GCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTT CTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAA AAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTC ACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACAT GAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGT CAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATCTAG TTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAT AACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGA AAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCT CTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCA AGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGG AGCTCAATGAGAAAGG</p>
136	<p>CAR к CD33 Костимулирую щий домен 41BB</p>	<p>CCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCC TTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGGAATCGT CCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCGCAGTCAGTCCTG GGGAACGAGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAG TGTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGAACTACCTCGCAT GGTACCAACAAATACCGGGGCAATCTCCCCGCTTGCTT ATATACTGGGCAAGTACCCGCGAATCCGGCGTACCGG ATCGATTCACGGGATCTGGGTCAGGTA CTGATTTCACT TTGACTATCAGCTCTGTT CAGCCTGAAGATTTGGCAATT</p>

		<p>TACTACTGTCACCAATACTTGAGTAGCCGAACTTTCGG CCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGA GGTCTGGTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCC AAGTACAGTTGCAACAGCCAGGGGCGGAGGTCGTAAA ACCTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAAGCAAGTG GATACACCTTCACCTCCTACTATATACATTGGATTAAG CAAACCTCCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTTGGCGTTAT ATACCCCGGGAACGATGATATATCATACAACCAAAAAT TTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCCGATAAGAGTAGC ACAACAGCTTACATGCAGCTTTCTTCCCTGACCAGCGA AGATTCAGCAGTTTACTACTGCGCTCGGGAAGTGCGCC TGCGATACTTTGATGTCTGGGGTCAAGGAACTACAGTT ACTGTATCAAGCAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTT CTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCC GCCCGCGCCC TCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTA GTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGT GCTGTTCATAACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATAT TTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCC TTTTGTTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACA GGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATAT ATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTC AAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA AGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCC CGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGA ATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAG GAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACC CGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCA AGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATG GCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAAC GACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGG GTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGC ATATGCAGGCCCTGCCTCCAGATAATAATAAAAATCGC TATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG</p>
137	scFv	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLA

	к CD33 Линкер подчеркнут	WYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQPEDLAIYYCHQYLSRFTFGQGTKLEIK <u>GGGGGSGGG</u> <u>GSGGGGSQVQLQQPGA</u> EVVKPGASVKMSCKASGYTFTS YYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNQKFQGKATL TADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVW GQGTTVTVSS
138	scFv к CD33	GAAATCGTCCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCGCAGT CAGTCCTGGGGAACGAGTCACTATGAGCTGCAAATCCA GTCAGAGTGTTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGAACTAC CTCGCATGGTACCAACAAATACCGGGGCAATCTCCCCG CTTGCTTATATACTGGGCAAGTACCCGCGAATCCGGCG TACCGGATCGATTCACGGGATCTGGGTCAGGTAAGTATG TTCACCTTGACTATCAGCTCTGTTCAGCCTGAAGATTTG GCAATTTACTACTGTCACCAATACTTGAGTAGCCGAAC TTTCGGCCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGA GGGGGAGGTTCTGGTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGAG GAAGCCAAGTACAGTTGCAACAGCCAGGGGCGGAGGT CGTAAAACCTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAAG CAAGTGGATACACCTTCACCTCCTACTATATACATTGG ATTAAGCAAACCTCCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTTG GCGTTATATAACCCCGGGAACGATGATATATCATAACAAC CAAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCCGATAA GAGTAGCACAACAGCTTACATGCAGCTTTCTTCCCTGA CCAGCGAAGATTCAGCAGTTTACTACTGCGCTCGGGAA GTGCGCCTGCGATACTTTGATGTCTGGGGTCAAGGAAC TACAGTTACTGTATCAAGC
139	CAR к CD33 Костимулирую щий домен 41BB	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGSLAVSPGERVT MSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSR FTFGQGTKLEIKGGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQPGA EVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWV GVYIPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLT SEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSAAAFV PVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG

		LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
140	VH антитела к CD33 CDR подчеркнуты и выделены жирным шрифтом	QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFT <u>SYYIHWIKQ</u> TPGQGLEWVG <u>VIYPGNDDISYNQKFQ</u> GKATLTADKSSTT AYMQLSSLTSEDSAVYYCARE <u>EVRLRYFDV</u> WGQGT TV TV SS
141	VL антитела к CD33 CDR подчеркнуты и выделены жирным шрифтом	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC <u>KSSQSVFFSSQKNYLA</u> WYQQIPGQSPRLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQPEDLAIYYC <u>HOYLSSRT</u> FGQGTKLEIK
142	Антитело к CD33 CDR1 VH (Kabat)	<u>SYYIH</u>
143	Антитело к CD33 ‘ CDR2 VH (Kabat)	<u>VIYPGNDDISYNQKFQ</u> G
144	Антитело к CD33 CDR3 VH (Kabat)	<u>EVRLRYFDV</u>

145	Антитело к CD33 CDR1 VL (Kabat и Chothia)	<u>KSSQSVFFSSSQKNYLA</u>
146	Антитело к CD33 CDR2 VL (Kabat и Chothia)	<u>WASTRES</u>
147	Антитело к CD33 CDR3 VL (Kabat и Chothia)	<u>HQYLSSRT</u>
148	CAR к CD19 CD8[tm]-CD28[костимулирующий домен]-CD3z)	ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTC CTCATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGA CTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGAC CGAGTAAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAG CAAATACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAA CGGTAAAACCTCATCTATCATACTCAAGGTTGCATT CCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGA ACTGACTATTCCCTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGA GGACATTGCGACATATTTTTGTCAACAAGGTAATACCC TCCCTTACACTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATT ACCGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGG AGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAG AGCGGCCCCGGTCTCGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCTC TGTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATT ATGGCGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGGT CTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAAC GTATTATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCTTGACGATAA TAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAATG

		AACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATATATTATTG TGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGTTACGCGATGG ATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGTACAGTCAGTAGT GCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCG ACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCC CACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGC ATGCCGACCCGCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGG GCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGT TGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTTA TTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGG AGTAGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCT CGCCGGCCTGGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTA TGCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAG TGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAG CAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAAGTGAATTTGGG ACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGG GGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAA GAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAG GATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGA AGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCT CTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACG ATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA
149	CAR к CD19 CD8[tm]- CD28[костимул ирующий домен]-CD3z) аминокислоты	MLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNLTPYTFGG GTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPS QSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWVWSE TTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYC AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAFVPVFLPAKP TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRL HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

150	scFv к CD19	GATATTCAGATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGC CTCACTGGGAGACCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAA GTCAAGACATTAGCAAATACCTCAATTGGTACCAGCAG AAGCCCGACGGAACGGTAAAACCTCATCTATCATA GTCAAGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAG GTTCTGGGAGCGGAACTGACTATTCCTTGACTATTTCAA ACCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTGTCAA CAAGGTAATACCCTCCCTTACACTTTCGGAGGAGGAAC CAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGA AGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGT GAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCGGTCTCGTTGCCCCCA GTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTA TCATTGCCTGATTATGGCGTCTCCTGGATAAAGGCAGCC CCC CGAAAGGGTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGG GCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAGT CGCTTGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGT TTTCCTTAAAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCG CTATATATTATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTA GTTACGCGATGGATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGTC ACAGTCAGTAGT
151	Аминокислотная последовательность scFv к CD19 Линкер подчеркнут	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGS <u>TKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI</u> <u>RQPPRKGLEWLGVWVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ</u> <u>VFLKMNSLQTD</u> DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSS
152	VH антитела к CD19	EVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVT VSS
153	VL антитела к CD19	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT
154	Линкер scFv к CD19	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
155	rAAV CAR к CD19	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCCCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTC CATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGAGATGT AAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAG TAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGA TTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCT CCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACA TACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGT TGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGC TTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCC AGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTA AATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCAT TTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTG AACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGA TAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCAGTCCATCACGAGC

AGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATG
AGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTG
TCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGC
AAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTC
TTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGT
ACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTC
TGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCA
CAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAC
TGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGT
GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCC
CGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGT
GCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTG
ATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGG
GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTT
CTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG
TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG
TTATGGCCCTTGC GTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTG
CAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAG
TGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCC
CTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCT
GGGGCCGCCGCGTGC GAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC
TGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAT
TTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGAT
AGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTAT
TTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTG
CGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGA
GCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAG
CTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCG
TGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTC
GGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCG
GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCG
CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGG
AAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGA
CTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATT
AGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGG
GGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAG
TGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT
GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATC
TTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
TTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGACCACCATGCTTCTTT
TGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCCATCCAG
CGTTCCTGCTGATCCCCGATATTCAGATGACTCAGACCA
CCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGACCGAGTAACA
ATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCT
CAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACGGTAAAA
CTCCTCATCTATCATAAGTCAAGGTTGCATTCCGGAGTA
CCGTCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGAACTGACTA
TTCTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGACATTG
CGACATATTTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCTTACA
CTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTCC
ACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCC
CACTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCC

GGTCTCGTTGCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGC
 ACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGCGTCTCC
 TGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGGTCTTGAATGGCT
 TGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATTATAACT
 CCGCTCTCAAAAGTCGCTTGACGATAATAAAAGATAAC
 TCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAATGAACAGTTTGCA
 GACTGACGATACCGCTATATATTATTGTGCTAAACATT
 ATTACTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGG
 CAGGGGACTTCTGTCACAGTCAGTAGTGCTGCTGCCTTT
 GTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCC
 CGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCT
 CTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCC
 GCCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTT
 CGTTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTAC
 GTGCGGCGTCCTTTTGTGTGCACTCGTTATTACTTTGTA
 TTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTTGT
 TGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGCCGGCCTG
 GGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCCCCCA
 CGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCAGTGAAGTTTTTC
 CCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAG
 AATCAGCTGTATAACGAACCTGAATTTGGGACGCCGCGA
 GGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGAC
 CCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCC
 AAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGAT
 GCGGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAA
 CGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAG
 GGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTG
 CATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCG
 CTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG
 TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTT
 CAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCA
 GCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGT
 TTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTC
 TGGTCAATGATGTCTAAAACCTCTGATTGGTGGTCTC
 GGCCTTATCCATTGCCACCAAACCCCTTTTTTACTAAG
 AACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACA
 CGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGA
 GGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCTGAGTTC
 CTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACT
 GCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTG
 CCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTCC
 CAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAAAC
 CCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCA
 GGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAGGG
 GTGTGCCAGAGGAAGCACCATCTAGTTGGGGGAGCC
 CATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCAAATAACTTCAGATT
 GGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACC
 TTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAA
 TGCTACTTGAAGATAACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAG
 AGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAG
 AAAGGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTC
 CTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC

		TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC AAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
156	LHA-RHA CAR к CD19	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTA TATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGT GTTCTGATTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGA GCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATG CCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAG CCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTAC AGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTA CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGAT CCTATTAATAAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGC CCTGCATTTACAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCT GGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCA AGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCAT CACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATA AAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC GCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGT TGGGGCAAAGAGGGGAAATGAGATCATGTCTAACCCCTG ATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGC CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATG TGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC AAAAGTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCT CCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACA GTCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAA CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA AAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGG TGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGA ACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG GTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTT ACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACT GGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCAGCTTCGGGTT GGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG AGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTG GGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTT CGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATT TAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG CAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCCGGGCGGCGACGGGG CCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGC CTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCG CCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGC TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACG CGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACAC AAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCA TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCT CGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACA CTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCAC

TTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTT
GGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCA
AAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGACCACCATG
CTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCCTC
ATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGACTC
AGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGACCGA
GTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAA
ATACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACGG
TAAACTCCTCATCTATCATACTCAAGGTTGCATTCCG
GAGTACCGTCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGAACT
GACTATTCCTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGA
CATTGCGACATATTTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCC
TTACACTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTACCG
GGTCCACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAA
GGTTCCTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCG
GCCCCGGTCTCGTTGCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAA
CGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGC
GTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGGTCTTGA
ATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATT
ATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCTTGACGATAATAAAA
GATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAATGAACAG
TTTGCAGACTGACGATACCGCTATATATTATTGTGCTAA
ACATTATTACTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATT
GGGGGCAGGGGACTTCTGTACAGTCAGTAGTGCTGCT
GCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACG
ACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCAT
CGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCG
ACCCGCCCGCGGGGGTGTCTGTTTCATACGAGGGGCTTGG
ACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGG
GTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTTGCTACTCGTTATTACTT
TGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGG
TTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGCCGG
CCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCC
CCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGAAGT
TTTCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGA
CAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCG
CGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGA
GACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATC
CCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAA
GATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGC
GAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACC
AAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGC
ACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAA
ATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTG
TGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACG
CCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCC
CCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGC
TGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAG
CTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCTGATTGGTGGT
CTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCCTTTTTTACT
AAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATG
ACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGA

		GAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGT TCTGCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTGCCCCTTA CTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGT TGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAATCTTT CCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATT ACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCAC CAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAG GGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAG CCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGA TTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTA CCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGA AATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGG AGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATG AGAAAGG
157	sgRNA CD70 (E1_T1)	TCACCAAGCCCGCGACCAAT
158	sgRNA CD70 (E1_T3)	ATCACCAAGCCCGCGACCAA
159	sgRNA CD70 (E1_T4)	CGGTGCGGCGCAGGCCCTAT
160	sgRNA CD70 (E1_T7)	GCTTTGGTCCCATTGGTCGC
161	sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCATA
162	sgRNA CD70 (E1_T10)	GTGCATCCAGCGCTTCGCAC
163	sgRNA CD70 (E3_T1)	CAGCTACGTATCCATCGTGA
164	sgRNA β 2M	GCTACTCTCTTTCTGGCC
165	sgRNA PD-1	CTGCAGCTTCTCCAACACAT
166	CDR1 VL κ CD19 (Kabat)	RASQDISKYLN
167	CDR2 VL κ CD19 (Kabat)	HTSRLHS
168	CDR3 VL κ CD19 (Kabat)	QQGNTLPYT

169	CDR1 VH κ CD19 (Kabat)	DYGVVS
170	CDR2 VH κ CD19 (Kabat)	VIWGSETTYNSALKS
171	CDR3 VH κ CD19 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
172	CDR1 VL κ CD19 (Chothia)	RASQDISKYLN
173	CDR2 VL κ CD19 (Chothia)	HTSRLHS
174	CDR3 VL κ CD19 (Chothia)	QQGNTLPYT
175	CDR1 VH κ CD19 (Chothia)	GVSLPDY
176	CDR2 VH κ CD19 (Chothia)	WGSET
177	CDR3 VH κ CD19 (Chothia)	HYYYGGSYAMDY
178	CDR1 VH κ CD33 (Chothia)	GYTFTSY
179	CDR2 VH κ CD33 (Chothia)	YPGNDD
180	CDR3 VH κ CD33 (Chothia)	EVRLRYFDV

Все ссылочные материалы, патенты и заявки на патенты, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении заявляемого объекта, для которого каждые из них цитируются, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Формы единственного числа, используемые в данном документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как "по меньшей мере один".

Также следует учитывать, что, если явно не указано иное, в любых заявляемых в данном документе способах, которые предусматривают более чем одну(одно) стадию или

действие, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа упоминаются.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как "содержащий", "включающий", "несущий", "имеющий", "содержащий", "вовлекающий", "предусматривающий", "составленный из" и т. п., следует понимать как неограничивающие, то есть означающие включение без ограничения. Только переходные фразы "состоящий из" и "состоящий по сути из" должны быть закрытыми или полужакрытыми переходными фразами, соответственно, как изложено в Руководстве Патентного ведомства США по процедурам патентной экспертизы, раздел 2111.03.

Термины "приблизительно" и "по сути", предшествующие числовому значению, означают $\pm 10\%$ от приведенного числового значения.

Если предоставляется диапазон значений, каждое значение между верхним и нижним концами диапазона конкретно предусматривается и описывается в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированная Т-клетка, содержащая нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который не связывает *CD70*.
2. Сконструированная Т-клетка по п. 1, дополнительно содержащая нарушенный ген константной области Т-клеточного рецептора альфа (TRAC).
3. Сконструированная Т-клетка по п. 1 или п. 2, дополнительно содержащая нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).
4. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 2-3, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.
5. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-4, где CAR содержит эктодомен, который связывает антиген созревания В-клеток (BCMA).
6. Сконструированная Т-клетка по п. 5, где эктодомен содержит антитело к BCMA.
7. Сконструированная Т-клетка по п. 5, где эктодомен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) к BCMA.
8. Сконструированная Т-клетка по п. 7, где scFv к BCMA содержит определяющие комплементарность области (CDR) переменной области тяжелой (VH) цепи и такие же CDR переменной области легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 60, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 61.
9. Сконструированная Т-клетка по п. 7, где scFv к BCMA содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 60 и 61 соответственно.
10. Сконструированная Т-клетка по п. 7, где scFv к BCMA содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.
11. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-4, где CAR содержит эктодомен, который связывает CD33.
12. Сконструированная Т-клетка по п. 11, где эктодомен содержит антитело к CD33.
13. Сконструированная Т-клетка по п. 11, где эктодомен содержит scFv к CD33.
14. Сконструированная Т-клетка по п. 13, где scFv к CD33 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL-цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 140, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 141.
15. Сконструированная Т-клетка по п. 11, где scFv к CD33 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 140 и 141 соответственно.
16. Сконструированная Т-клетка по п. 11, где scFv к CD33 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 137.
17. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-4, где CAR содержит эктодомен, который связывает CD19.
18. Сконструированная Т-клетка по п. 17, где эктодомен содержит антитело к CD19.
19. Сконструированная Т-клетка по п. 17, где эктодомен содержит scFv к CD19.

20. Сконструированная Т-клетка по п. 19, где scFv к CD19 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL-цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 152, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 153.

21. Сконструированная Т-клетка по п. 19, где scFv к CD19 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 152 и 153 соответственно.

22. Сконструированная Т-клетка по п. 19, где scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151.

23. Сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген *TRAC*;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* ;

(iii) нарушенный ген *CD70* и

(iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который связывает CD70.

24. Сконструированная Т-клетка по п. 23, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

25. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 23-24, где CAR содержит эктодомен, содержащий антитело к CD70.

26. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 23-24, где CAR содержит эктодомен, содержащий scFv к CD70.

27. Сконструированная Т-клетка по п. 26, где scFv к CD70 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 51, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 52.

28. Сконструированная Т-клетка по п. 26, где scFv к CD70 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 51 и 52 соответственно.

29. Сконструированная Т-клетка по п. 26, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50.

30. Сконструированная Т-клетка по п. 26, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

31. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-30, где CAR содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB.

32. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-31, где CAR содержит сигнальный домен CD3 ζ .

33. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-32, где CAR содержит трансмембранный домен CD8.

34. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 2-33, где имеется делеция в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками.

35. Сконструированная Т-клетка по п. 34, где делеция составляет 15-30 пар оснований.

36. Сконструированная Т-клетка по п. 34, где делеция составляет 20 пар оснований.

37. Сконструированная Т-клетка по п. 34, где делеция предусматривает SEQ ID NO: 86.

38. Сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*.

39. Сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*.

40. Сконструированная Т-клетка по п. 39, где нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 45.

41. Сконструированная Т-клетка, содержащая:

(i) нарушенный ген *TRAC*, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90% идентичную с SEQ ID NO: 44;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*.

42. Сконструированная Т-клетка по п. 41, где нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 44.

43. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-42, где сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген программируемой гибели клеток-1 (PD-1).

44. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-43, где сконструированная Т-клетка сохраняет цитотоксичность после 5 повторных воздействий целевой клетки, где целевая клетка экспрессирует антиген, специфический к *CAR*.

45. Сконструированная Т-клетка по п. 44, где сконструированная Т-клетка сохраняет цитотоксичность после 10 повторных воздействий целевой клетки.

46. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 40-41, где целевая клетка представляет собой раковую клетку.

47. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат нарушенный ген *CD70* и нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, который не связывает *CD70*.

48. Популяция клеток по п. 47, дополнительно содержащая нарушенный ген *TRAC*.

49. Популяция клеток по п. 47 или п. 48, дополнительно содержащая нарушенный ген *$\beta 2M$* .

50. Популяция клеток по любому из пп. 47-49, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*.

51. Популяция клеток по любому из пп. 47-50, где CAR содержит эктодомен, который связывает антиген созревания В-клеток (BCMA).

52. Популяция клеток по п. 51, где эктодомен содержит антитело к BCMA.

53. Популяция клеток по п. 51, где эктодомен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) к BCMA.

54. Популяция клеток по п. 53, где scFv к BCMA содержит определяющие комплементарность области (CDR) переменной области тяжелой (VH) цепи и такие же CDR переменной области легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 60, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 61.

55. Популяция клеток по п. 53, где scFv к BCMA содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 60 и 61 соответственно.

56. Популяция клеток по п. 53, где scFv к BCMA содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.

57. Популяция клеток по любому из пп. 47-50, где CAR содержит эктодомен, который связывает CD33.

58. Популяция клеток по п. 57, где эктодомен содержит антитело к CD33.

59. Популяция клеток по п. 57, где эктодомен содержит scFv к CD33.

60. Популяция клеток по п. 59, где scFv к CD33 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL-цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 140, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 141.

61. Популяция клеток по п. 59, где scFv к CD33 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 140 и 141 соответственно.

62. Популяция клеток по п. 59, где scFv к CD33 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 137.

63. Популяция клеток по любому из пп. 47-50, где CAR содержит эктодомен, который связывает CD19.

64. Популяция клеток по п. 63, где эктодомен содержит антитело к CD19.

65. Популяция клеток по п. 63, где эктодомен содержит scFv к CD19.

66. Популяция клеток по п. 65, где scFv к CD19 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL-цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 152, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 153.

67. Популяция клеток по п. 65, где scFv к CD19 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 152 и 153 соответственно.

68. Популяция клеток по п. 65, где scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151.

69. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где

сконструированные Т-клетки содержат:

- (i) нарушенный ген *TRAC*;
- (ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* ;
- (iii) нарушенный ген *CD70* и
- (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который связывает CD70.

70. Популяция клеток по п. 69, где CAR содержит эктодомен, содержащий антитело к CD70.

71. Популяция клеток по п. 69, где CAR содержит эктодомен, содержащий scFv к CD70.

72. Популяция клеток по любому из пп. 47-71, где CAR содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB.

73. Популяция клеток по любому из пп. 47-72, где CAR содержит сигнальный домен CD3 ζ .

74. Популяция клеток по любому из пп. 47-73, где CAR содержит трансмембранный домен CD8.

75. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

- (i) нарушенный ген *TRAC*;
- (ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* ;
- (iii) нарушенный ген *CD70*;
- (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий (a) эктодомен, который содержит scFv к CD70, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен CD3z.

76. Популяция клеток по любому из пп. 69-75, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

77. Популяция клеток по любому из пп. 71-76, где scFv к CD70 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 51, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 52.

78. Популяция клеток по п. 77, где scFv к CD70 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 51 и 52 соответственно.

79. Популяция клеток по п. 77, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50.

80. Популяция клеток по п. 77, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

81. Популяция клеток по любому из пп. 48-80, где имеется делеция в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками.

82. Сконструированная Т-клетка по п. 81, где делеция составляет 15-30 пар оснований.

83. Сконструированная Т-клетка по п. 81, где делеция составляет 20 пар оснований.

84. Сконструированная Т-клетка по п. 81, где делеция предусматривает SEQ ID NO:

86.

85. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*.

86. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*.

87. Популяция клеток по п. 86, где нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 45.

88. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90% идентичную с SEQ ID NO: 44;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*.

89. Популяция клеток по п. 88, где нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 44.

90. Популяция клеток по любому из пп. 47-89, где сконструированная Т-клетка сохраняет цитотоксичность после 5 повторных воздействий целевой клетки, где целевая клетка экспрессирует антиген, специфический к *CAR*.

91. Популяция клеток по п. 90, где сконструированная Т-клетка сохраняет цитотоксичность после 10 повторных воздействий целевой клетки.

92. Популяция клеток по любому из пп. 90-91, где целевая клетка представляет собой раковую клетку.

93. Популяция клеток по любому из пп. 49-92, где нарушенный ген *$\beta 2M$* содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 9-14.

94. Популяция клеток по любому из пп. 47-93, где нарушенный ген *CD70* содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 129-134.

95. Популяция клеток по любому из пп. 48-94, где по меньшей мере 90% сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на

обнаруживаемом уровне.

96. Популяция клеток по любому из пп. 47-95, где сконструированные Т-клетки
- (a) характеризуются повышенным клеточным пролиферативным потенциалом;
 - (b) характеризуются повышенным клеточным лизисом;
 - (c) характеризуются пониженным клеточным истощением;
 - (d) сохраняют цитокин-зависимую пролиферацию;
 - (e) характеризуются повышенной секрецией цитокина или
 - (f) характеризуются любой комбинацией из (a) - (e)

по сравнению с контрольными Т-клетками, где контрольные Т-клетки экспрессируют эндогенный белок CD70.

97. Способ, предусматривающий введение субъекту популяции клеток по любому из пп. 47-96.

98. Способ по п. 97, где сконструированные Т-клетки представляют собой сконструированные Т-клетки человека.

99. Способ по п. 97 или п. 98, где у субъекта имеется рак.

100. Способ по п. 99, где рак характеризуется экспрессией CD70, ВМСА, CD19, CD33 или их комбинаций.

101. Способ по любому из пп. 99-100, где популяцию клеток вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения рака.

102. Способ по любому из пп. 99-101, где рак представляет собой солидную злокачественную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

103. Способ по п. 102, где солидная злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, опухоли почки, опухоли легкого и опухоли желудочно-кишечного тракта.

104. Способ по п. 99, где популяцию клеток вводят субъекту в количестве, эффективном для снижения объема опухоли у субъекта.

105. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение субъекту популяции клеток по любому из пп. 47-96.

106. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение субъекту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46;

(ii) нарушенный ген $\beta 2M$ и

(iii) нарушенный ген *CD70*,

за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта.

107. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение субъекту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*,

за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта.

108. Способ по п. 107, где нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 45.

109. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение субъекту популяции клеток, содержащей сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат:

(i) нарушенный ген *TRAC*, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90% идентичную с SEQ ID NO: 44;

(ii) нарушенный ген *$\beta 2M$* и

(iii) нарушенный ген *CD70*,

за счет чего осуществляется лечение рака у субъекта.

110. Способ по п. 109, где нарушенный ген *TRAC* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 44.

111. Способ получения сконструированной Т-клетки, при этом способ предусматривает:

(a) доставку в Т-клетку

РНК-направляемой нуклеазы,

gRNA, нацеливающейся на ген *CD70*, и

вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*; и

(b) получение сконструированной Т-клетки, содержащей нарушенный ген *CD70* и экспрессирующей *CAR*.

112. Способ по п. 111, дополнительно предусматривающий доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген *TRAC*; где сконструированная Т-клетка дополнительно содержит нарушенный ген *TRAC*.

113. Способ по п. 112, где нуклеиновая кислота, кодирующая *CAR*, фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении гена *TRAC*; и где сконструированная Т-клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *CAR*, в гене *TRAC*.

114. Способ по любому из пп. 111-113, дополнительно предусматривающий доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген *$\beta 2M$* ; где сконструированная Т-клетка дополнительно содержит нарушенный ген *$\beta 2M$* .

115. Способ получения сконструированной Т-клетки, при этом способ предусматривает:

(a) доставку в Т-клетку

РНК-направляемой нуклеазы,

gRNA, нацеливающейся на ген *TRAC*,
 gRNA, нацеливающейся на ген *β2M*,
 gRNA, нацеливающейся на ген *CD70*, и
 вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR; и

(b) получение сконструированной Т-клетки.

116. Способ по п. 115, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении локуса гена *TRAC*.

117. Способ по любому из пп. 111-116, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, необязательно нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*.

118. Способ по любому из пп. 112-117, где gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 98 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 118, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 30.

119. Способ по любому из пп. 114-118, где gRNA, нацеливающаяся на ген *β2M*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 99 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 119, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *β2M*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 31.

120. Способ по любому из пп. 111-119, где gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 94 или 95 или нацеливается на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 114 или 115, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26 или 27.

121. Способ по любому из пп. 111-120, где РНК-направляемая нуклеаза и gRNA, объединенные в комплекс, образуют рибонуклеопротеиновую частицу (RNP).

122. Способ получения сконструированной Т-клетки для иммунотерапии против целевой клетки, предусматривающий:

(a) нарушение гена *CD70* в Т-клетке и

(b) экспрессию CAR, который связывается с антигеном, экспрессируемым на целевой клетке, где антиген не является CD70.

123. Способ по п. 122, где целевая клетка представляет собой раковую клетку.

124. Способ по любому из пп. 122-123, где способ выполняют *ex vivo*.

125. Способ по любому из пп. 122-124, дополнительно предусматривающий нарушение гена *TRAC* в Т-клетке.

126. Способ по п. 125, где CAR кодируется нуклеиновой кислотой в нарушенном гене *TRAC*.

127. Способ по любому из пп. 122-126, дополнительно предусматривающий нарушение гена *β2M* в Т-клетке.

128. Способ по любому из пп. 111-127, где CAR содержит эктодомен, который связывает антиген созревания В-клеток (BCMA).

129. Способ по п. 128, где эктодомен содержит антитело к BCMA.

130. Способ по п. 128, где эктодомен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) к BCMA.

131. Способ по п. 130, где scFv к BCMA содержит определяющие комплементарность области (CDR) переменной области тяжелой (VH) цепи и такие же CDR переменной области легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 60, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 61.

132. Способ по п. 130, где scFv к BCMA содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 60 и 61 соответственно.

133. Способ по п. 130, где scFv к BCMA содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.

134. Способ по любому из пп. 111-127, где CAR содержит эктодомен, который связывает CD33.

135. Способ по п. 134, где эктодомен содержит антитело к CD33.

136. Способ по п. 134, где эктодомен содержит scFv к CD33.

137. Способ по п. 136, где scFv к CD33 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL-цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 140, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 141.

138. Способ по п. 136, где scFv к CD33 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 140 и 141 соответственно.

139. Способ по п. 136, где scFv к CD33 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 137.

140. Способ по любому из пп. 111-127, где CAR содержит эктодомен, который связывает CD19.

141. Способ по п. 140, где эктодомен содержит антитело к CD19.

142. Способ по п. 140, где эктодомен содержит scFv к CD19.

143. Способ по п. 142, где scFv к CD19 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL-цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 152, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 153.

144. Способ по п. 142, где scFv к CD19 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 152 и 153 соответственно.

145. Способ по п. 142, где scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 150.

146. Способ по любому из пп. 111-127, где CAR содержит эктодомен, который связывает CD70.

147. Способ по п. 146, где эктодомен содержит антитело к CD70.
148. Способ по п. 146, где эктодомен содержит scFv к CD70.
149. Способ по п. 148, где scFv к CD70 содержит такие же CDR VH и такие же CDR VL, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит VH, изложенную под SEQ ID NO: 51, и VL, изложенную под SEQ ID NO: 52.
150. Способ по п. 148, где scFv к CD70 содержит цепи VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 51 и 52 соответственно.
151. Способ по п. 148, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48 или 50.
152. Способ по п. 148, где scFv к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.
153. Способ по любому из пп. 111-152, где CAR содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB.
154. Способ по любому из пп. 111-153, где CAR содержит сигнальный домен CD3 ζ .
155. Способ по любому из пп. 111-154, где CAR содержит трансмембранный домен CD8.
156. Популяция сконструированных Т-клеток, полученная посредством способа по любому из пп. 111-155.
157. Способ усиления пролиферации Т-клеток, предусматривающий нарушение гена *CD70* в Т-клетках.
158. Способ уменьшения истощения Т-клеток, предусматривающий нарушение гена *CD70* в Т-клетках.
159. Способ по любому из пп. 157-158, где ген *CD70* нарушают путем редактирования генов с помощью CRISPR/Cas.
160. Способ по любому из пп. 157-159, дополнительно предусматривающий нарушение гена *TRAC*, гена $\beta 2M$ или и гена *TRAC*, и гена $\beta 2M$ в Т-клетках.
161. Способ по п. 160, где ген *TRAC*, ген $\beta 2M$ или и ген *TRAC*, и ген $\beta 2M$ нарушают путем редактирования генов с помощью CRISPR/Cas.
162. Сконструированная Т-клетка по п. 5, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57.
163. Сконструированная Т-клетка по п. 162, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 56.
164. Сконструированная Т-клетка по п. 11, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 139.
165. Сконструированная Т-клетка по п. 164, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 136.
166. Сконструированная Т-клетка по п. 17, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149.

167. Сконструированная Т-клетка по п. 166, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 148.

168. Популяция клеток по п. 51, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57.

169. Популяция клеток по п. 168, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 56.

170. Популяция клеток по п. 57, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 139.

171. Популяция клеток по п. 170, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 136.

172. Популяция клеток по п. 63, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149.

173. Популяция клеток по п. 172, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 148.

174. Способ по п. 128, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57.

175. Способ по п. 174, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 56.

176. Способ по п. 134, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 139.

177. Способ по п. 176, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 136.

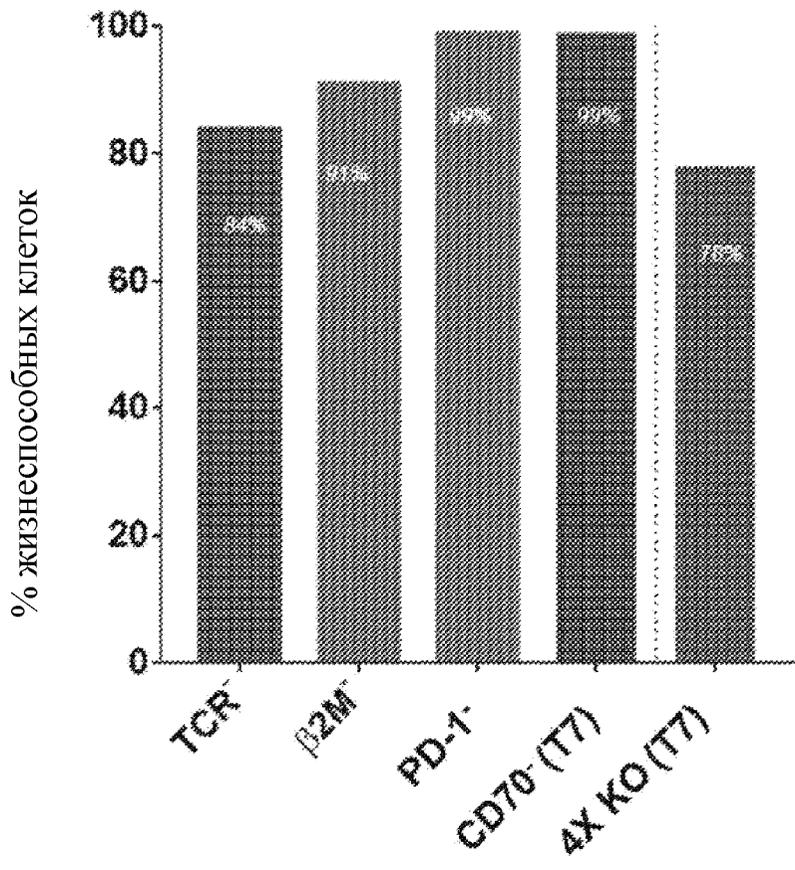
178. Способ по п. 140, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149.

179. Способ по п. 178, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 148.

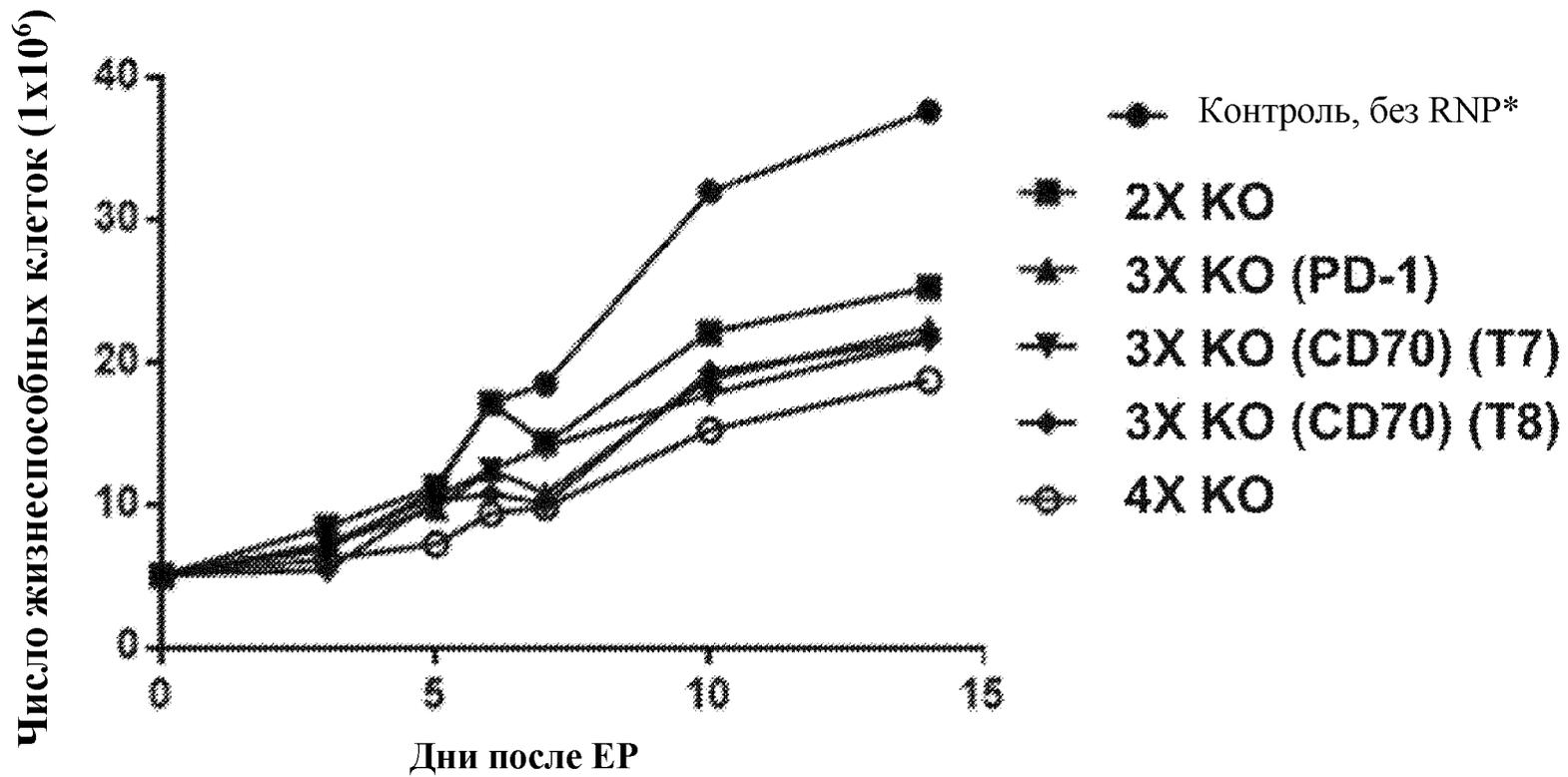
180. Способ по п. 146, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46.

181. Способ по п. 180, где CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 45.

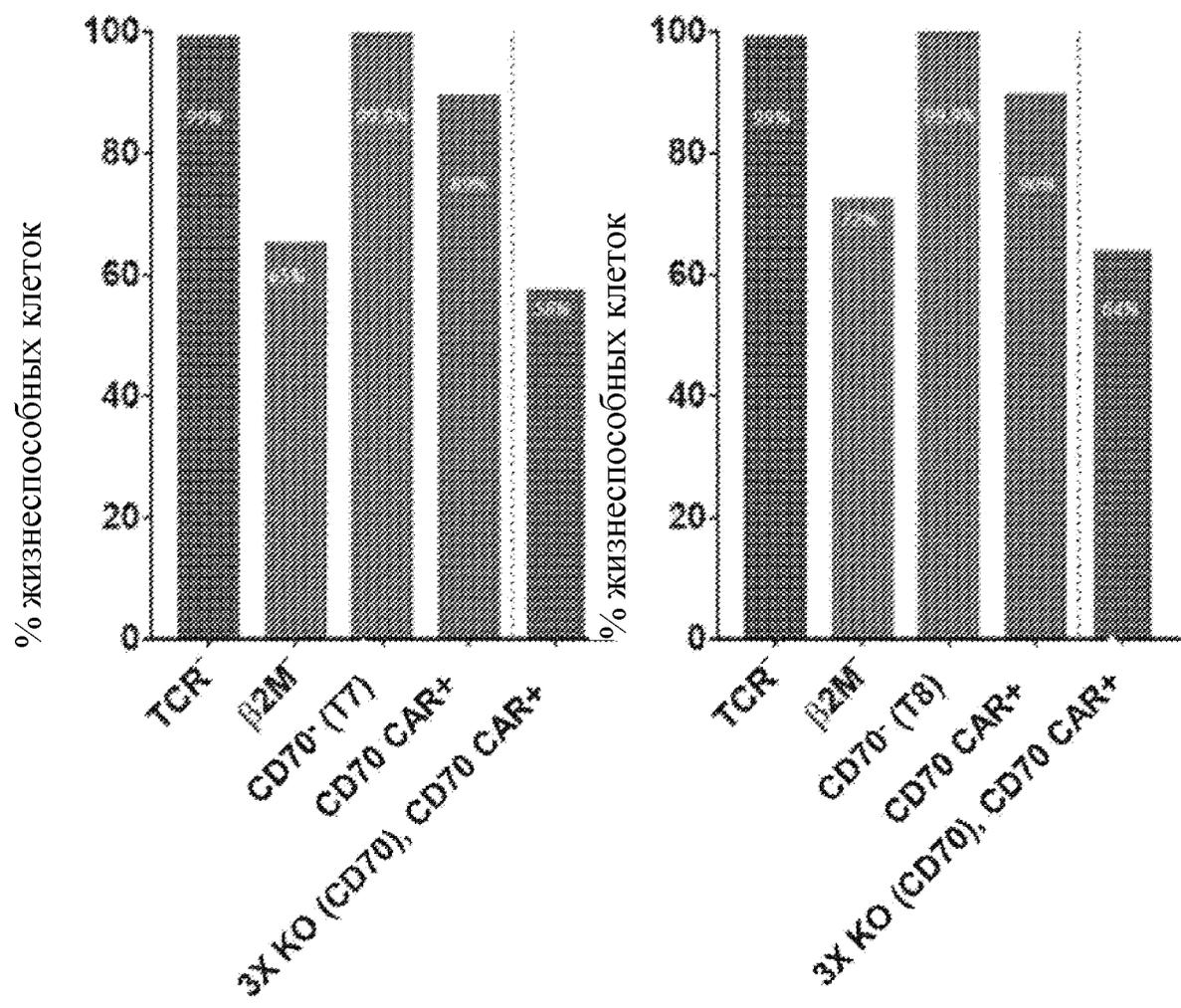
По доверенности



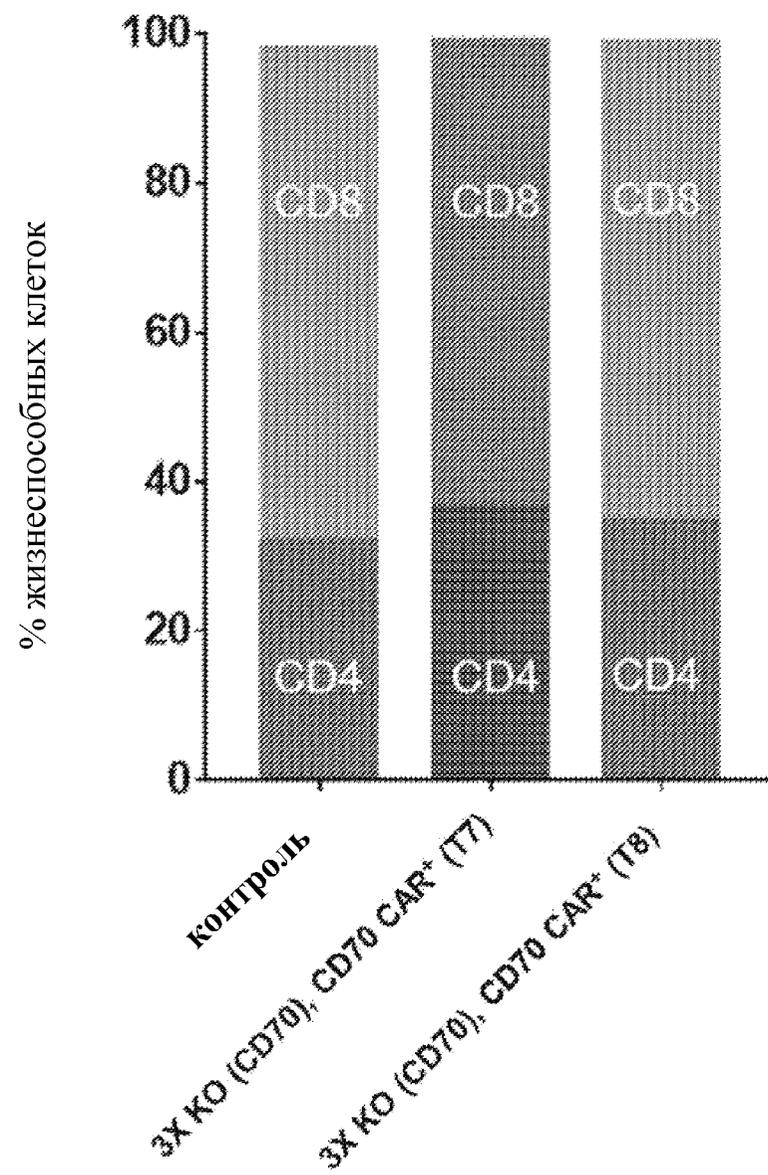
Фиг. 1



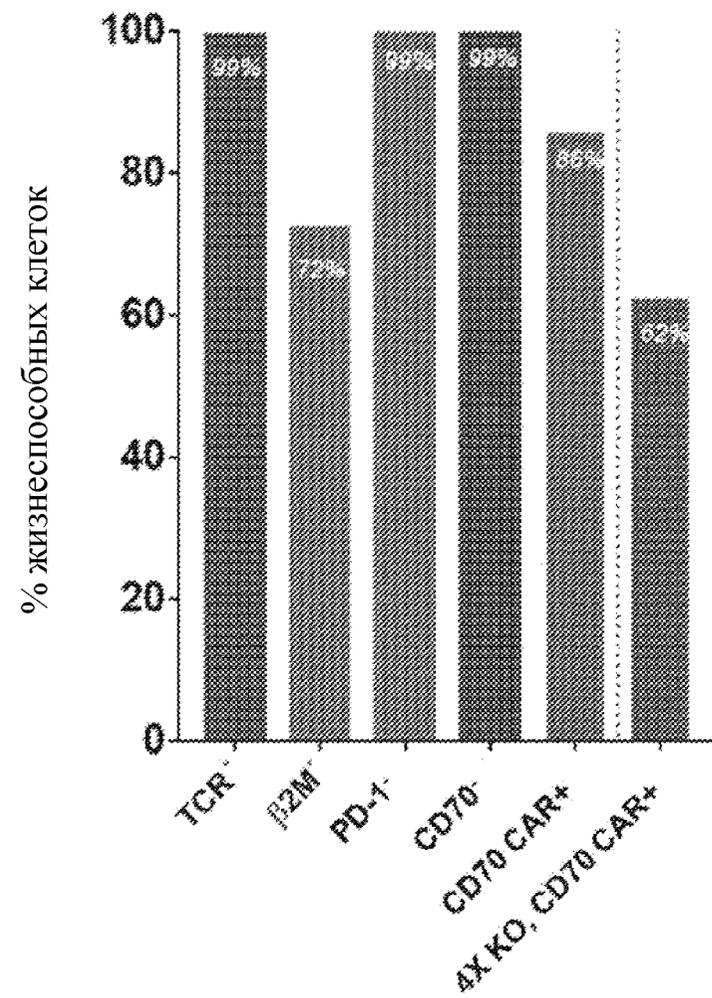
Фиг. 2



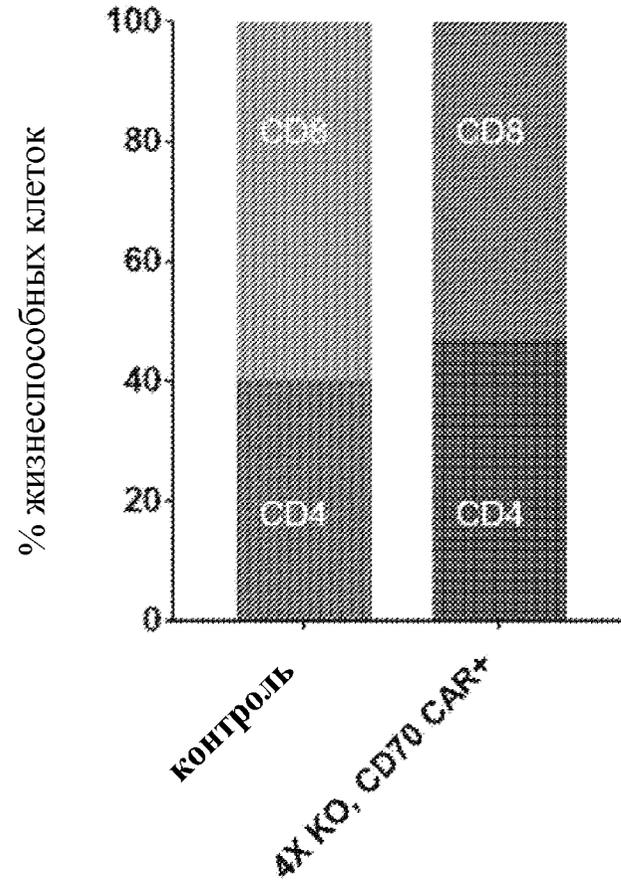
Фиг. 3



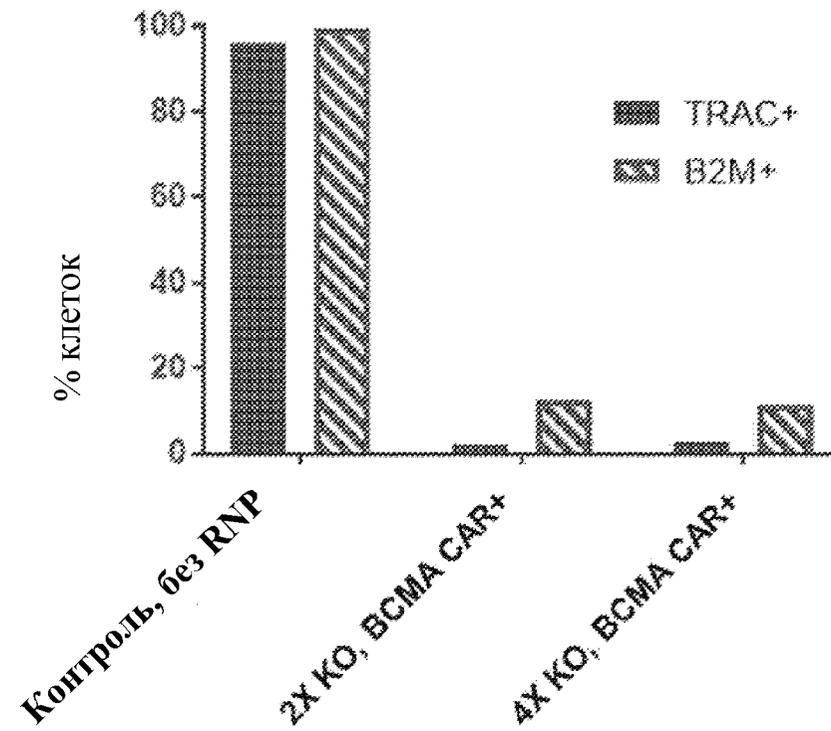
Фиг. 4



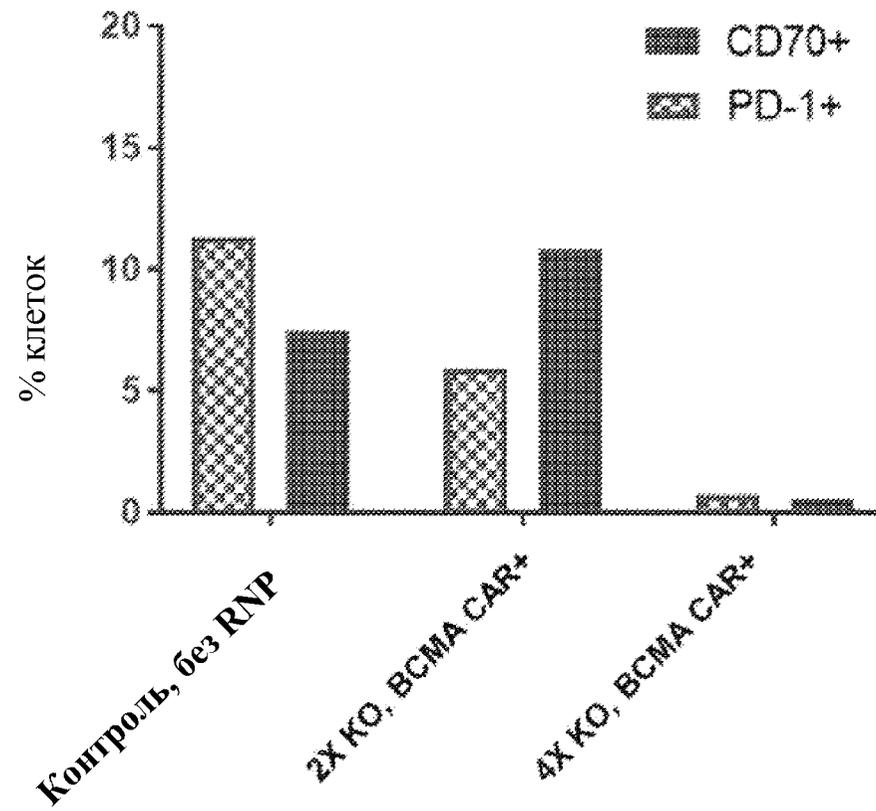
Фиг. 5



Фиг. 6

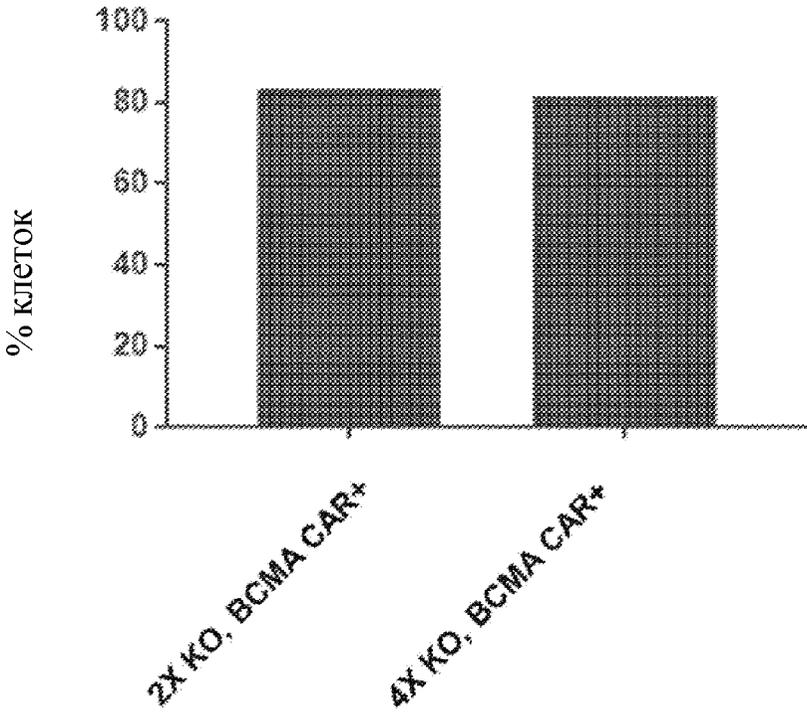


Фиг. 7А



Фиг. 7B

Экспрессия CAR



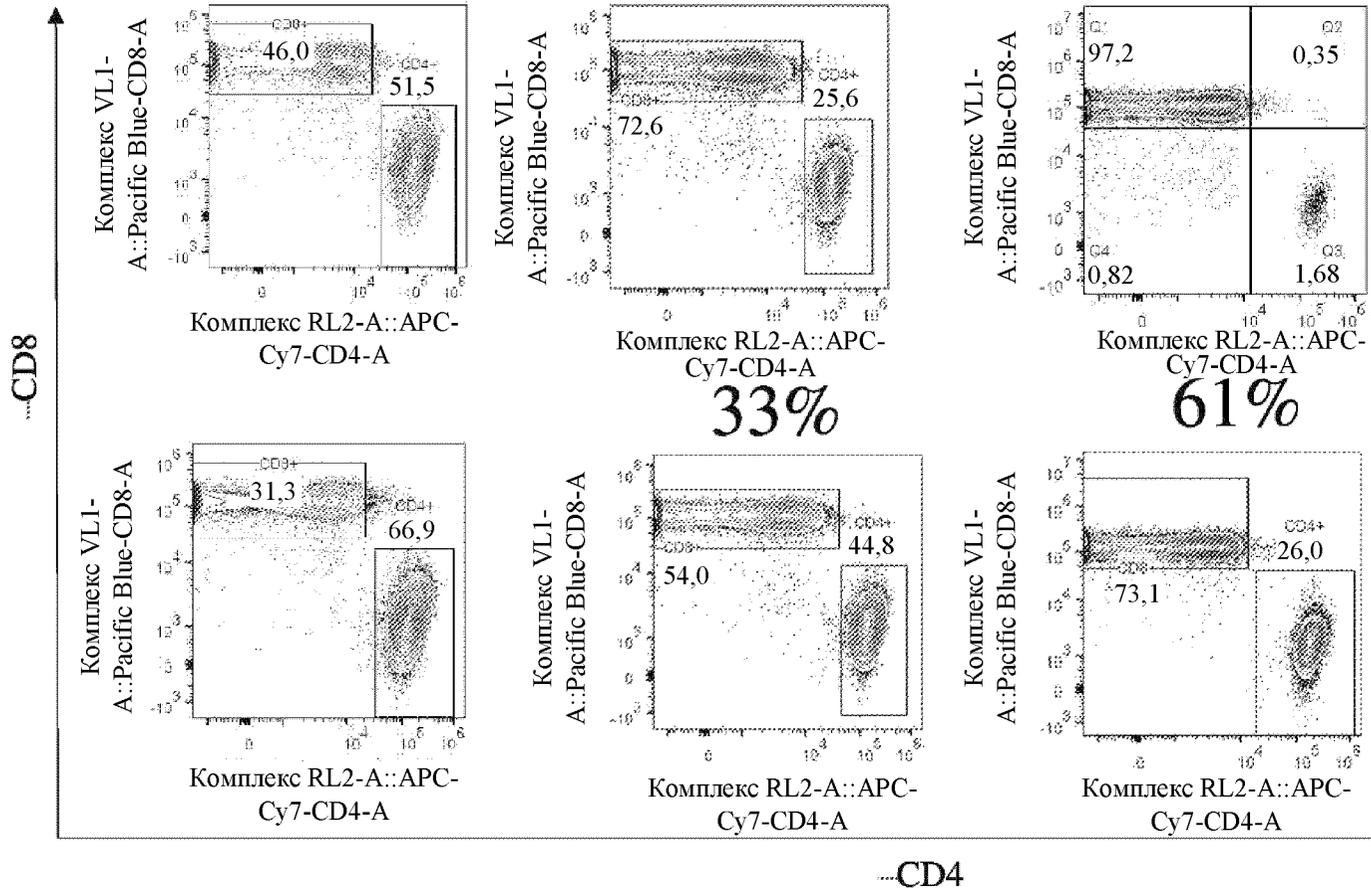
89/6

Фиг. 7С

Неделя 1

Неделя 2

Неделя 3

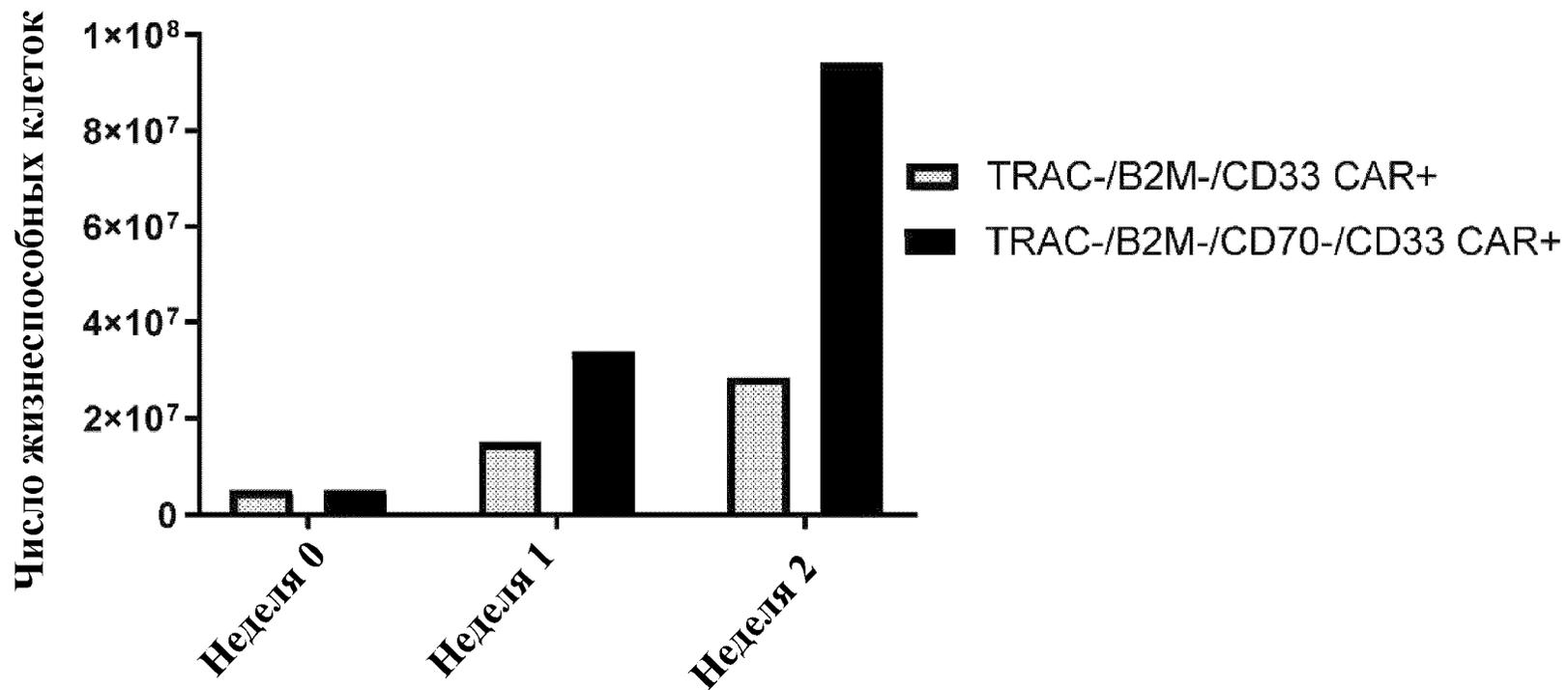


**CD70
ДИКОГО ТИПА**

CD70 KO

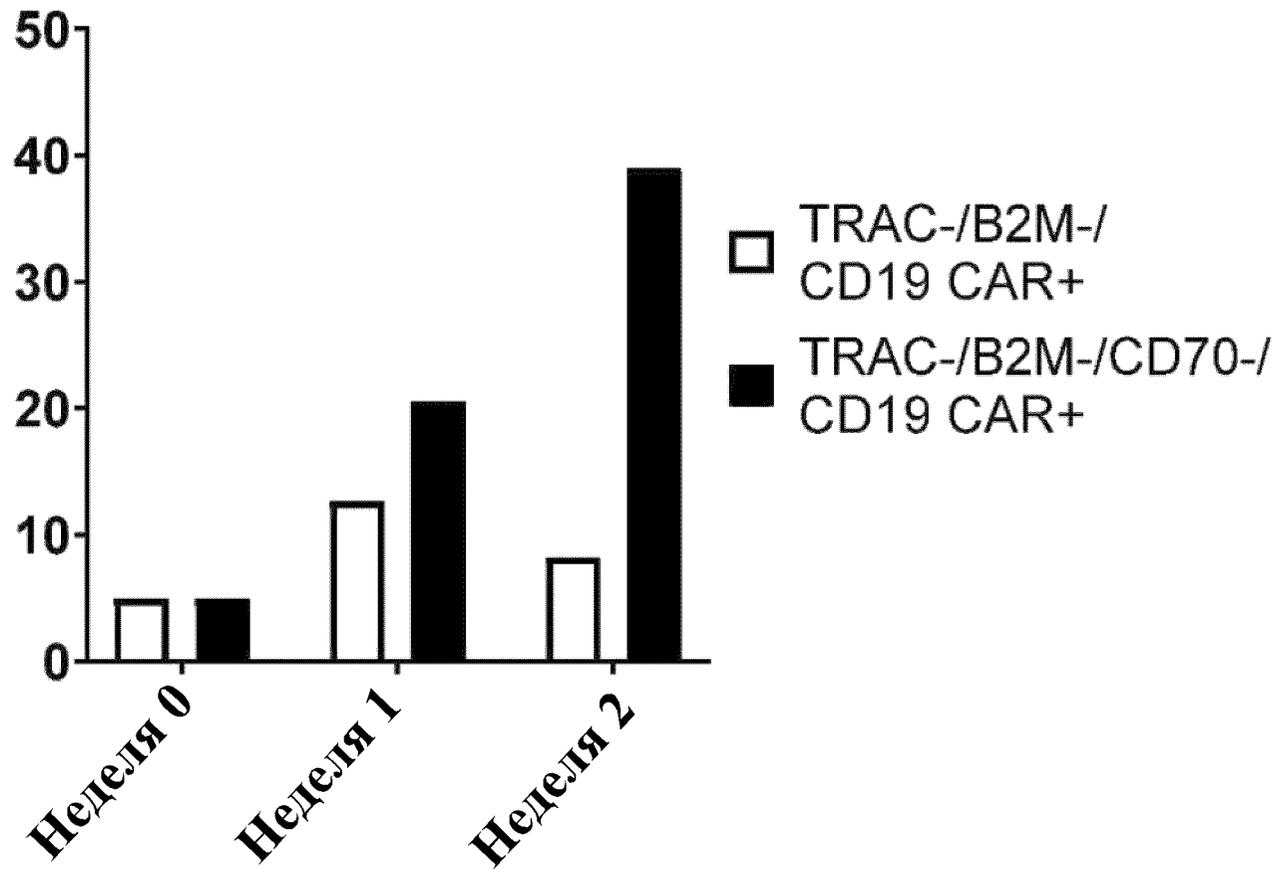
89/01

Фиг. 8

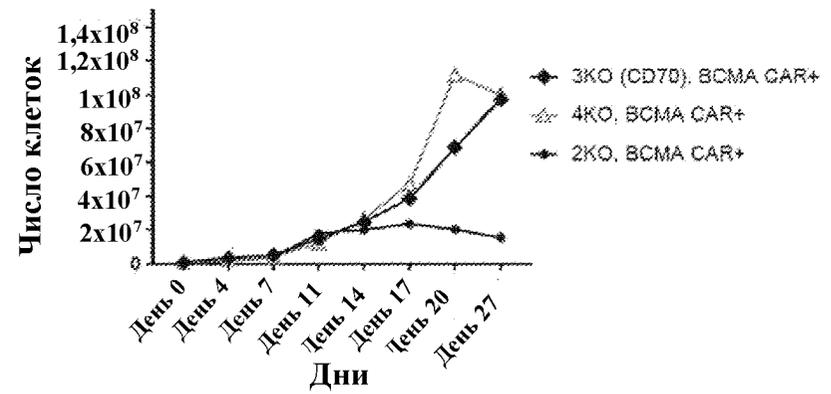
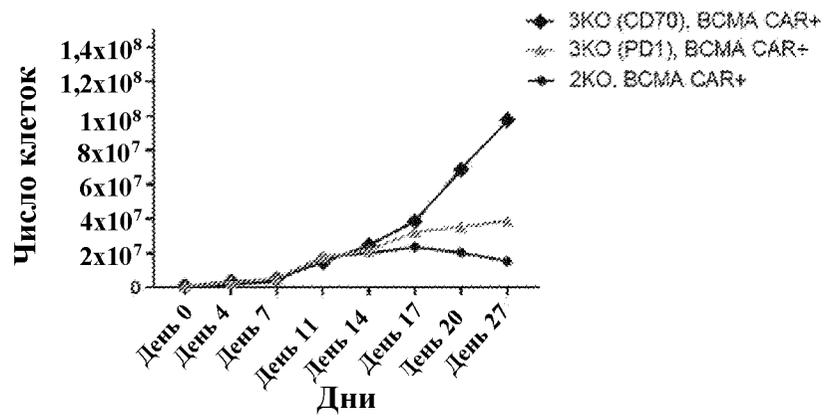


Фиг. 9

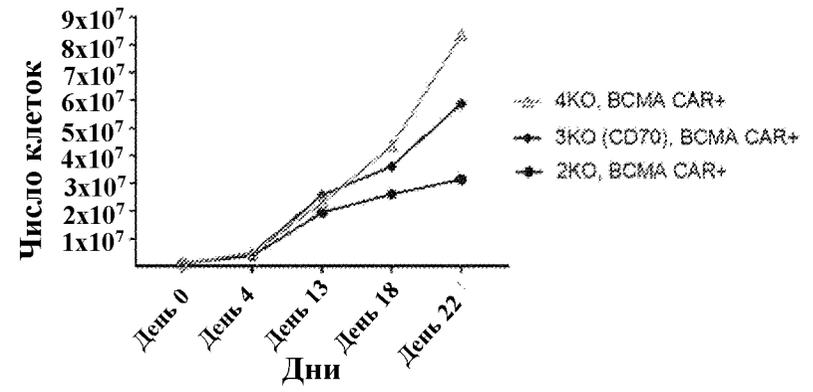
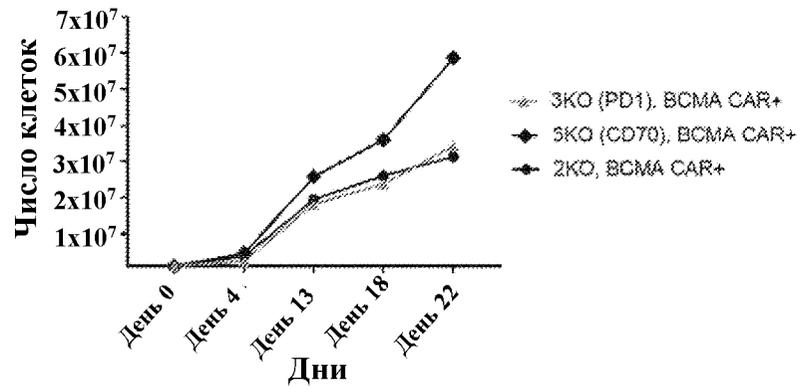
Число жизнеспособных клеток (1×10^6)



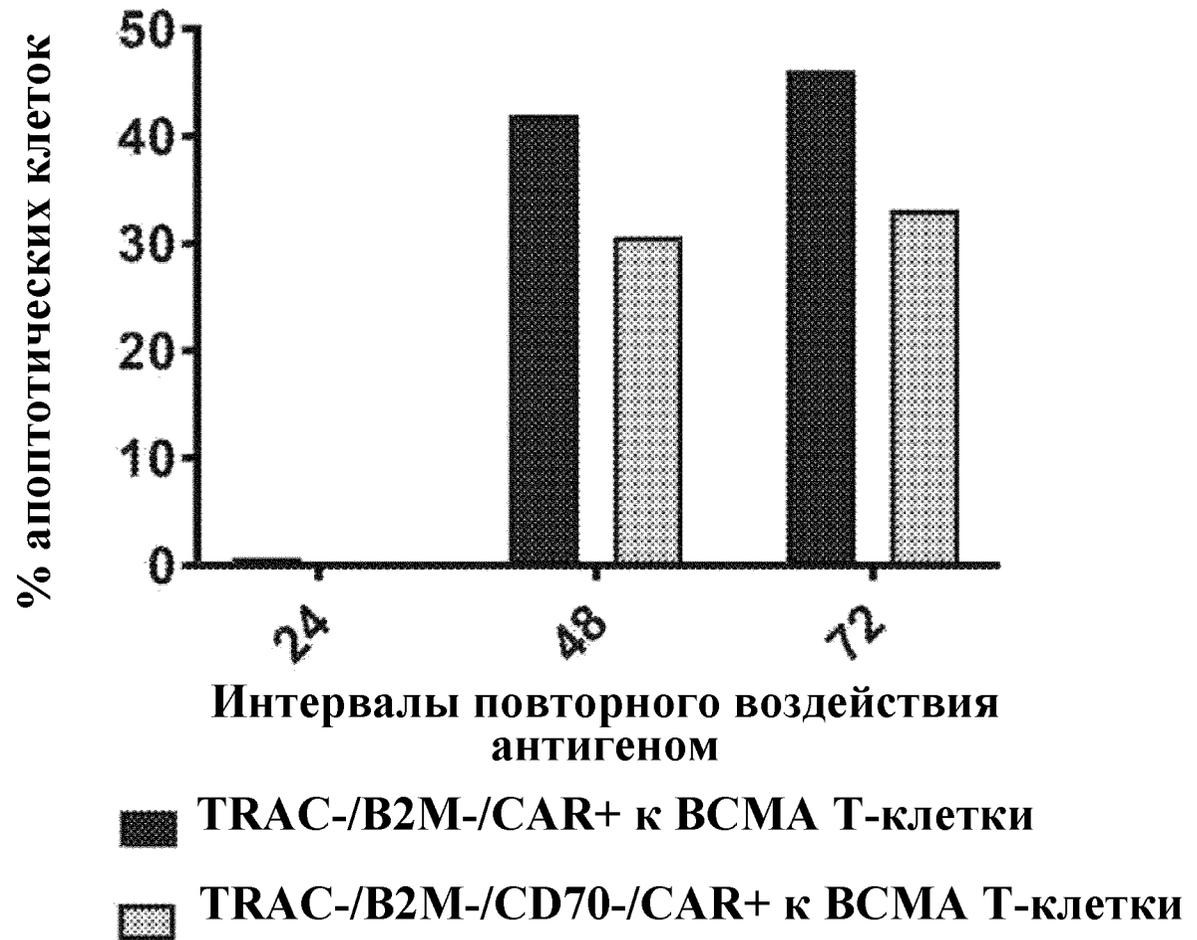
Фиг. 10



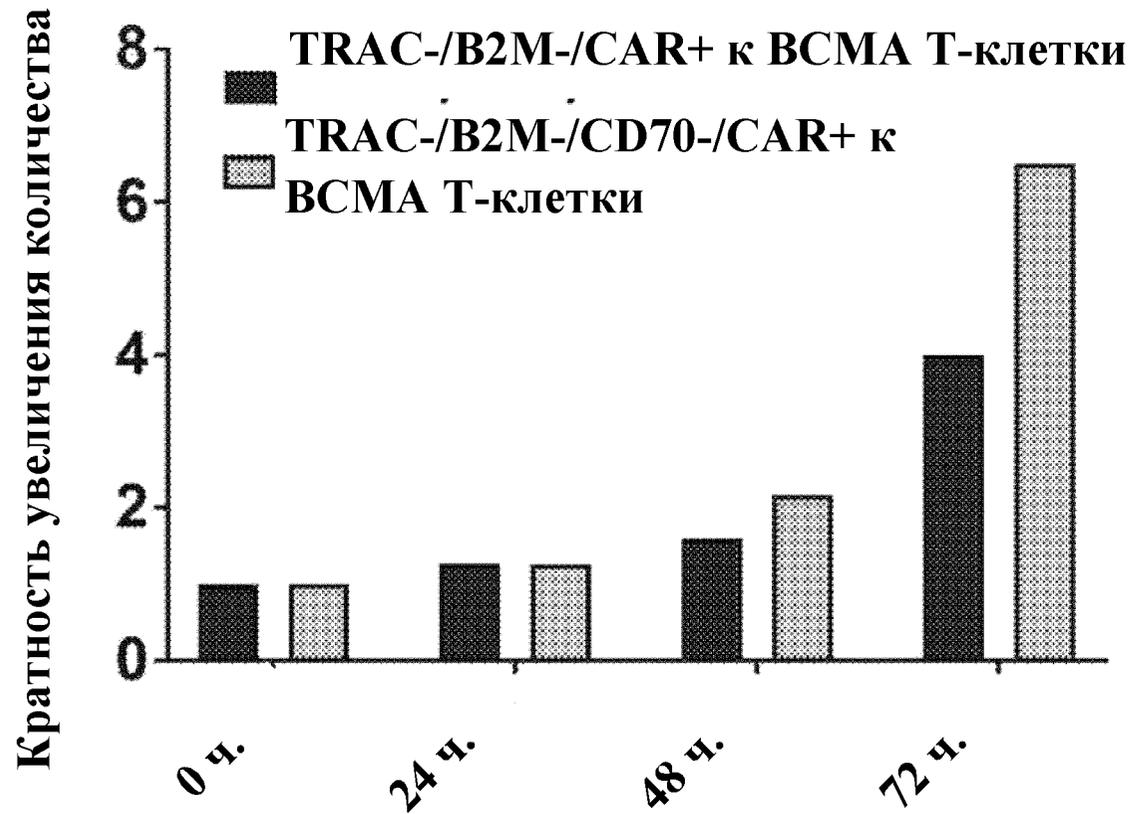
Фиг. 11



Фиг. 12



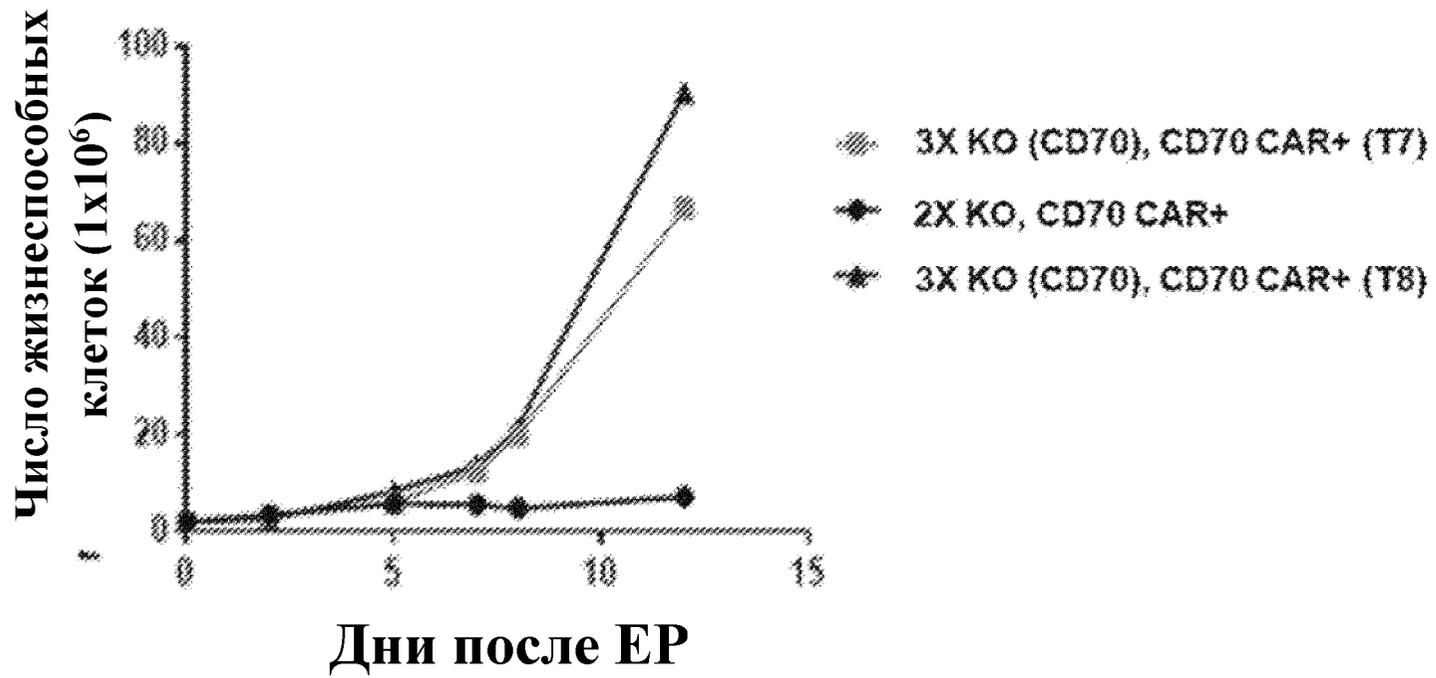
Фиг. 13



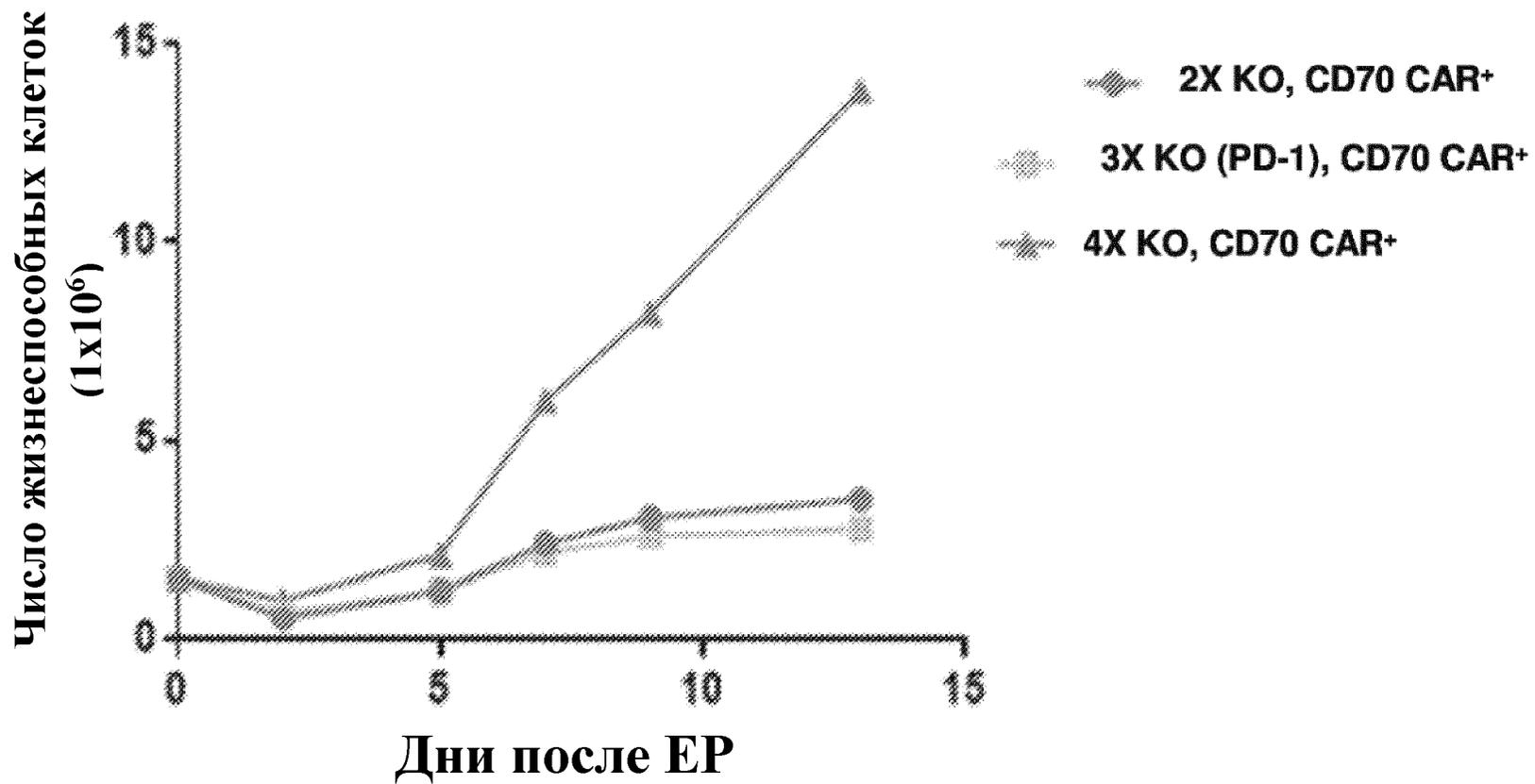
16/68

**Интервалы повторного
воздействия антигеном**

Фиг. 14

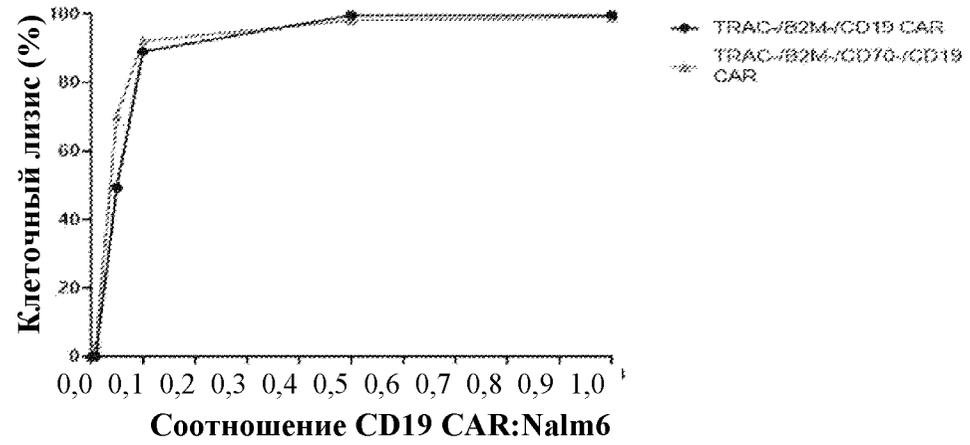


Фиг. 15

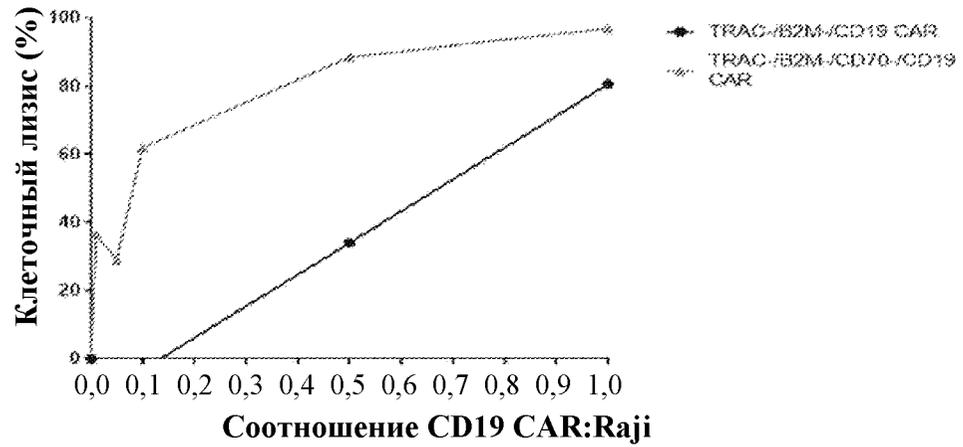


Фиг. 16

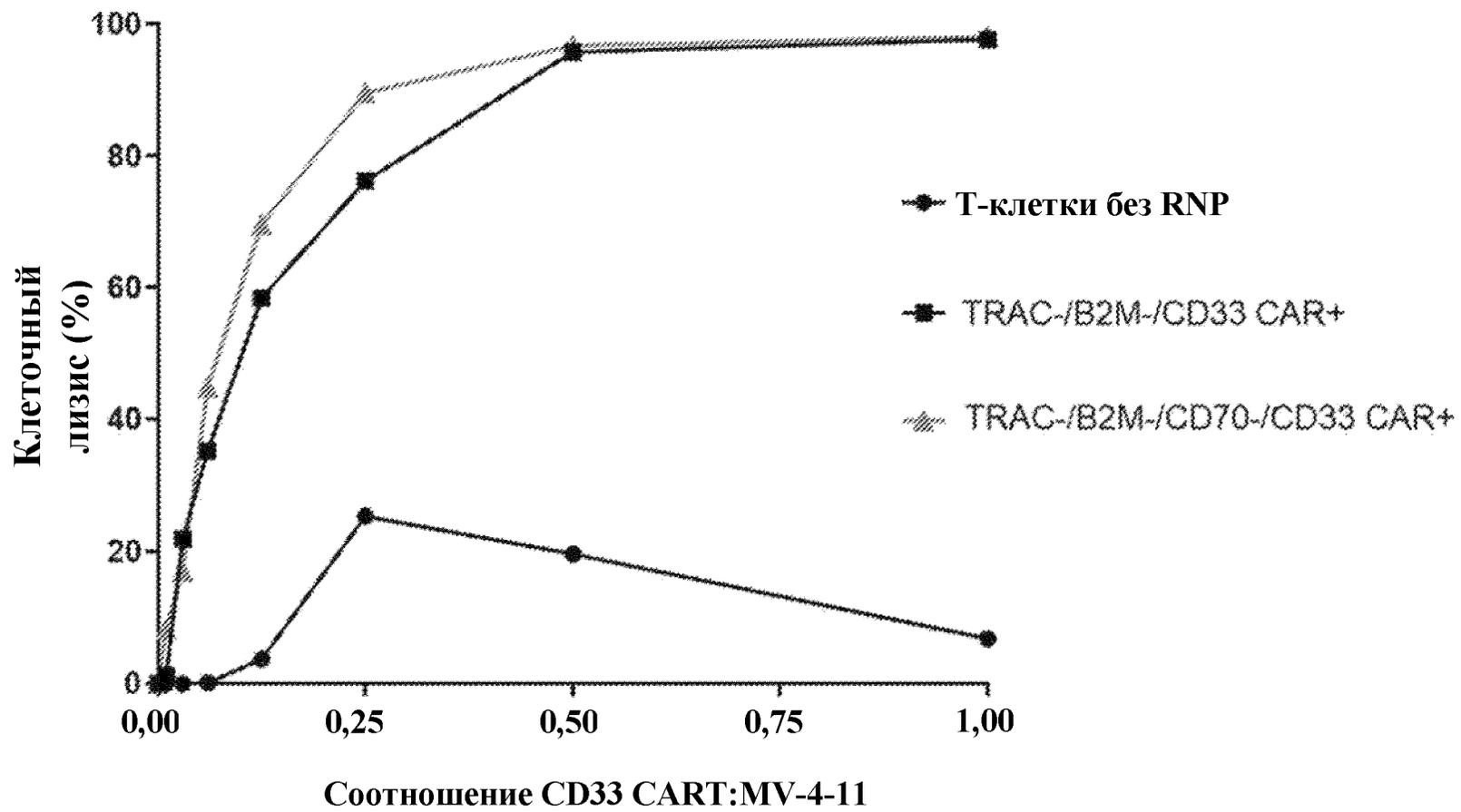
Анализ клеточного уничтожения в отношении клеток Nalm6 в течение 48 часов



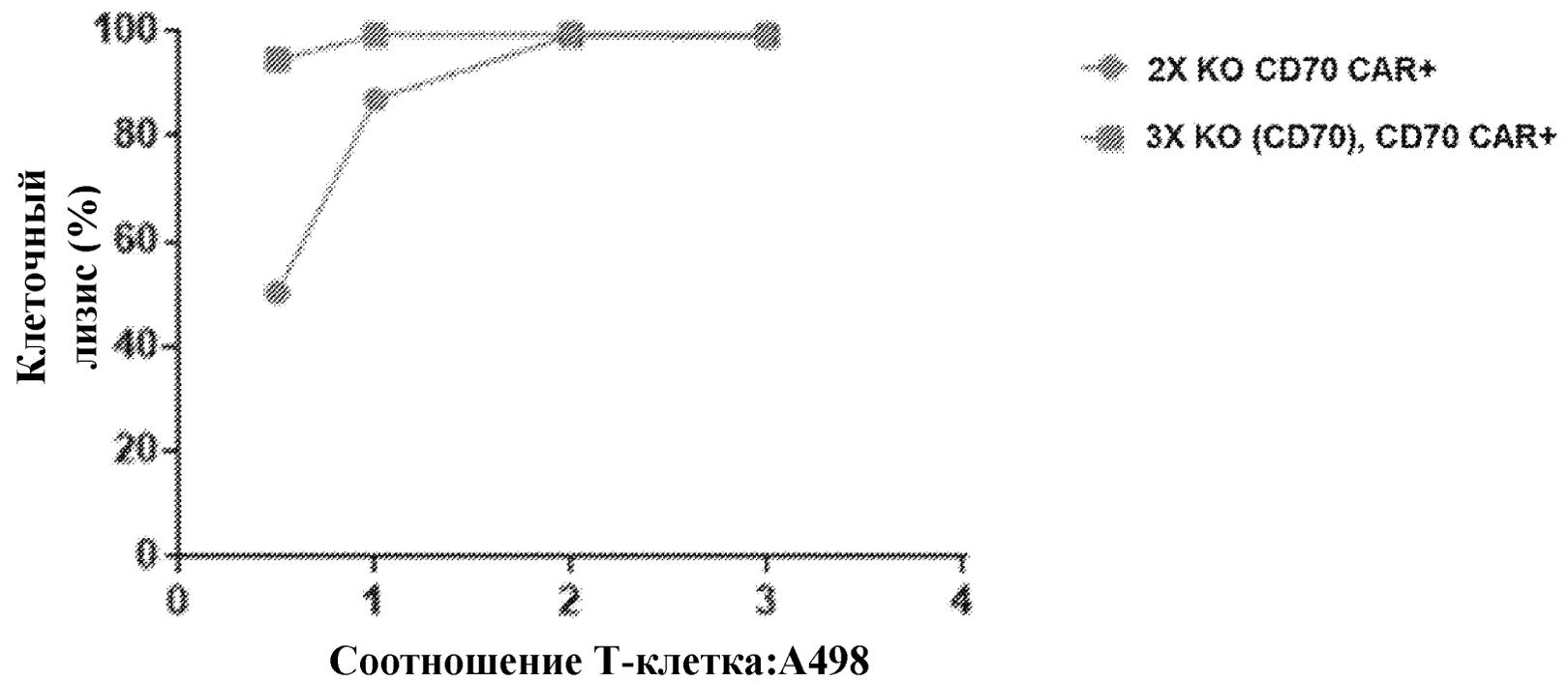
Анализ клеточного уничтожения в отношении клеток Raji в течение 48 часов



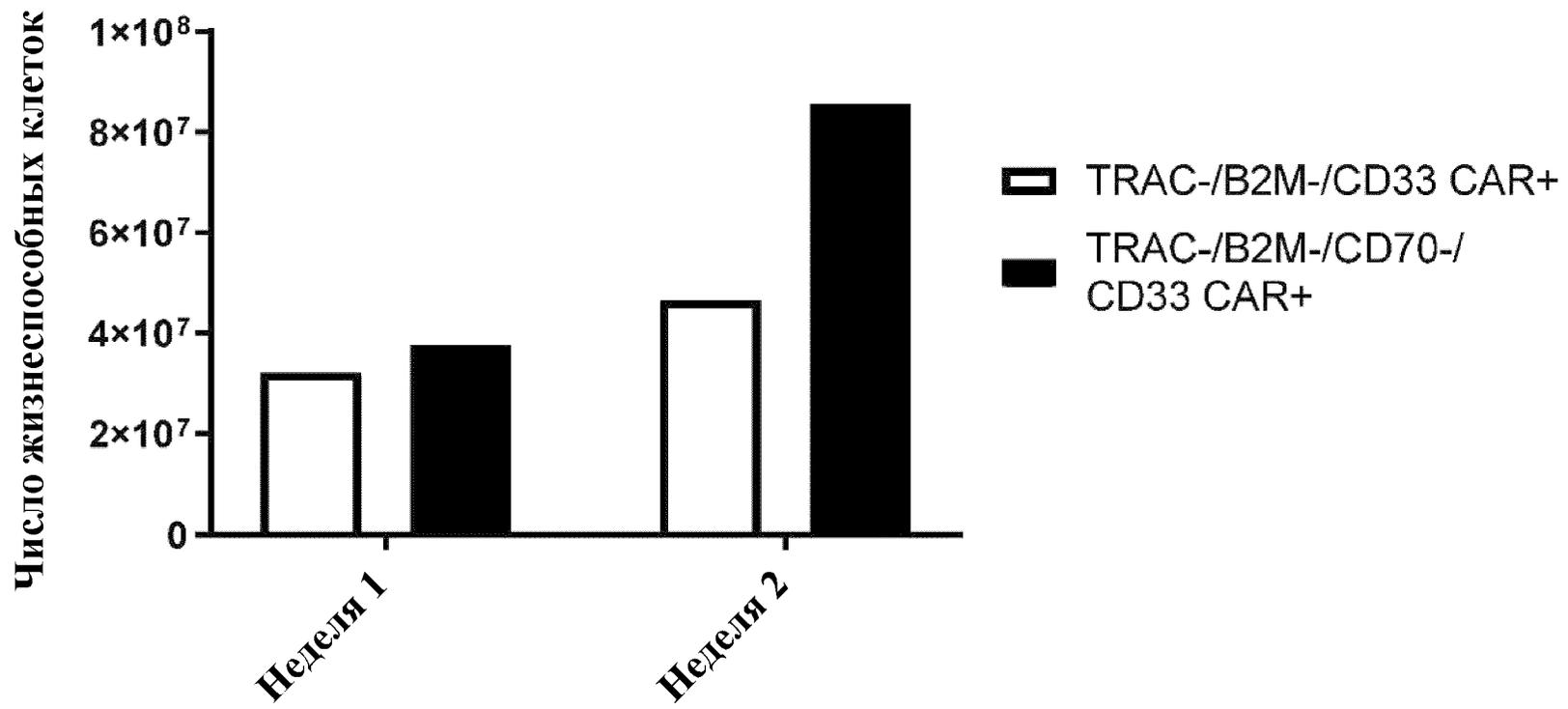
Фиг. 17



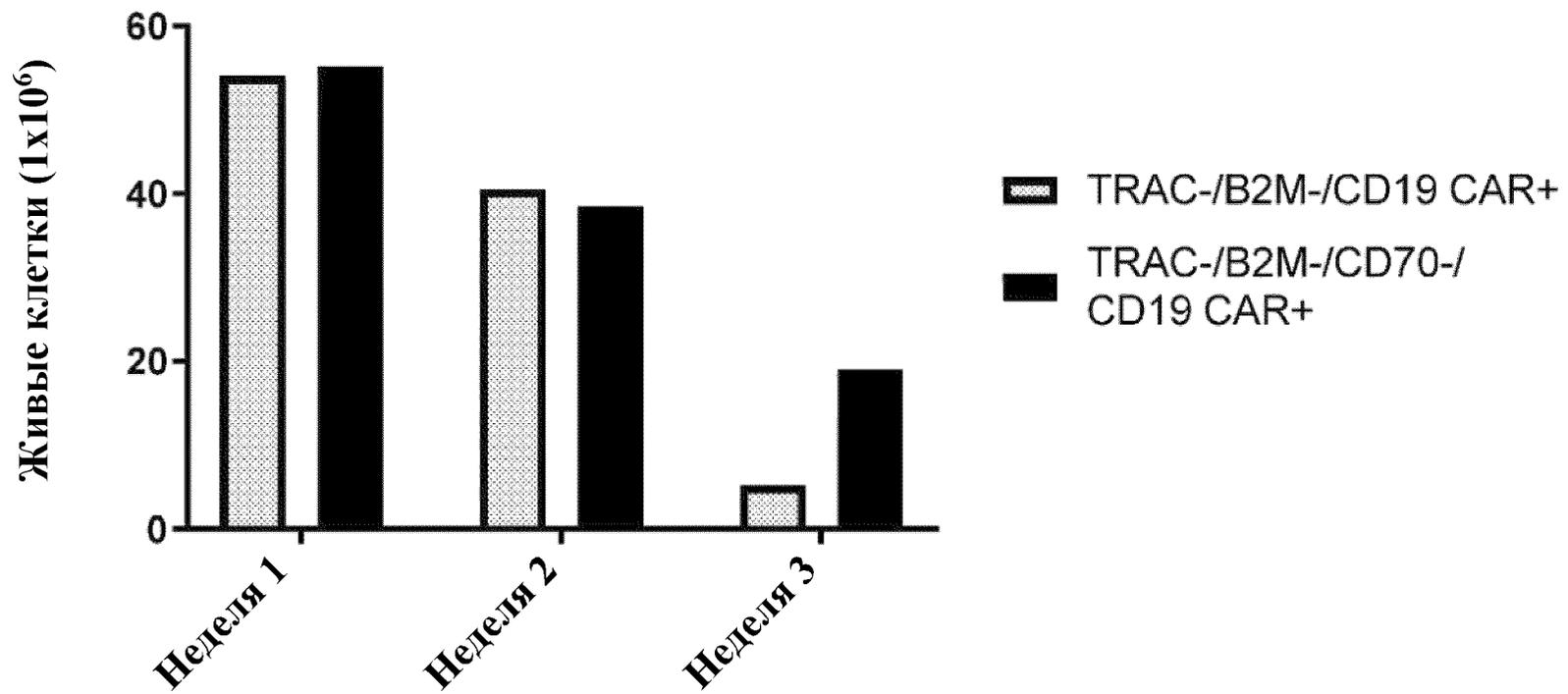
Фиг. 18



Фиг. 19



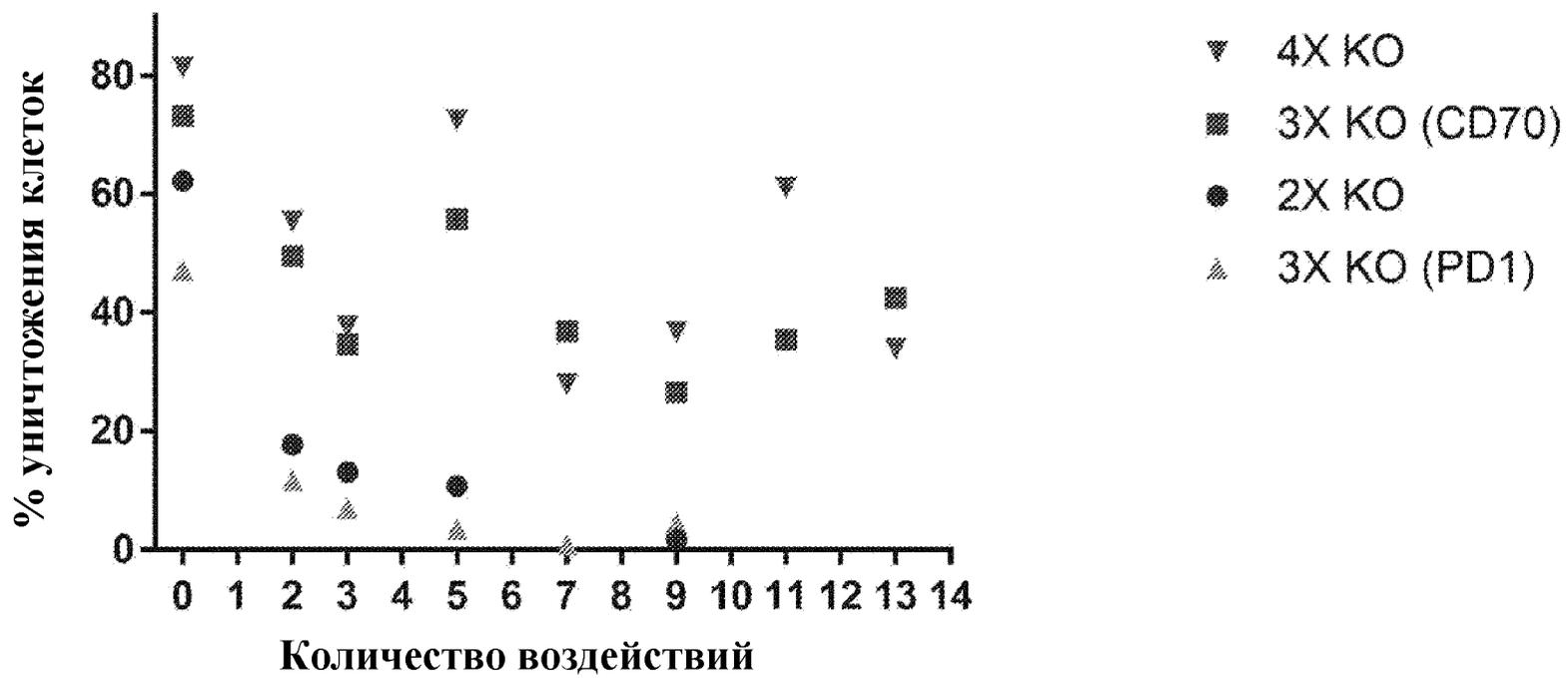
Фиг. 20



Фиг. 21

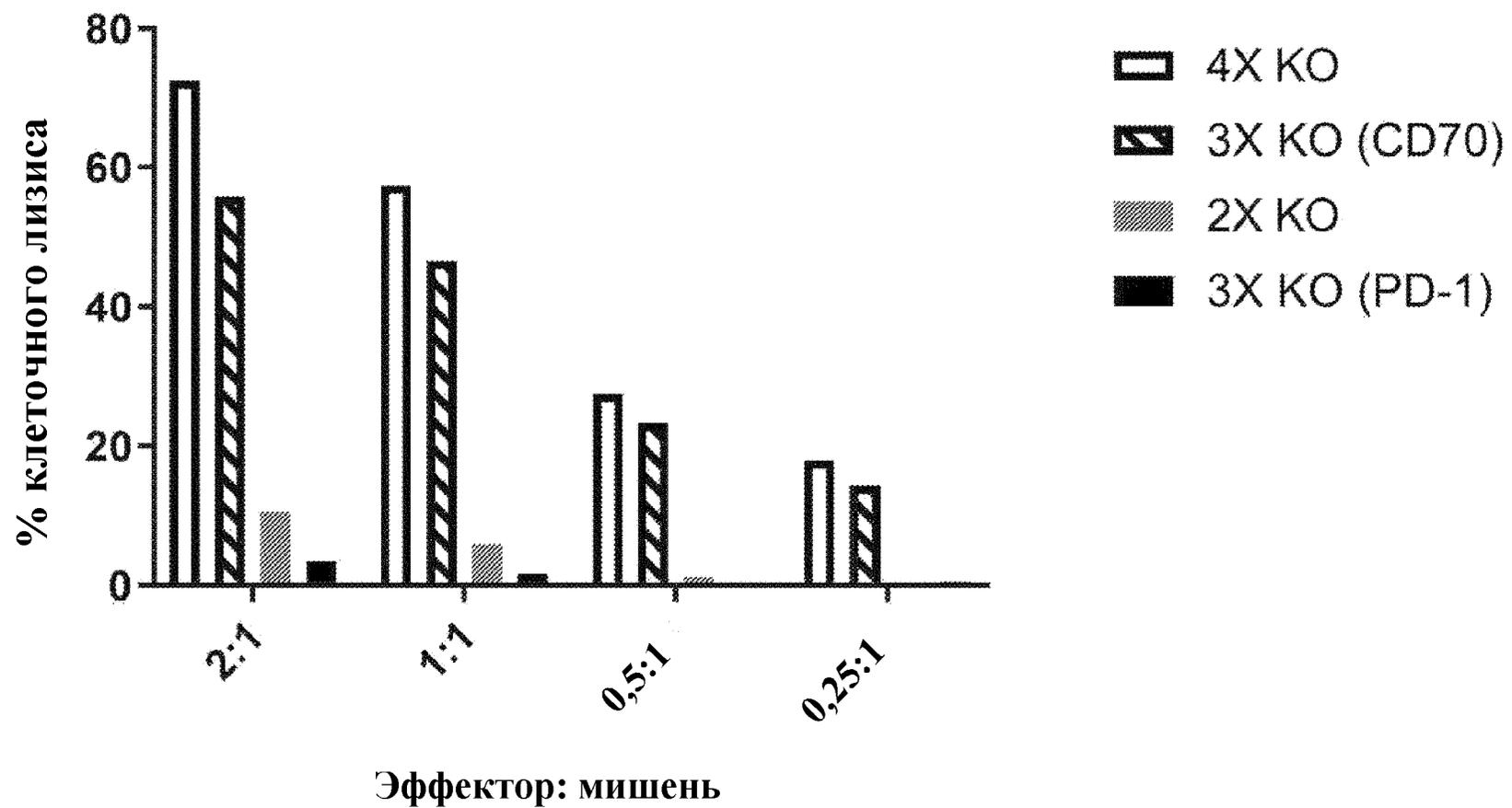


Фиг. 22А

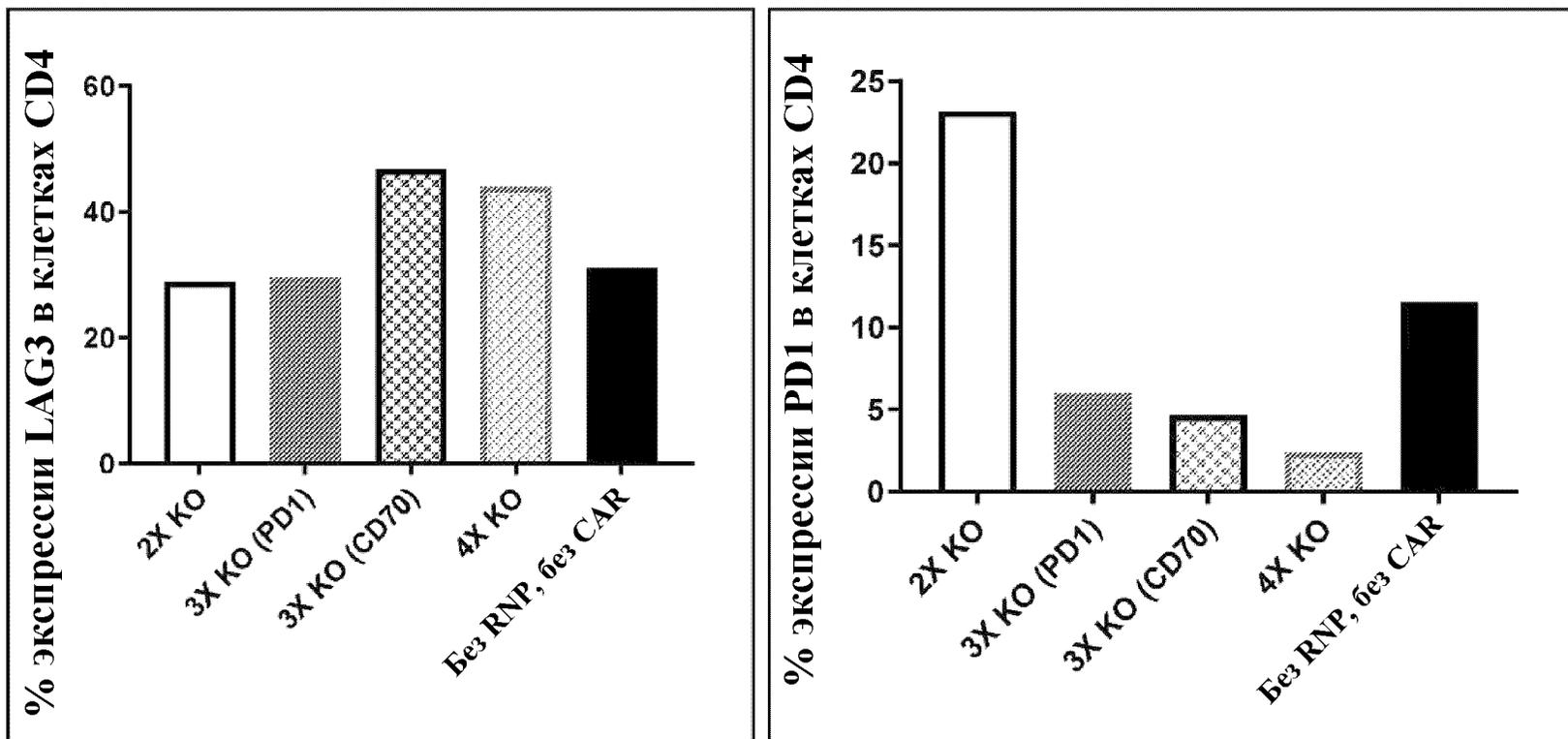


Фиг. 22В

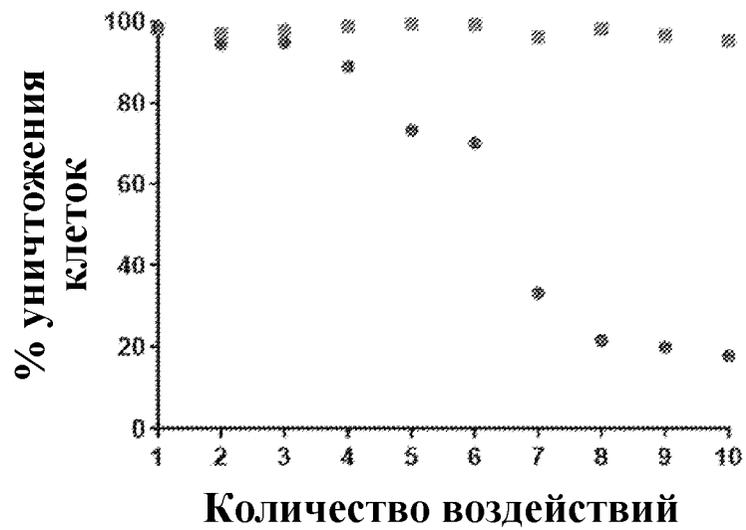
ACHN



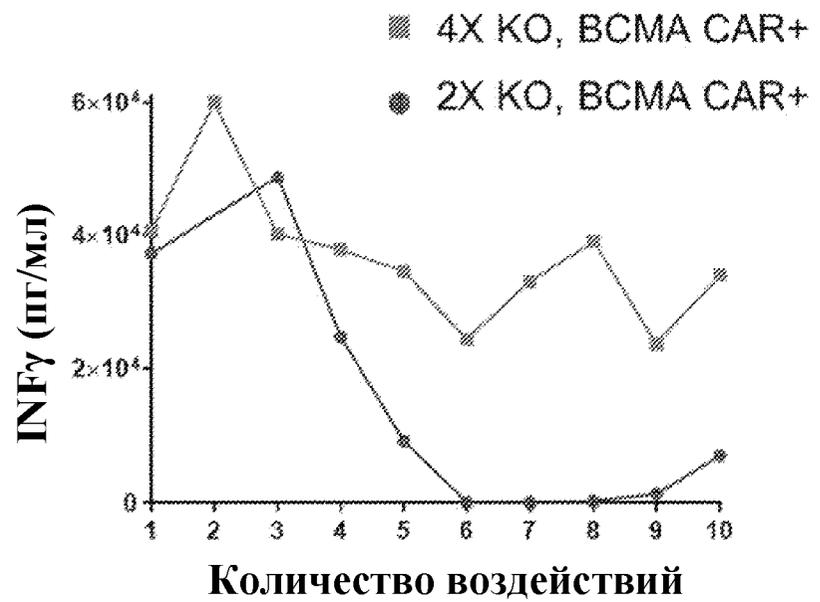
Фиг. 23А



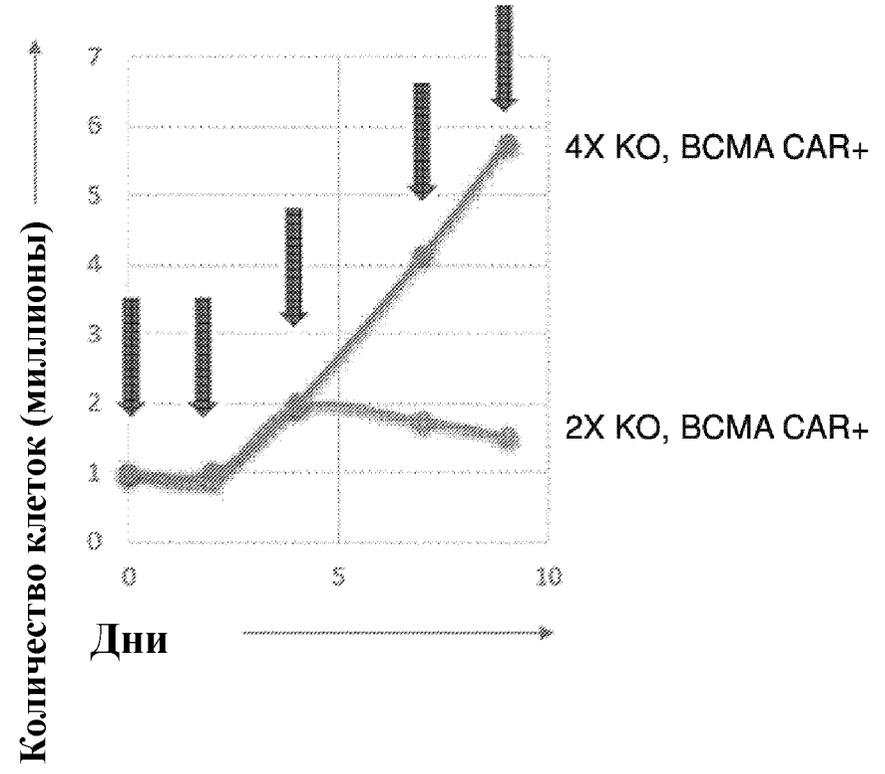
Фиг. 23В



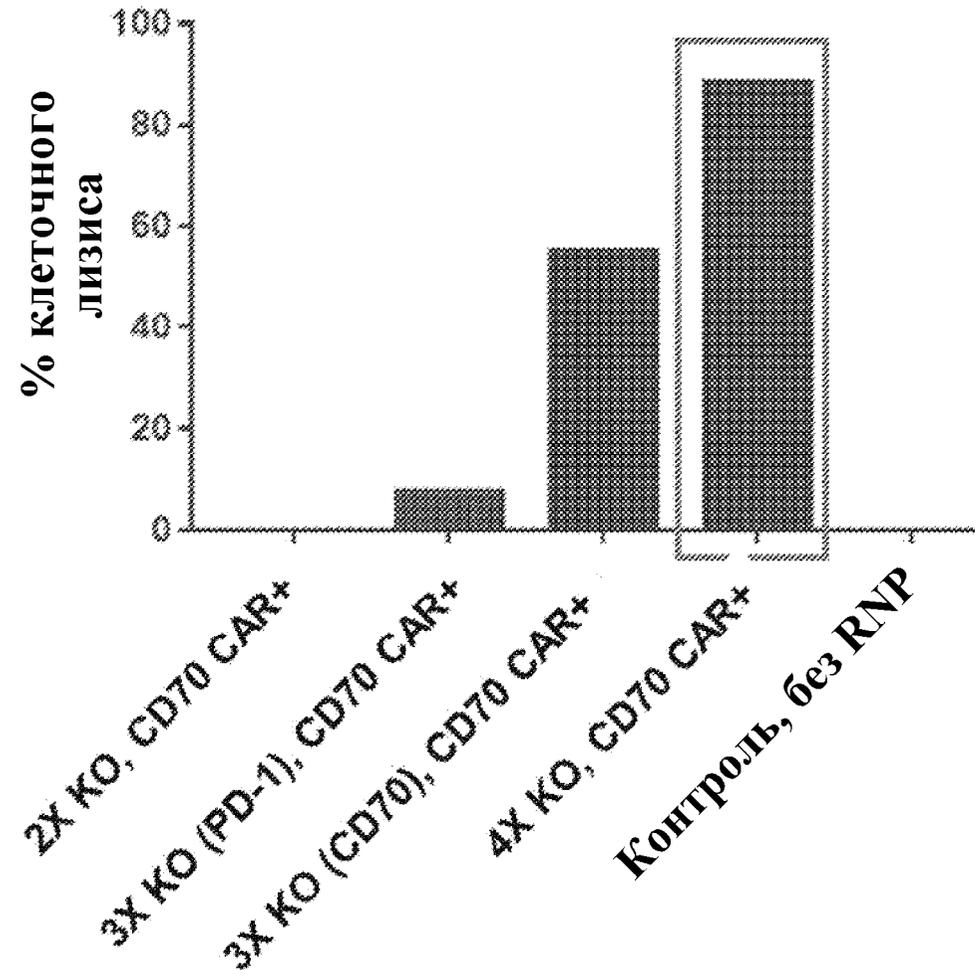
Фиг. 24А



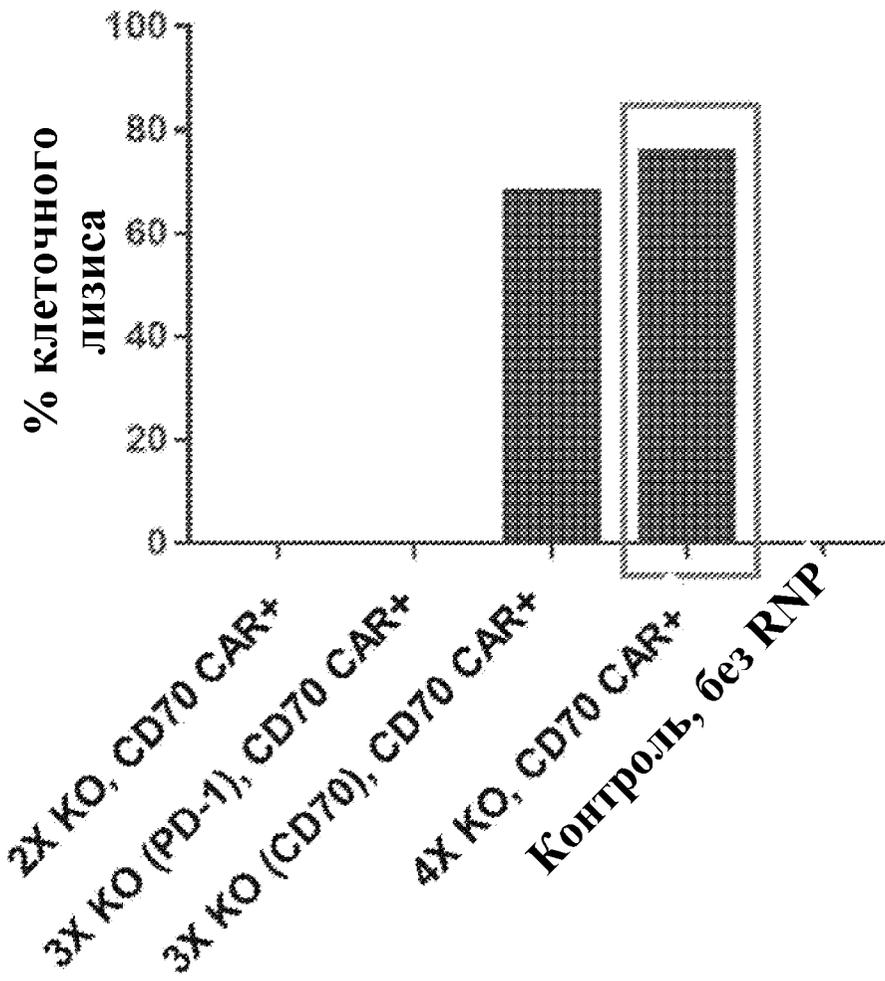
Фиг. 24В



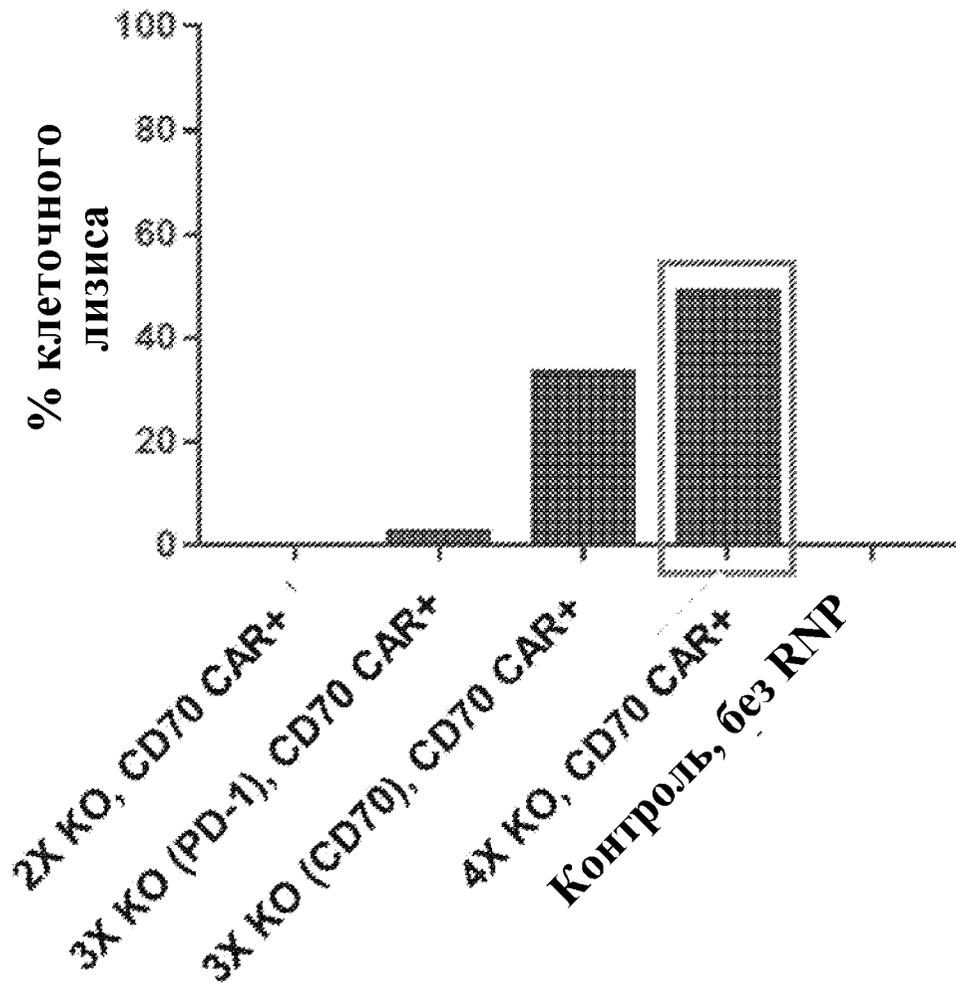
Фиг. 24С



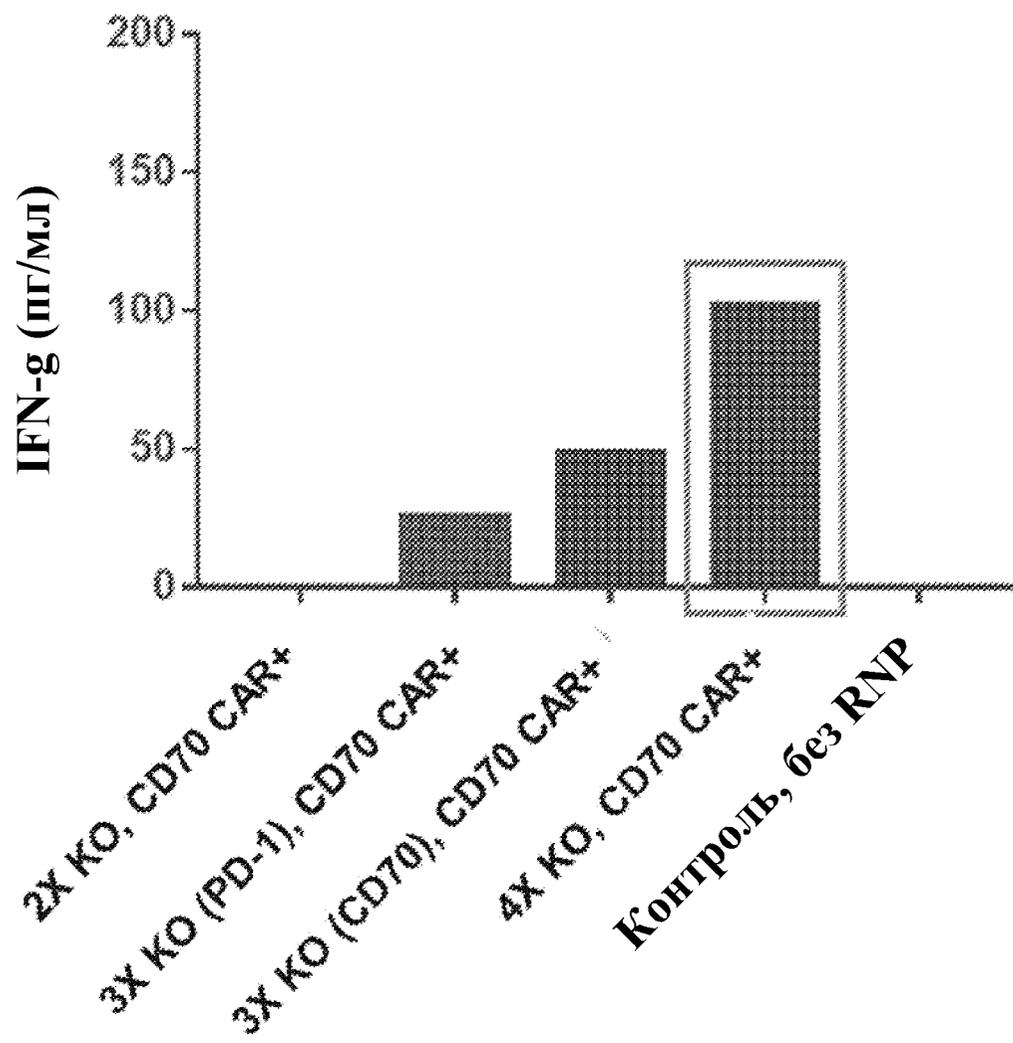
Фиг. 25А



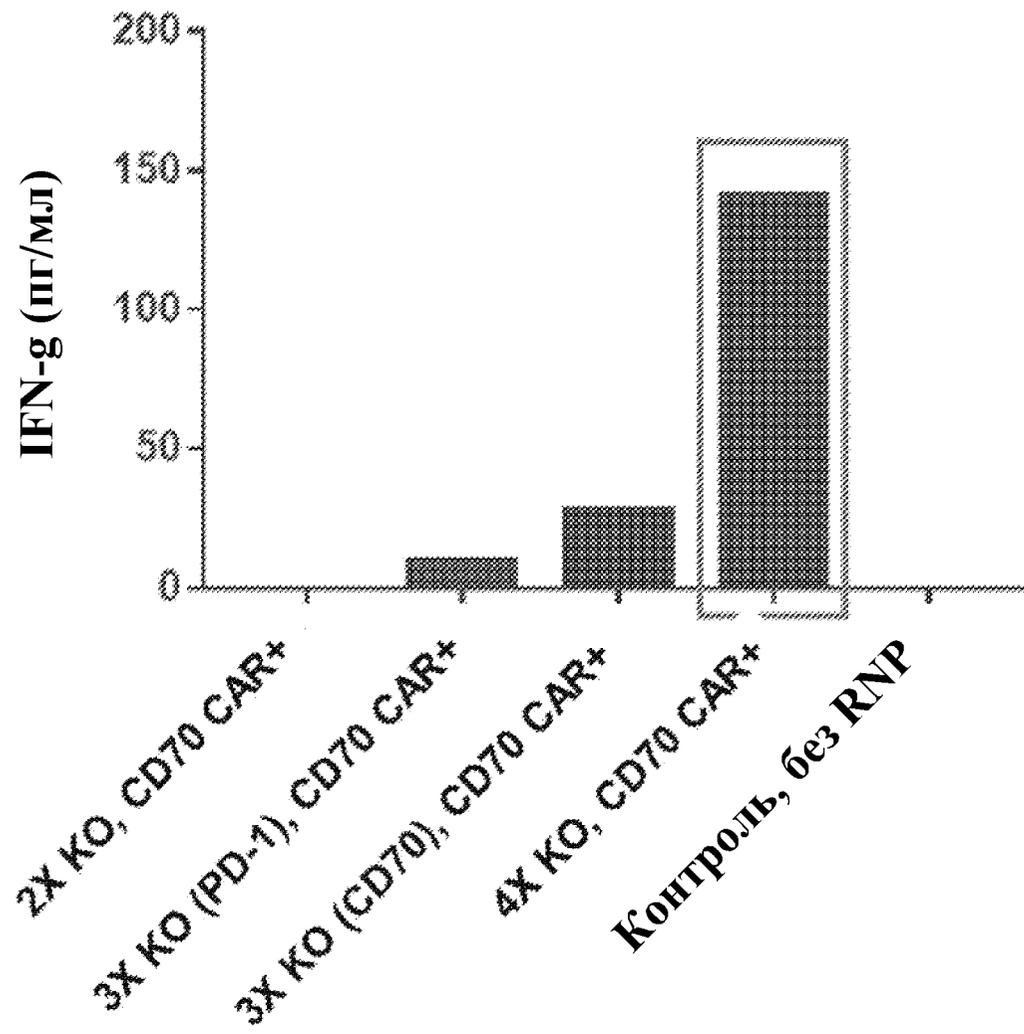
Фиг. 25В



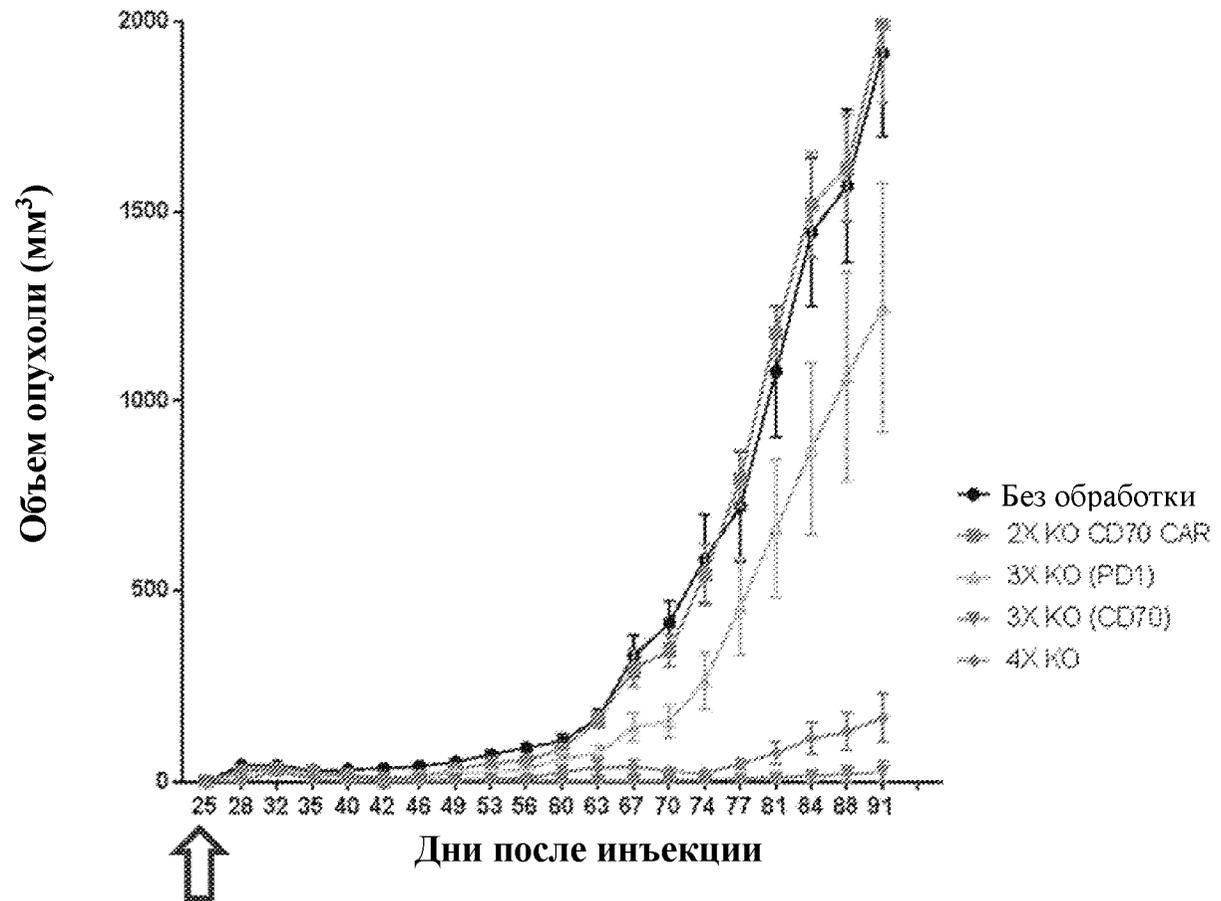
Фиг. 25С



Фиг. 26А

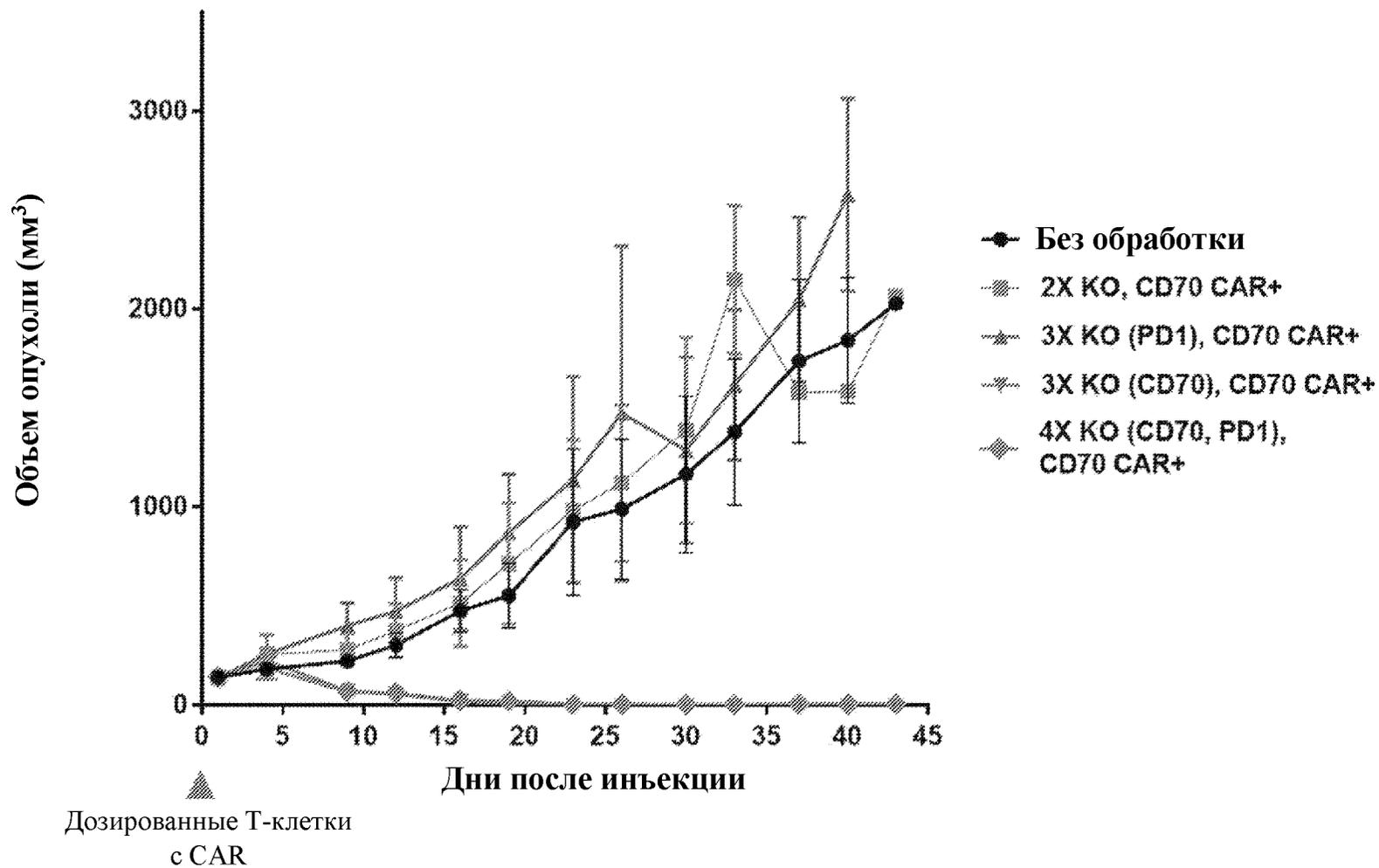


Фиг. 26В

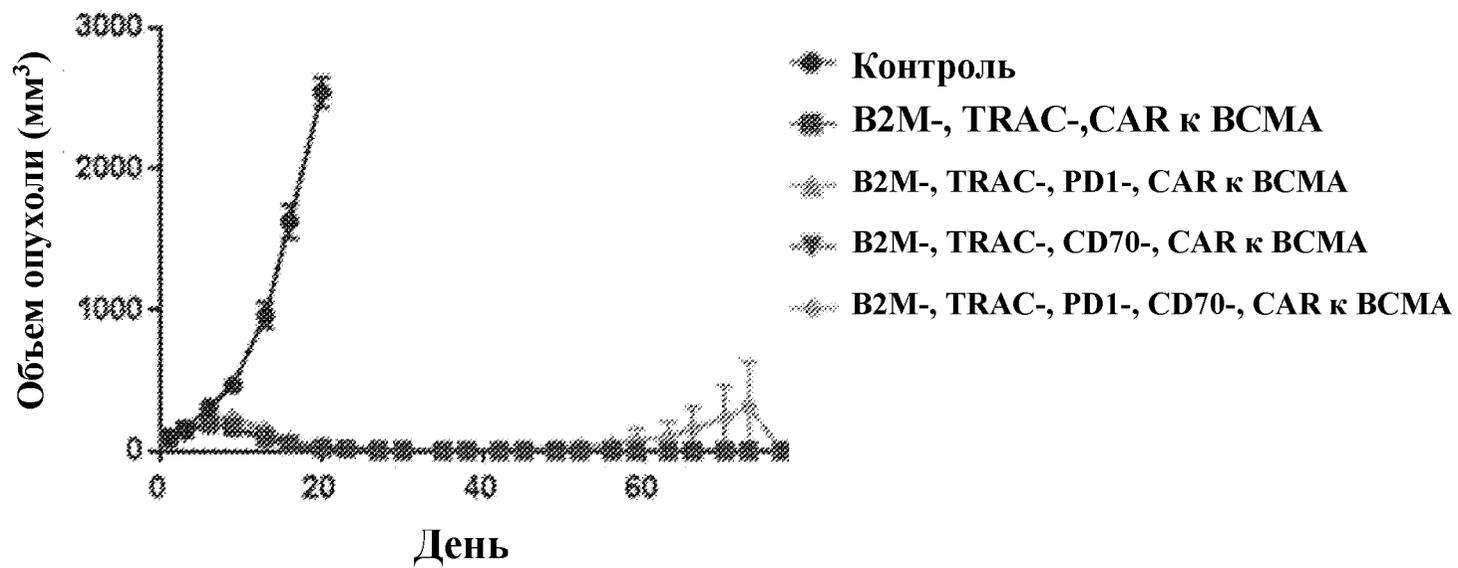


↑
 Повторное
 воздействие
 опухолевыми
 клетками

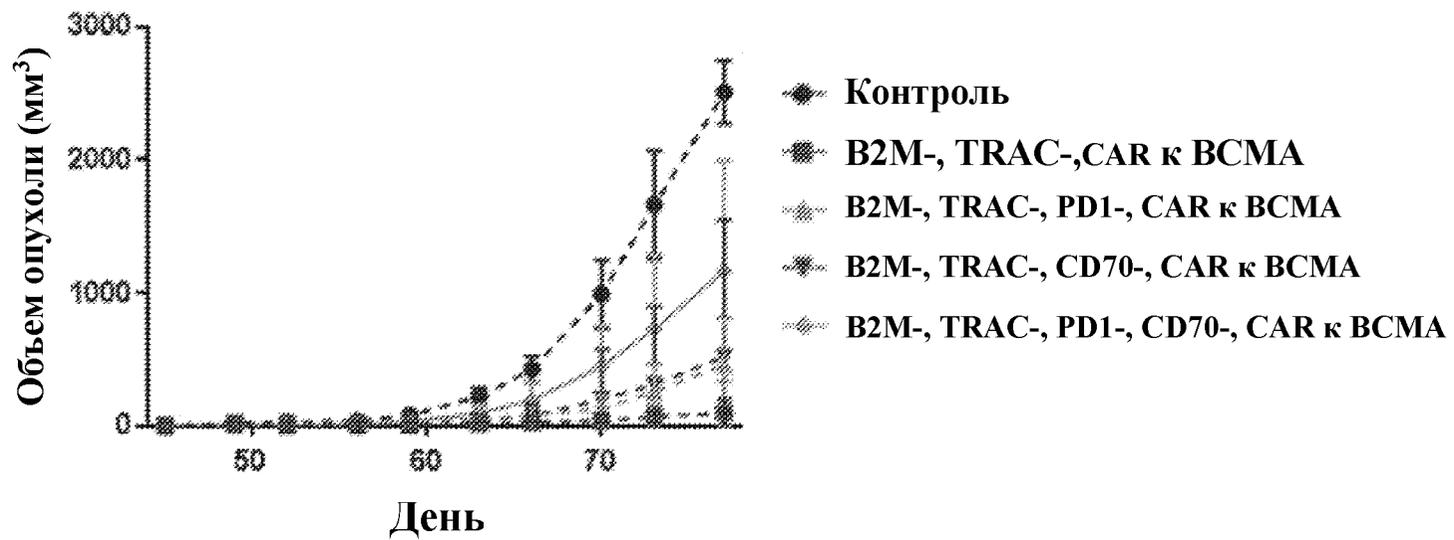
Фиг.27В



Фиг.27С



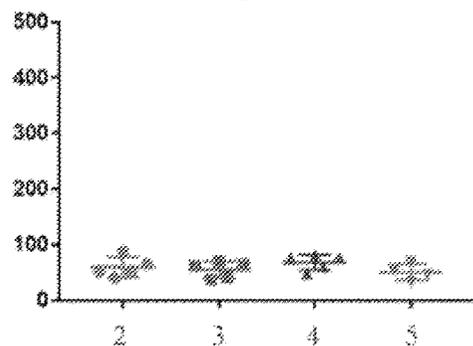
Фиг.28А



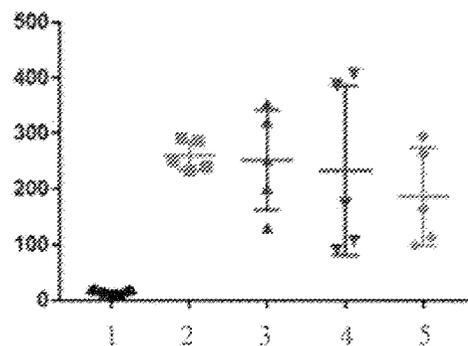
Фиг.28В

huCD45+ клеток/мкл крови

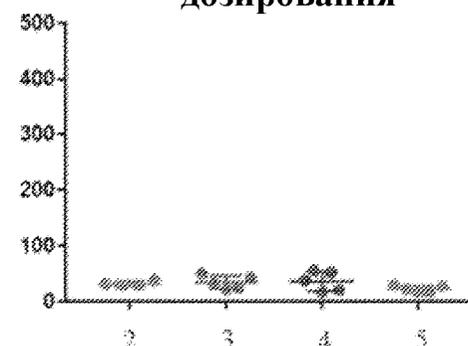
Неделя 1 после дозирования



Неделя 2 после дозирования

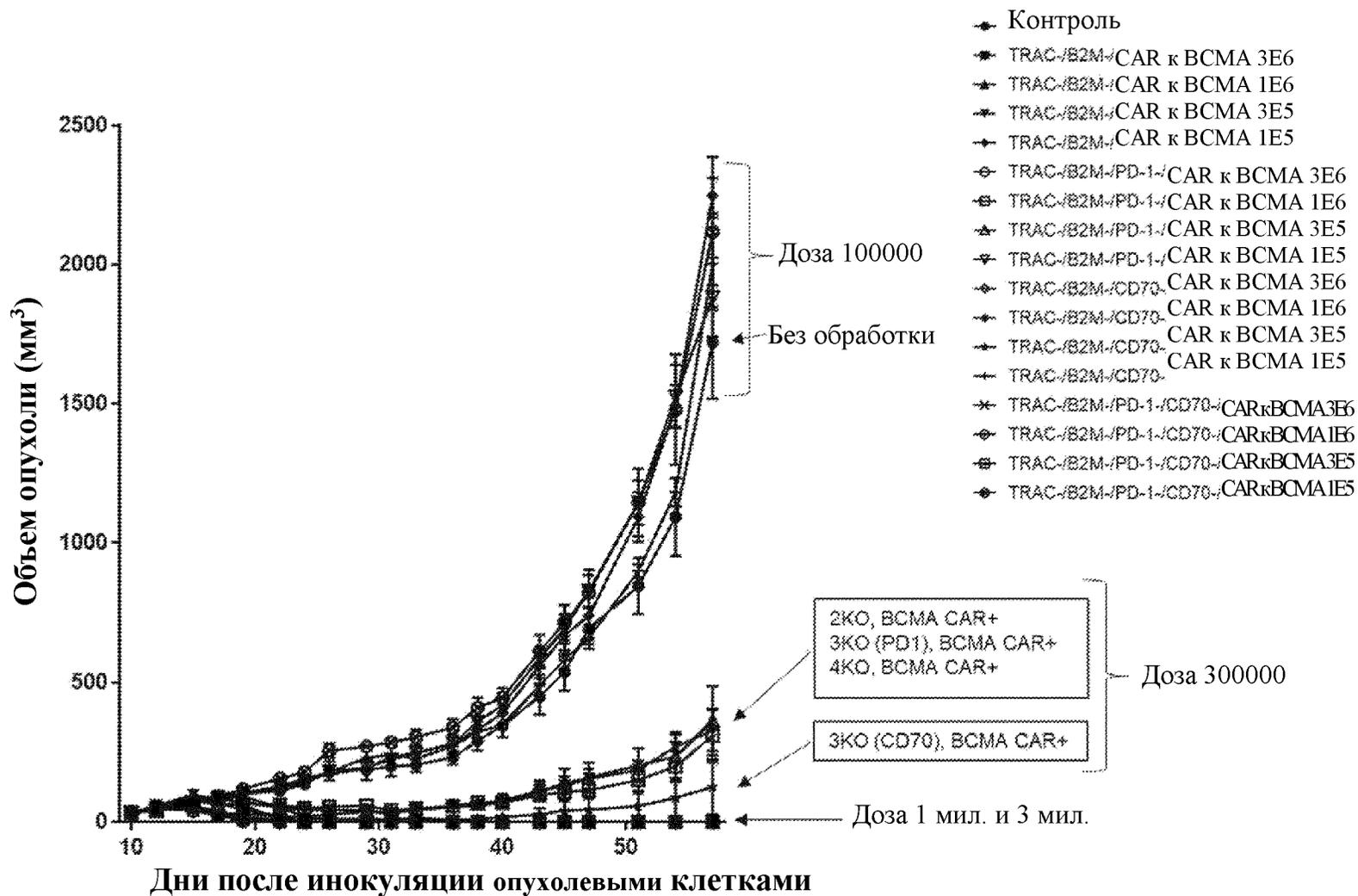


Неделя 3 после дозирования

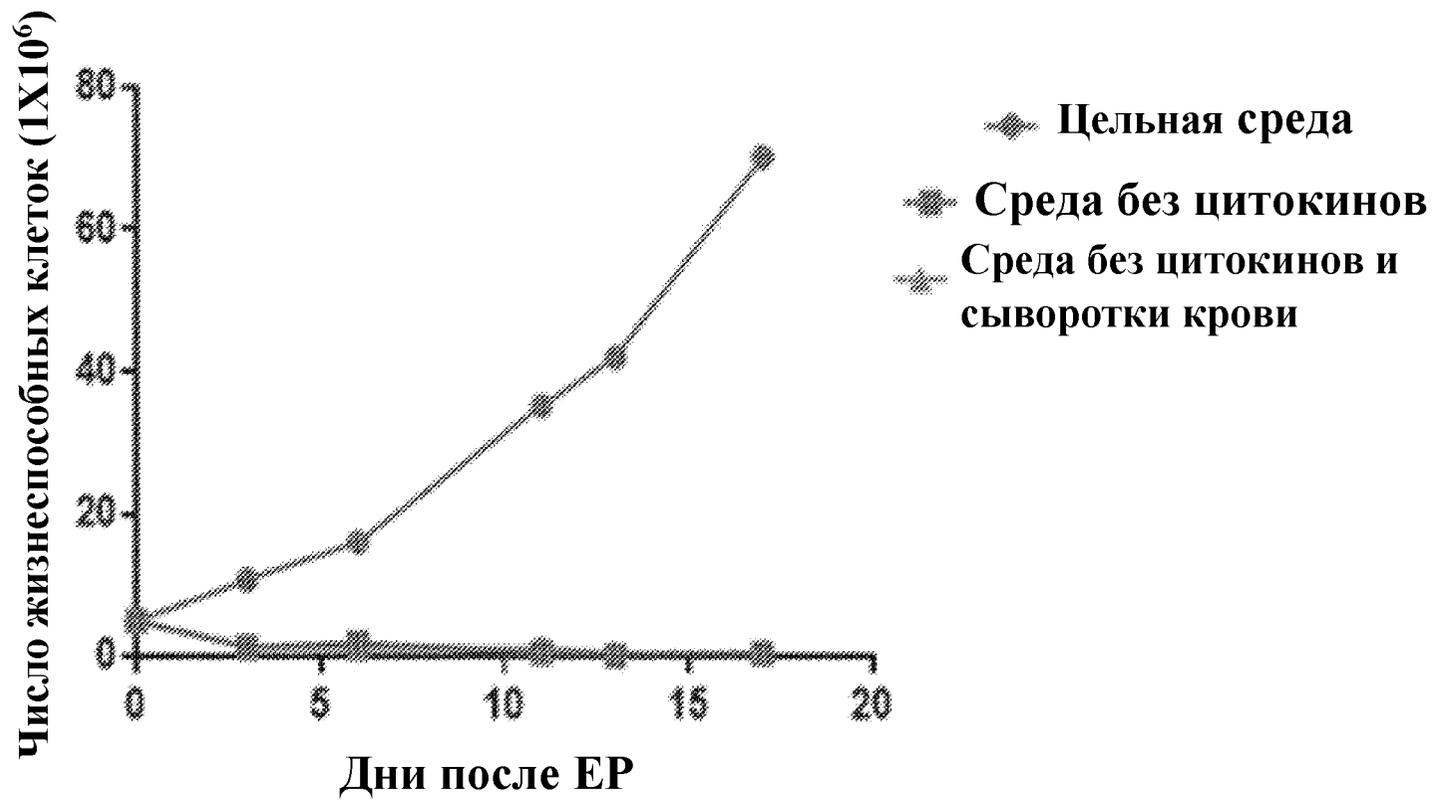


- 1: Контроль
- 2: B2M-, TRAC-, CAR к BCMA
- 3: B2M-, TRAC-, PD1-, CAR к BCMA
- 4: B2M-, TRAC-, CD70-, CAR к BCMA
- 5: B2M-, TRAC-, PD1-, CD70-, CAR к BCMA

Фиг.29

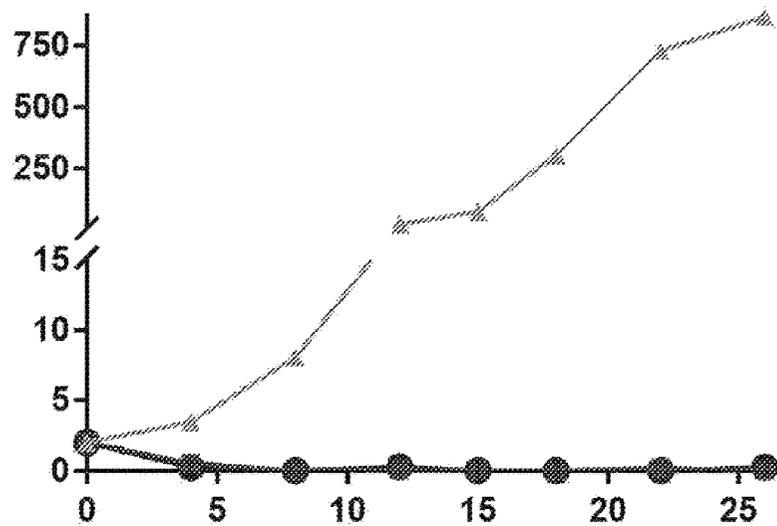


Фиг.30



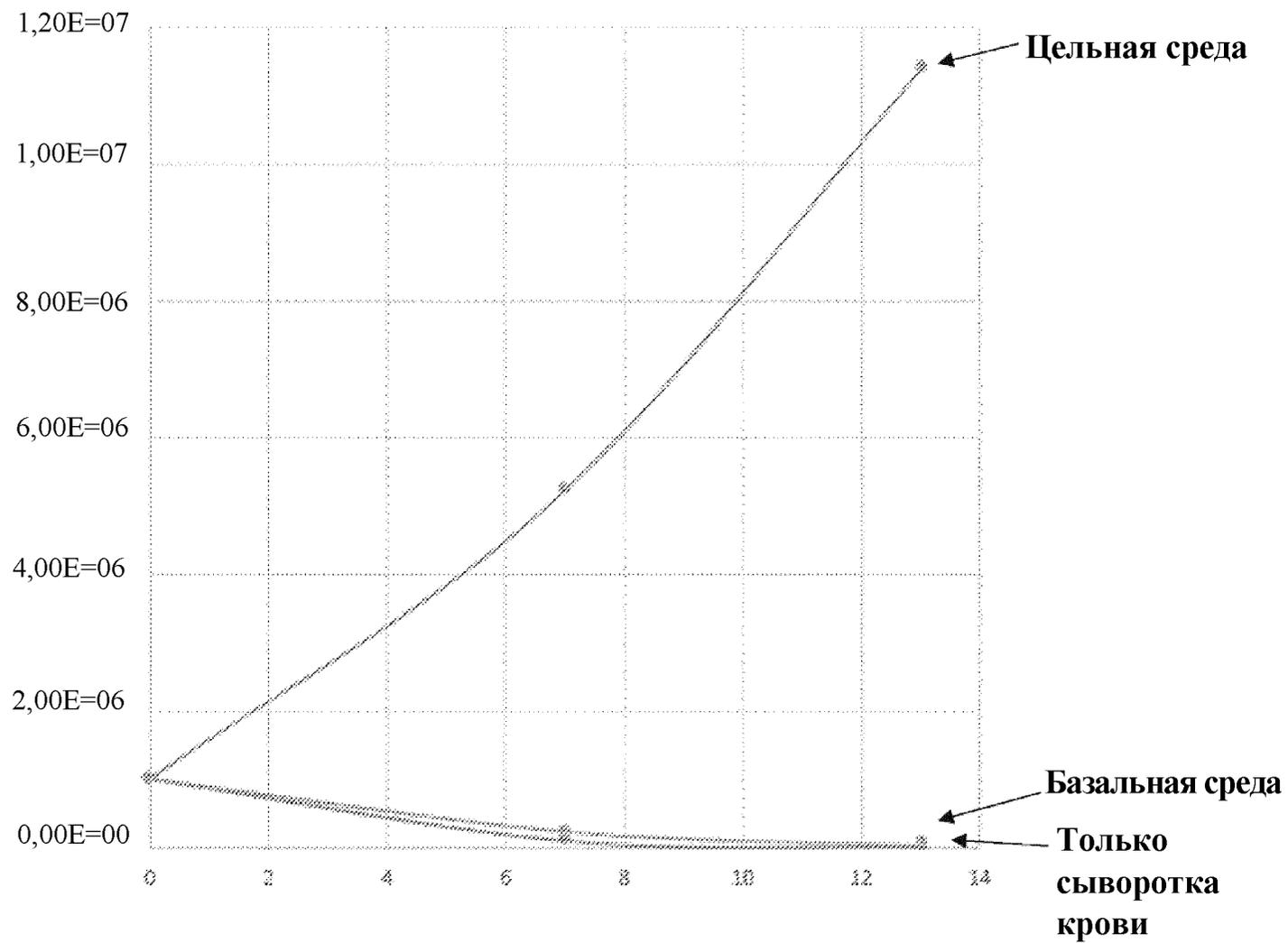
Фиг.31

Число жизнеспособных клеток (1×10^6)

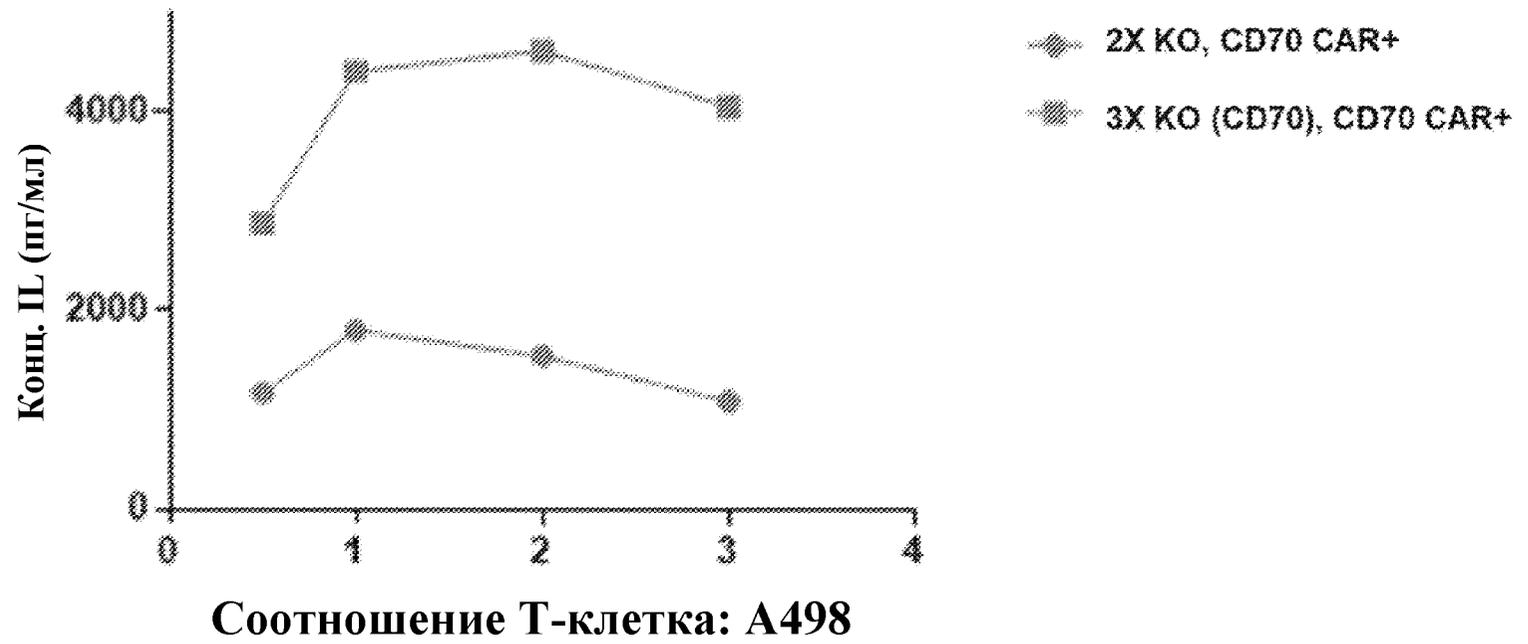


- Цельная среда
- Среда без цитокинов и сыворотки крови
- Среда без цитокинов

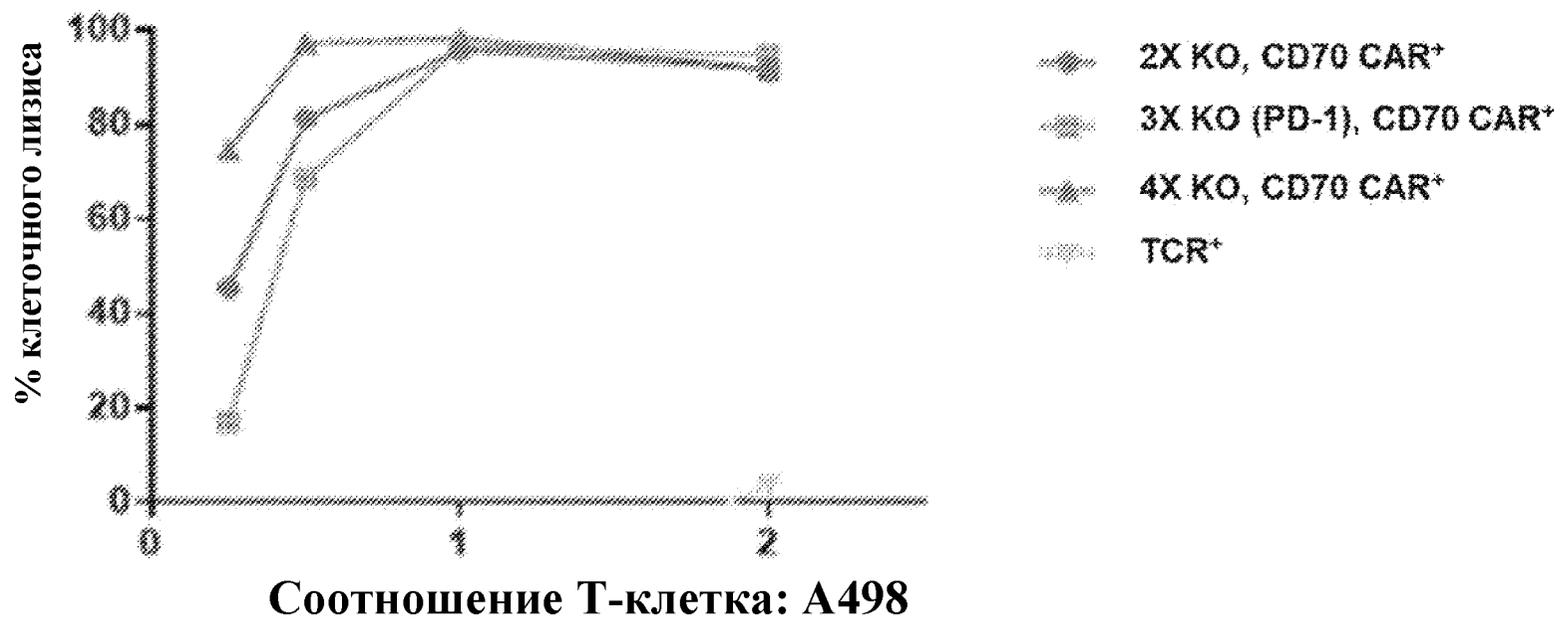
Фиг.32



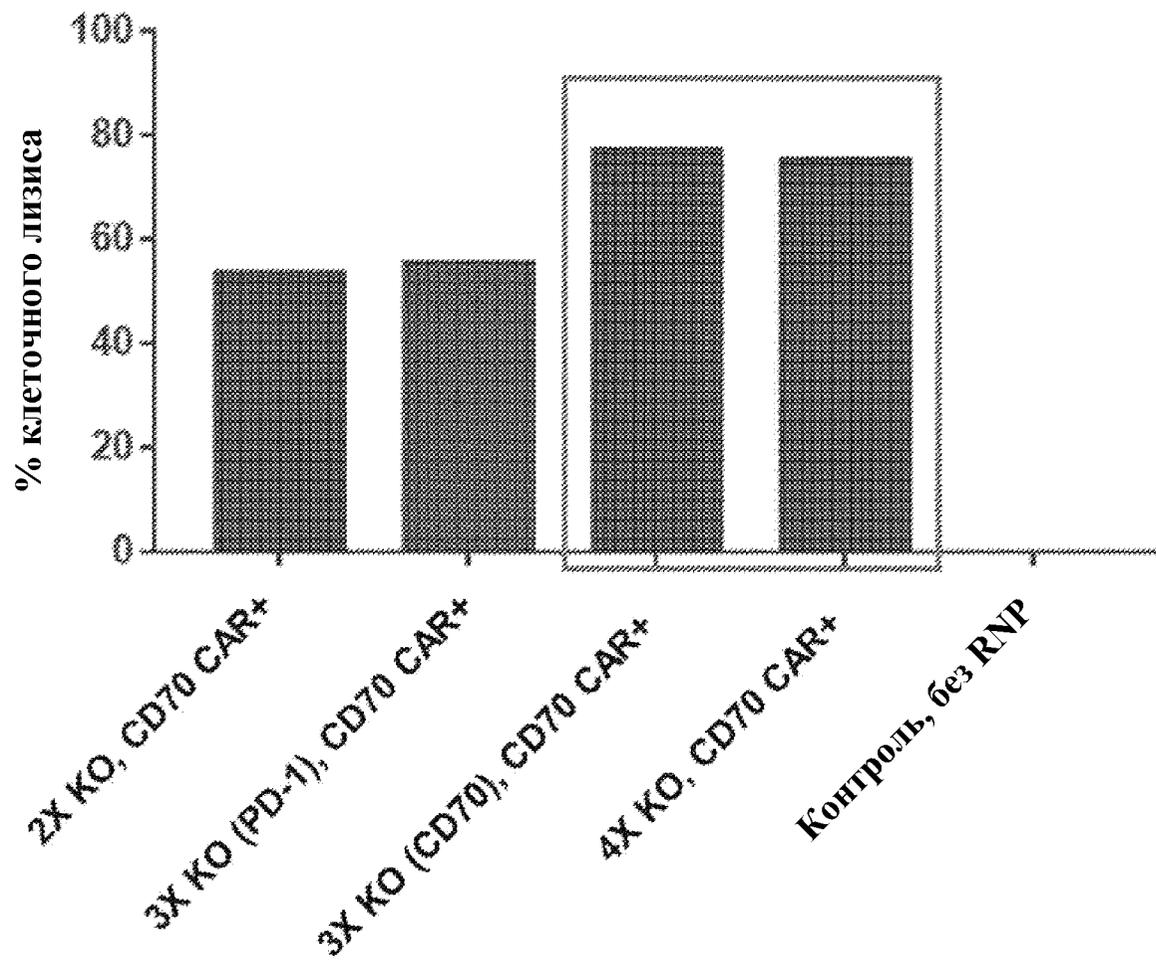
Фиг.33



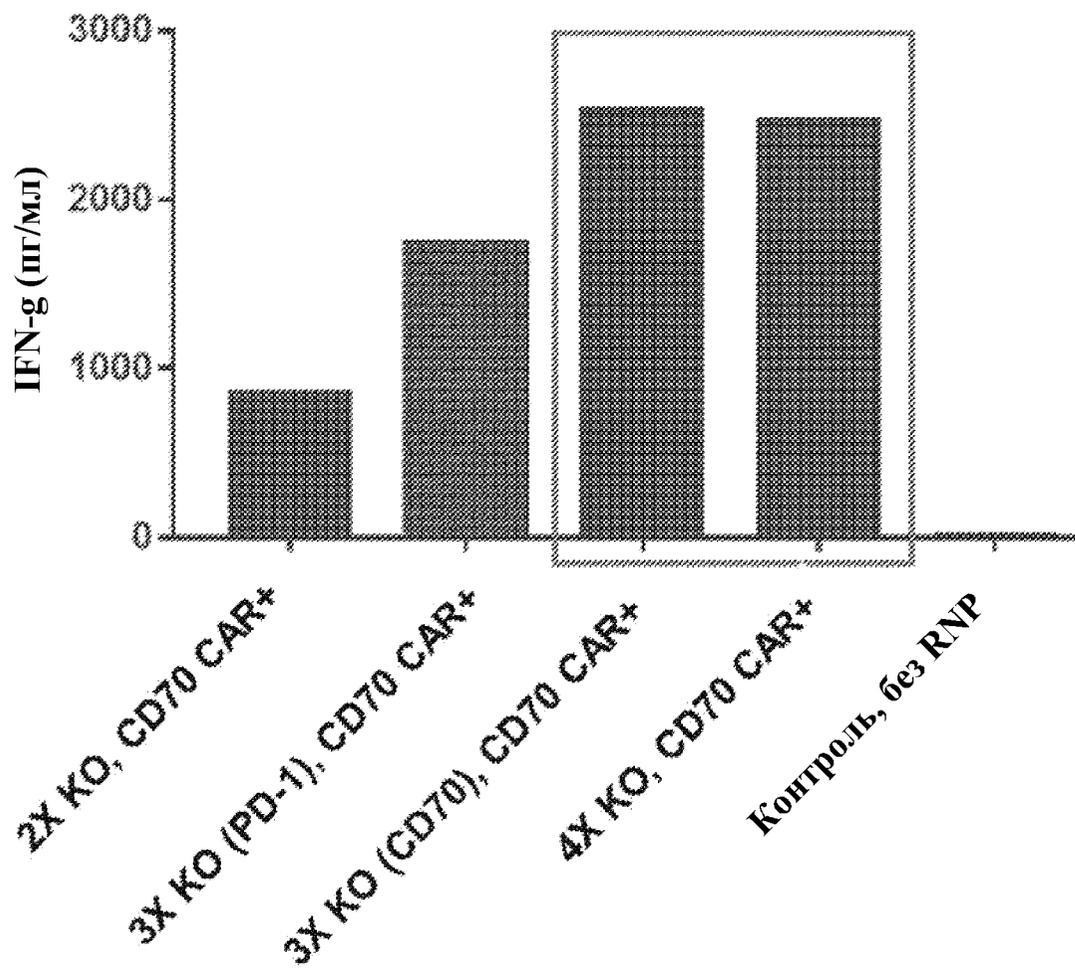
Фиг.34



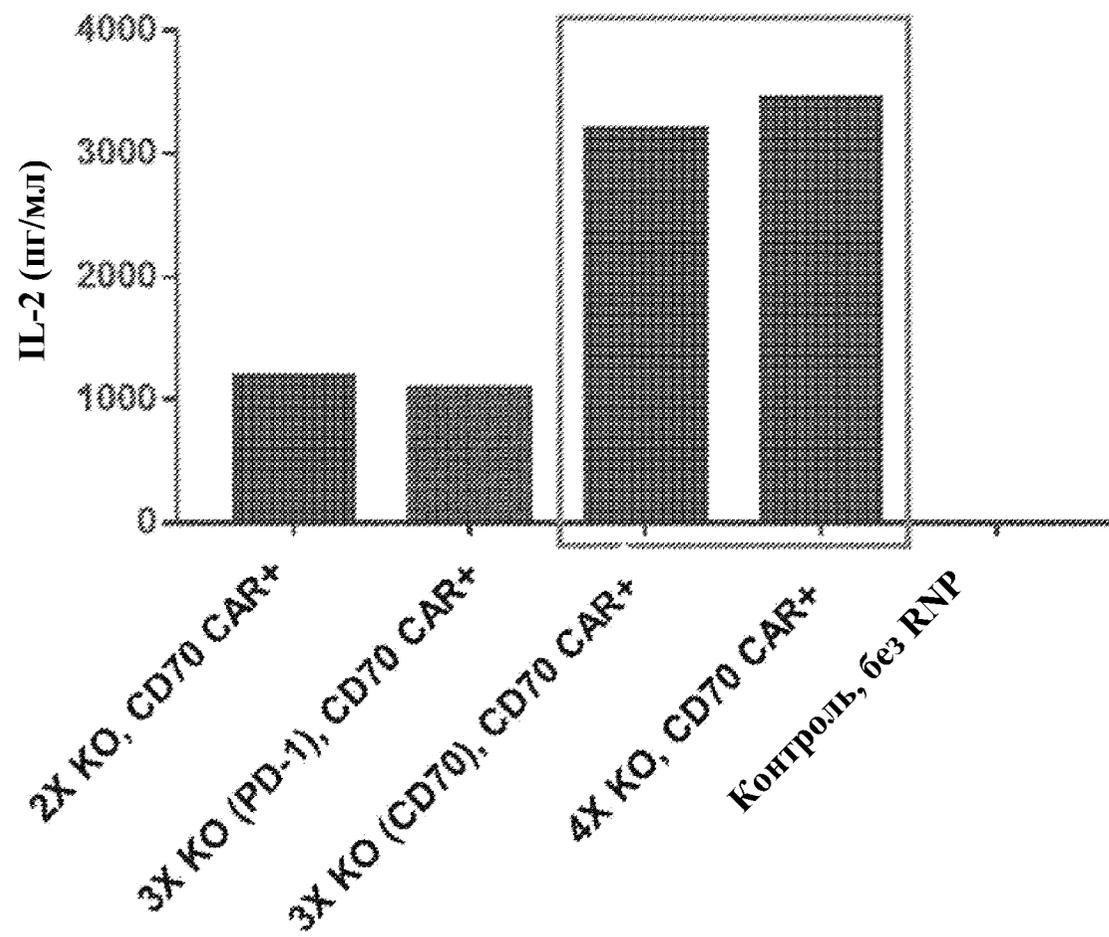
Фиг.35



Фиг.36

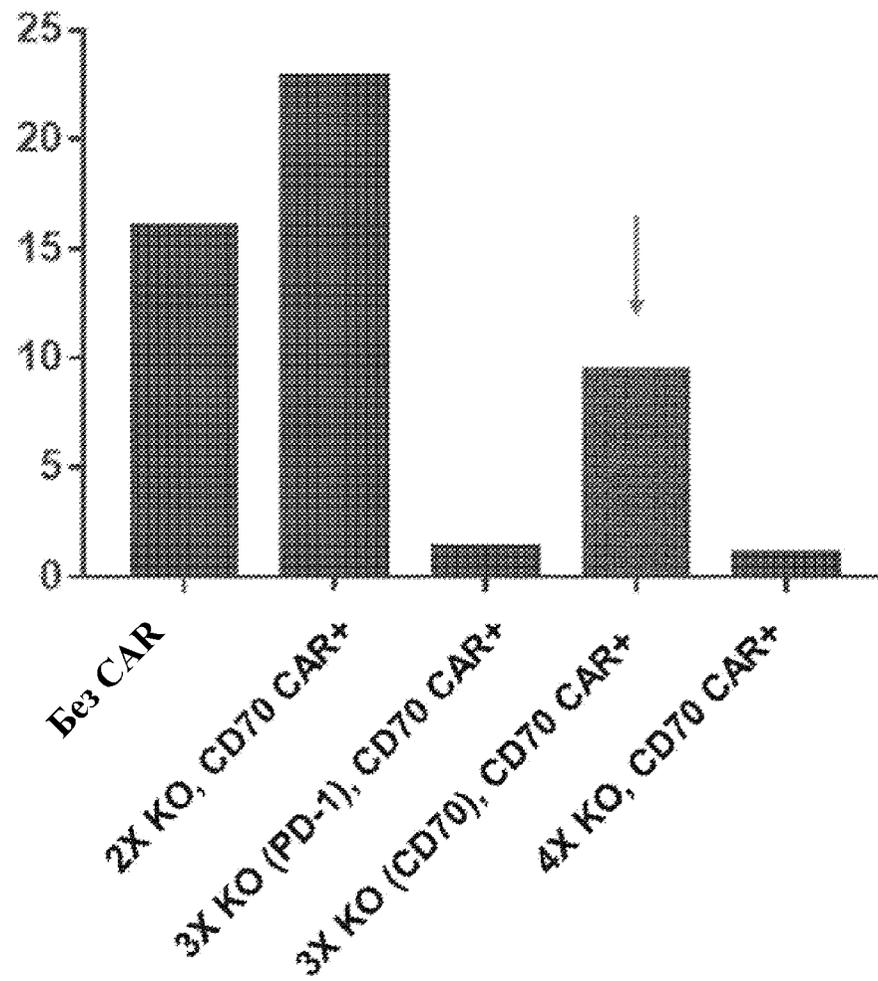


Фиг.37А



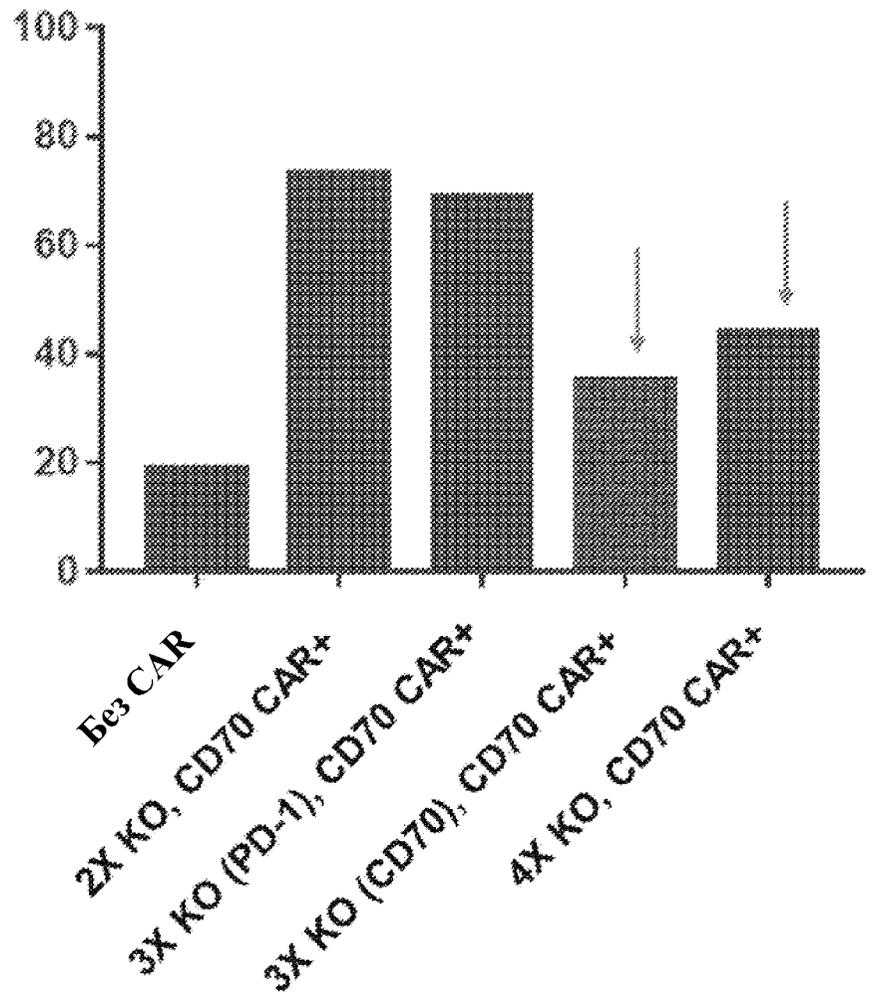
Фиг.37В

% экспрессирующих CD4 Т-клеток



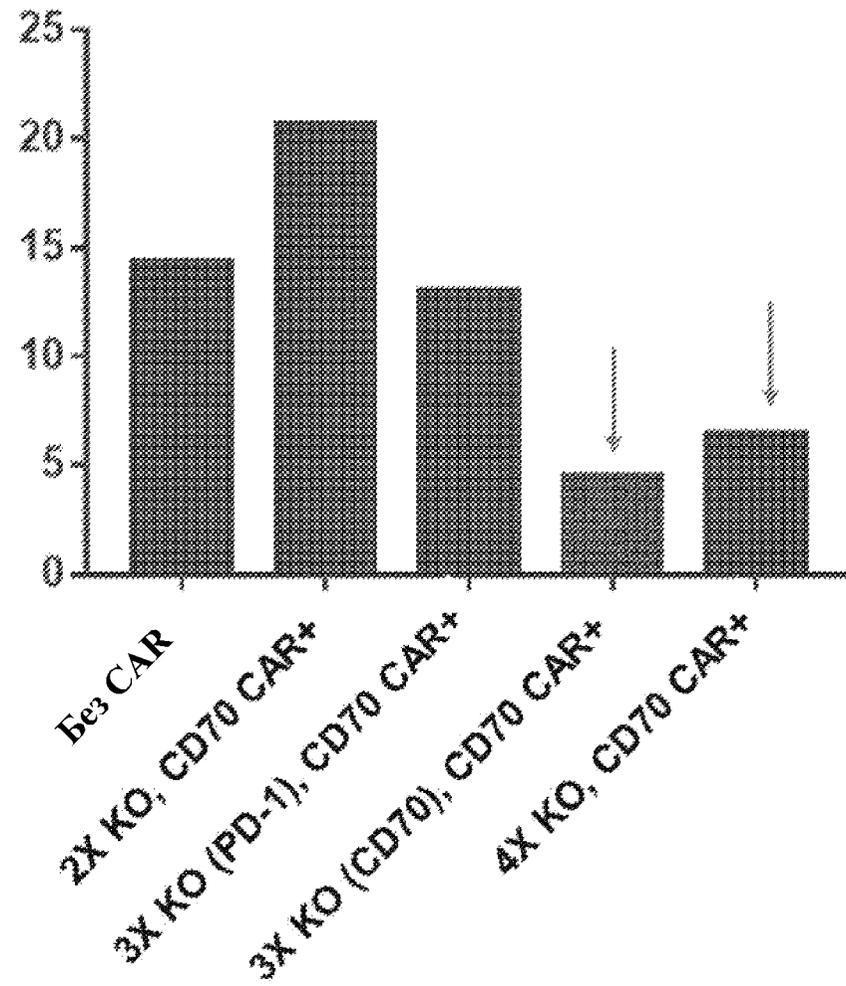
Фиг.38

% экспрессирующих CD8 T-клеток

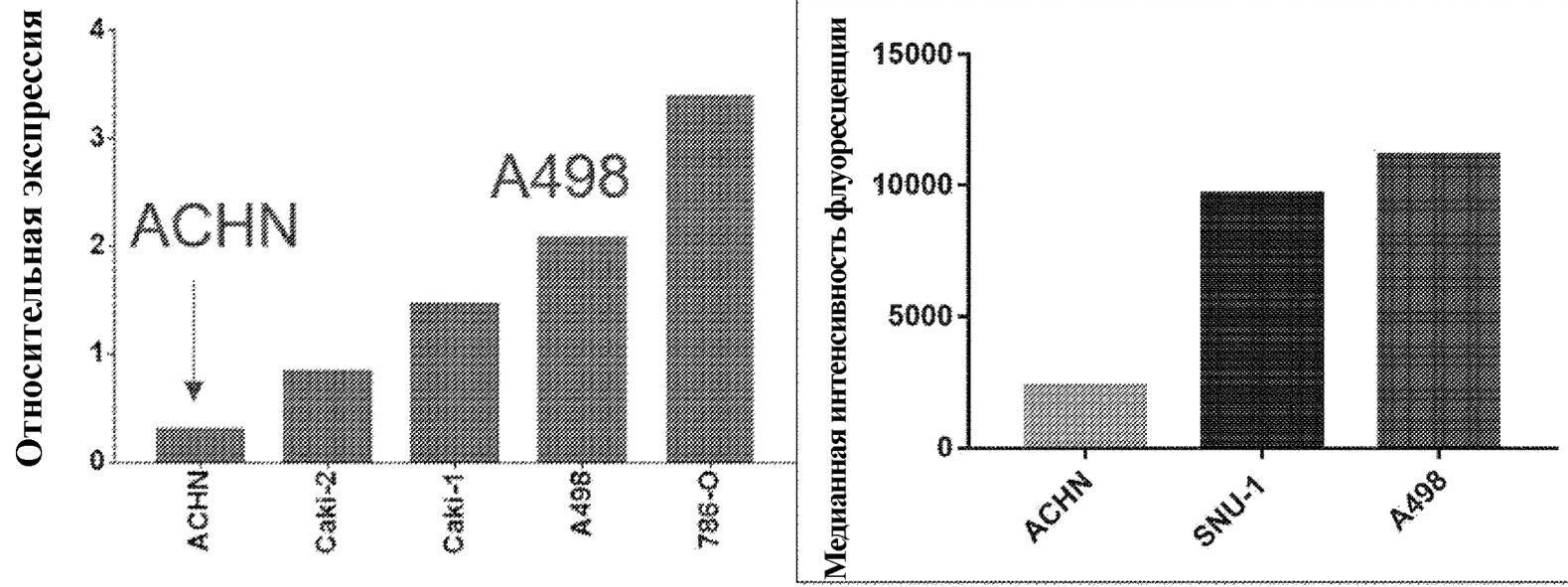


Фиг.39А

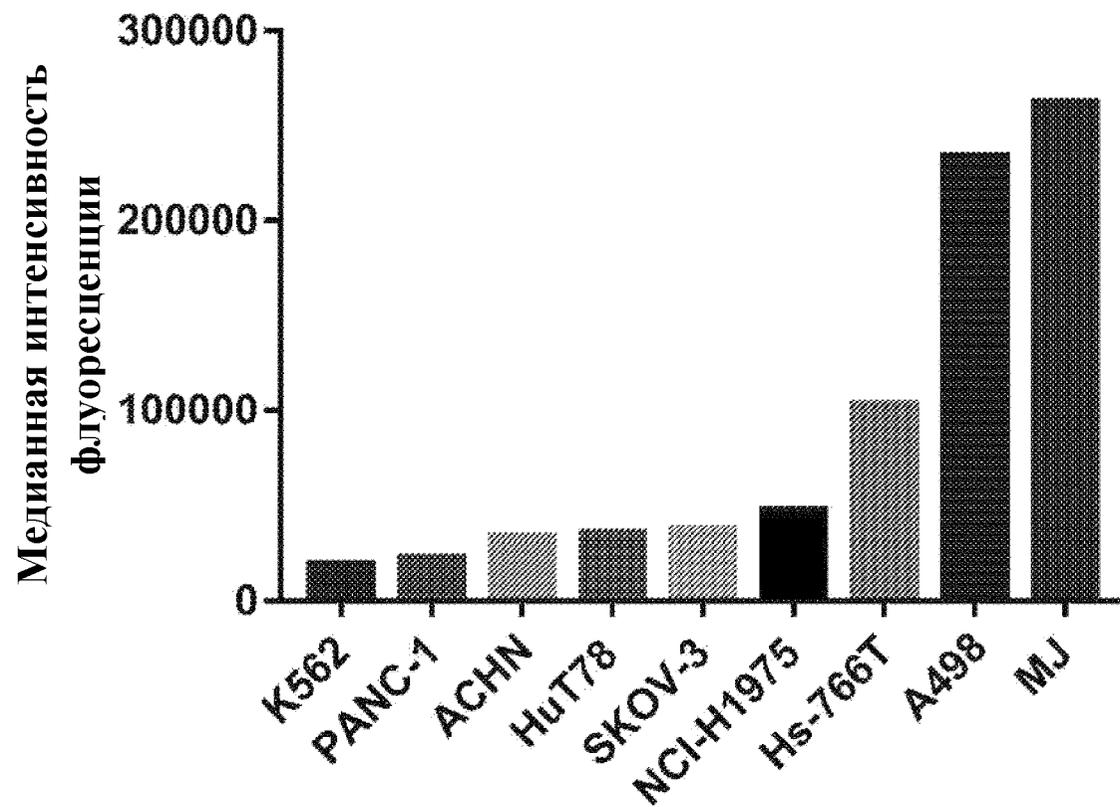
% экспрессирующих CD4 T-клеток



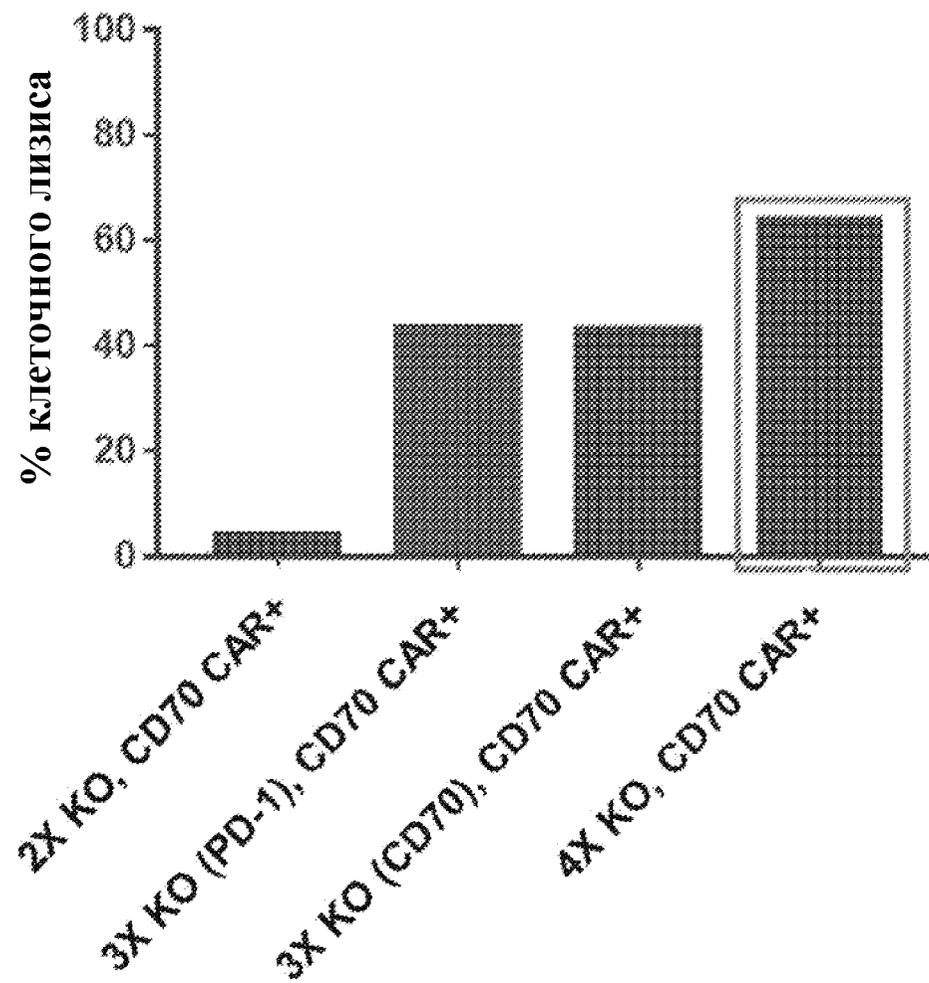
Фиг.39В



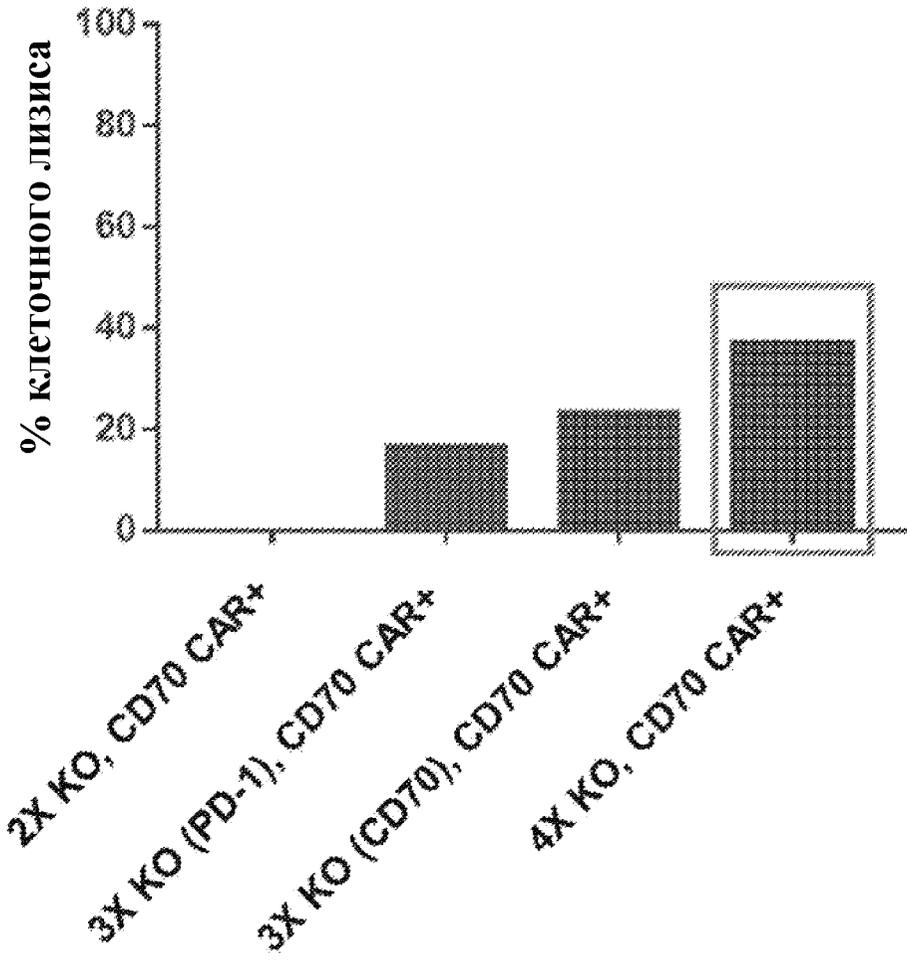
Фиг.40А



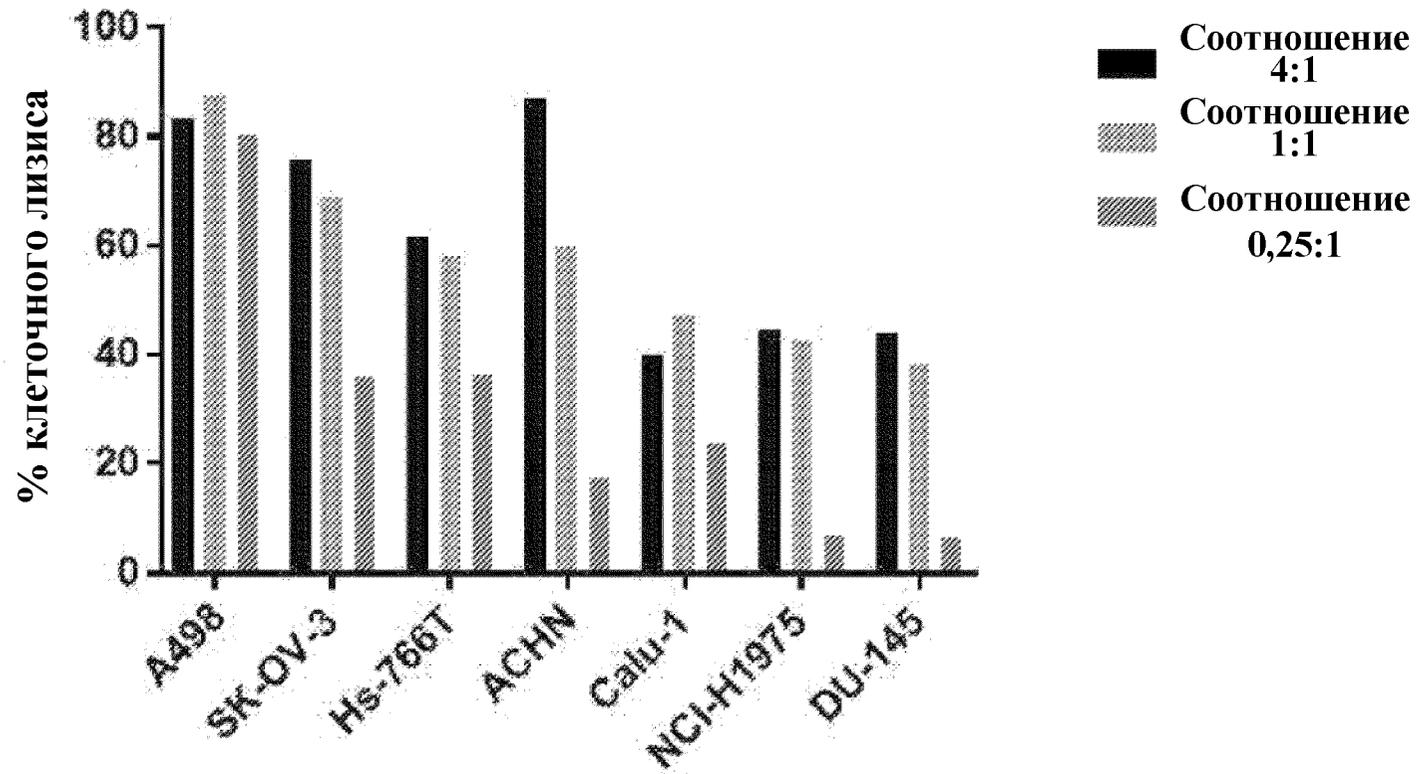
Фиг.40В



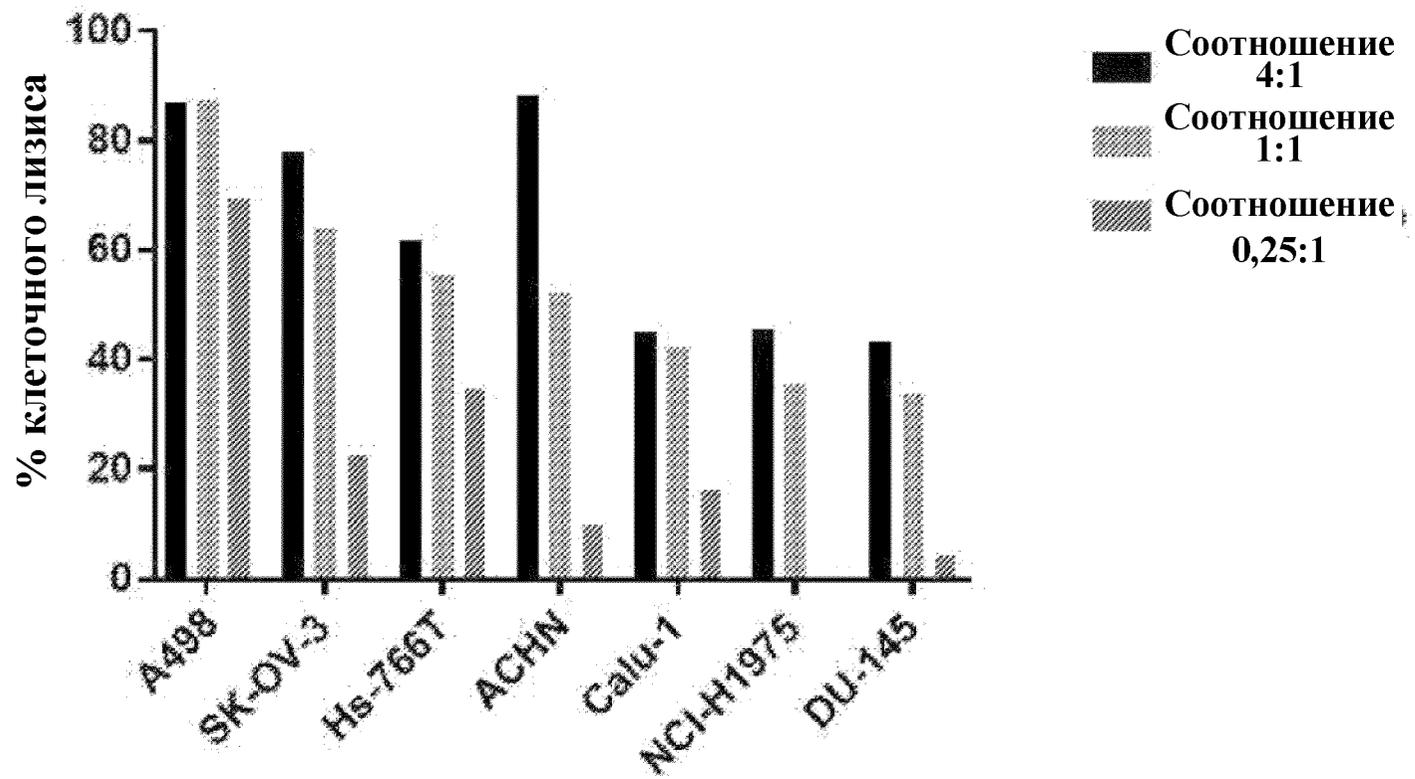
Фиг.40С



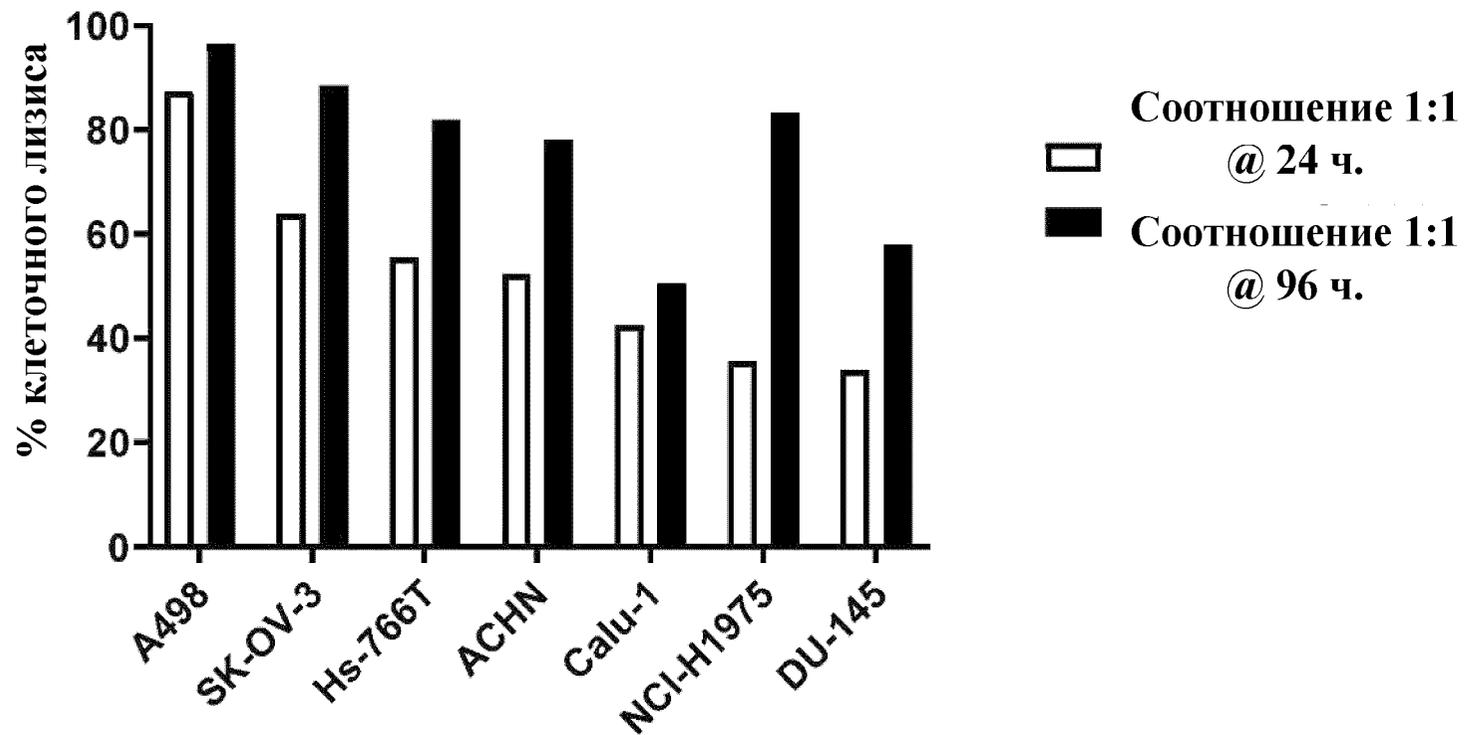
Фиг.40D



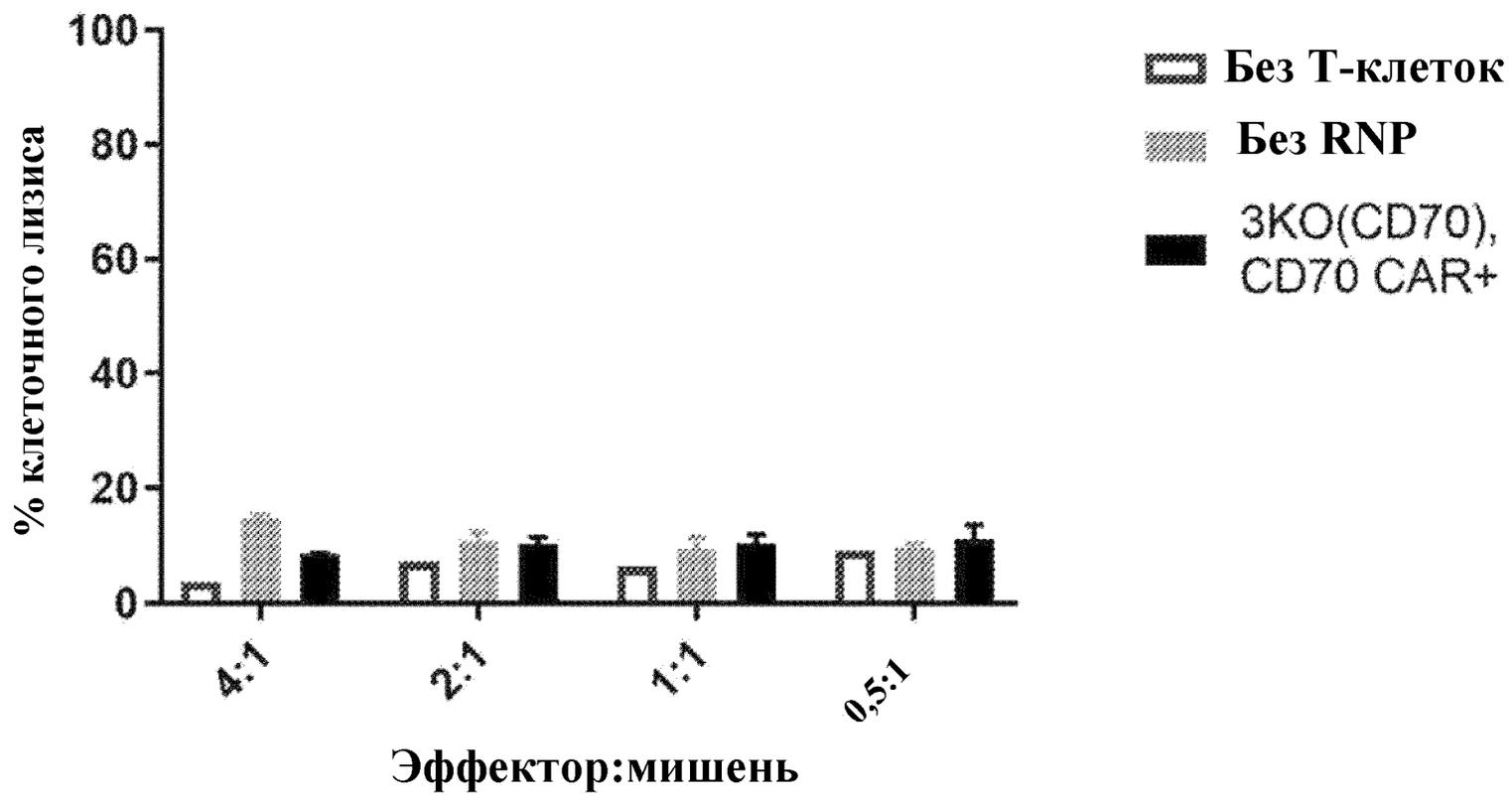
Фиг.40Е



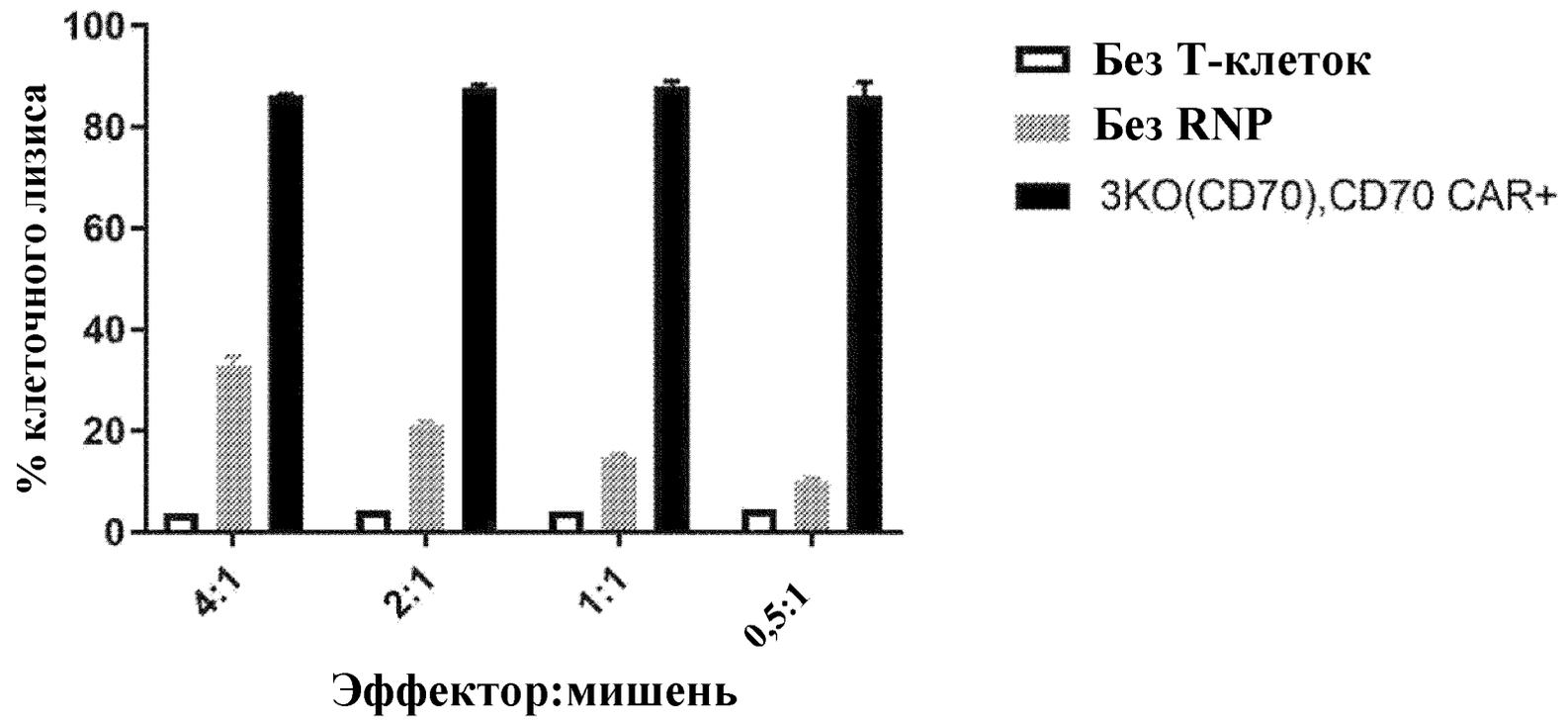
Фиг.40F



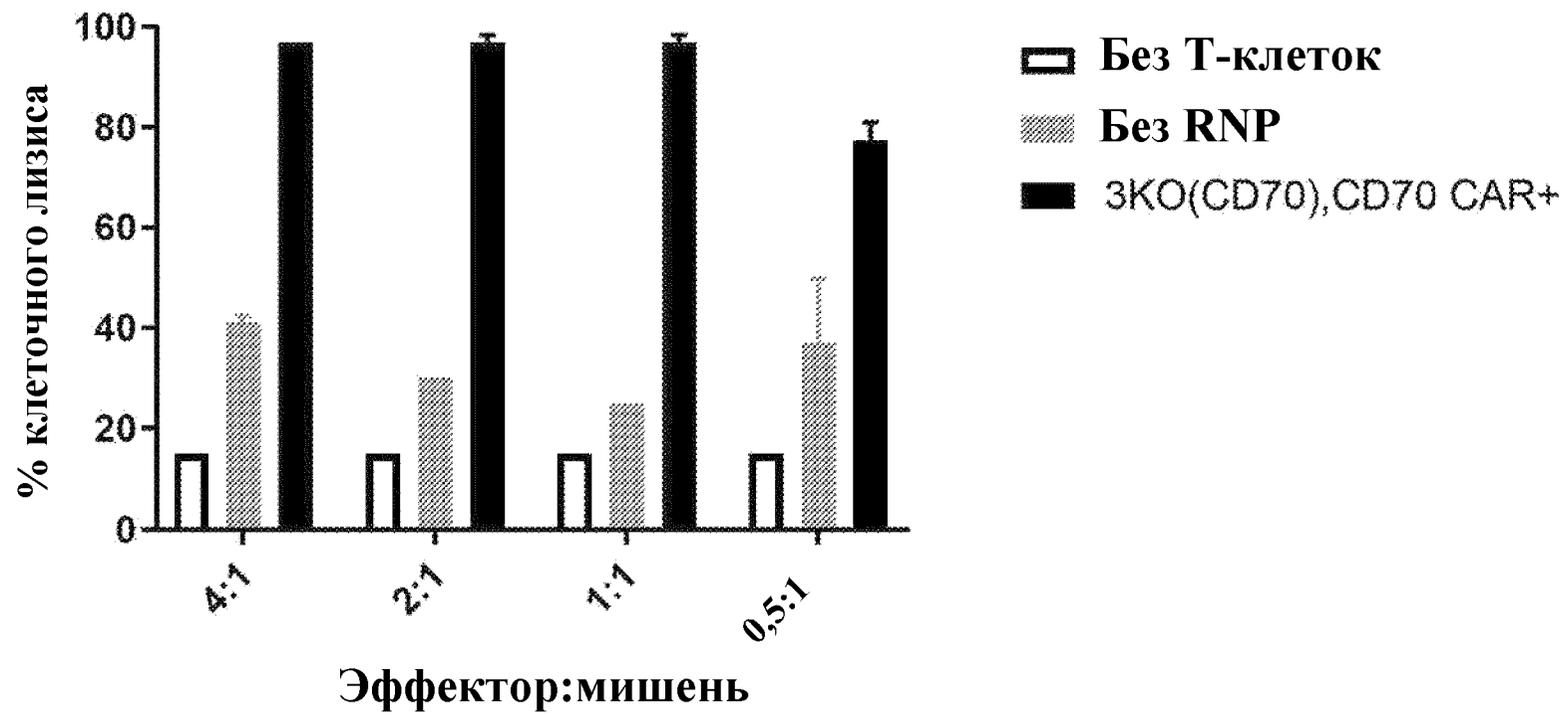
Фиг.40G



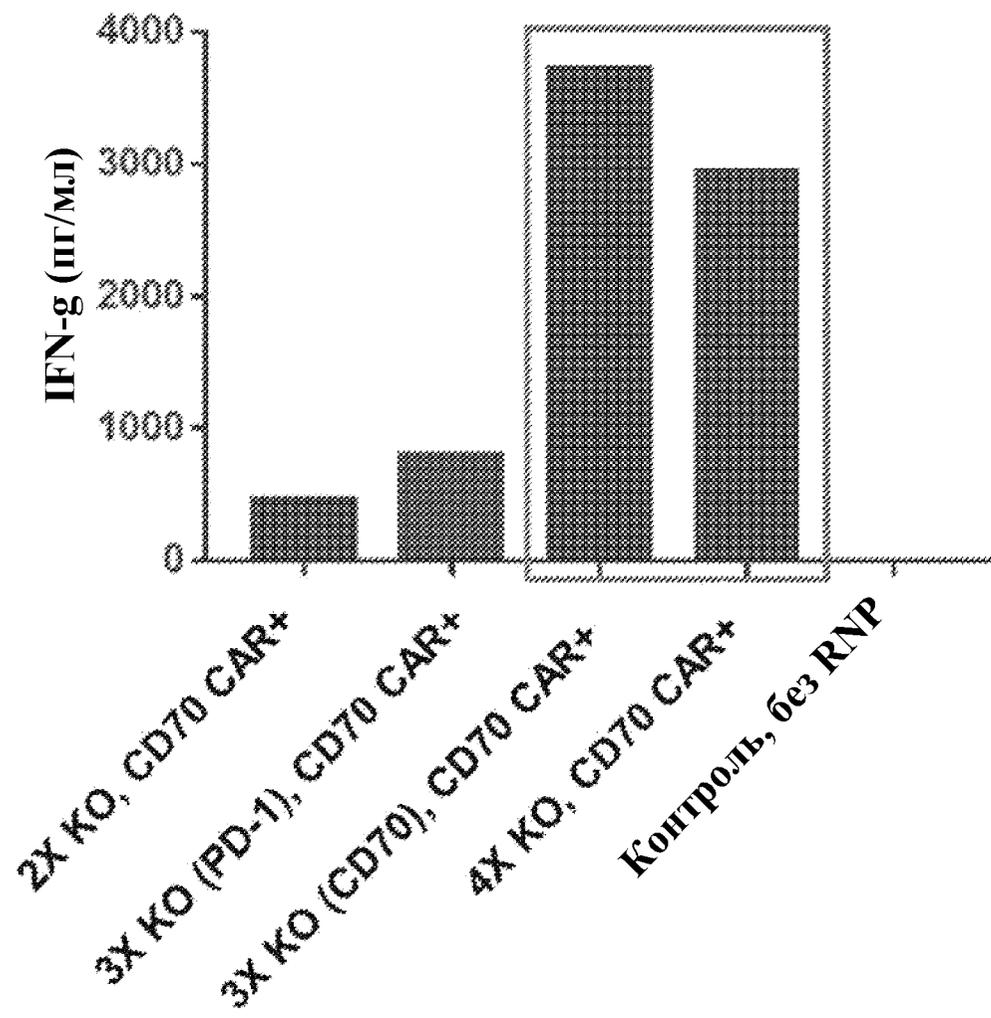
Фиг.40Н



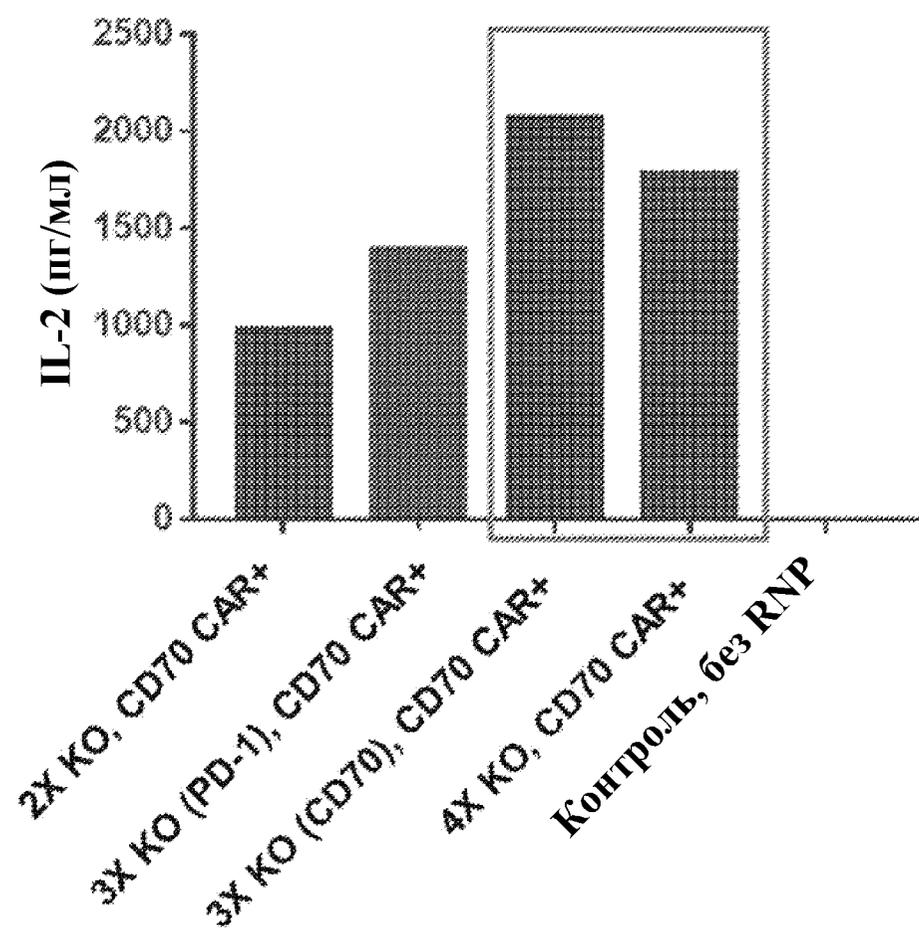
Фиг.40I



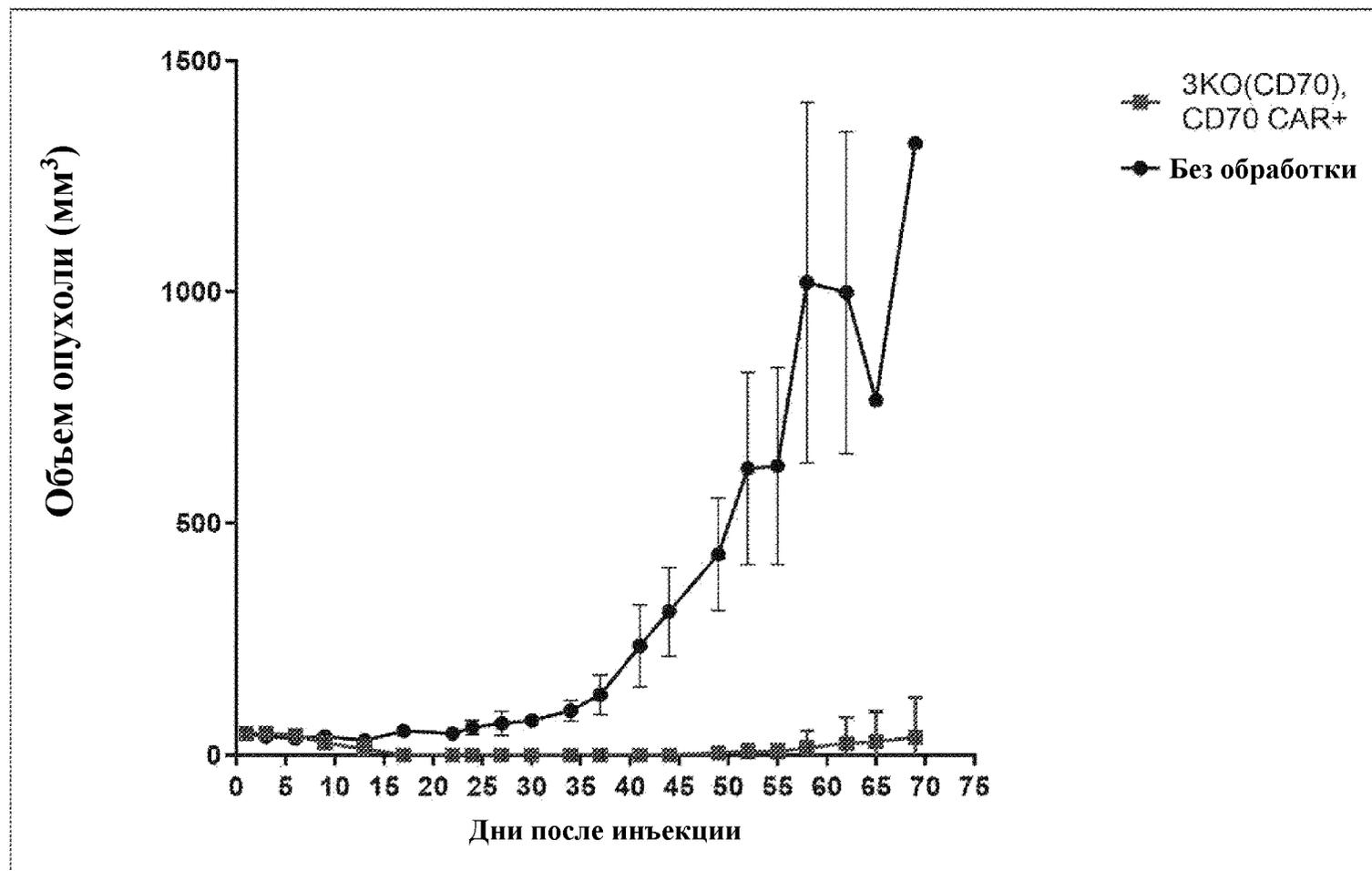
Фиг.40J



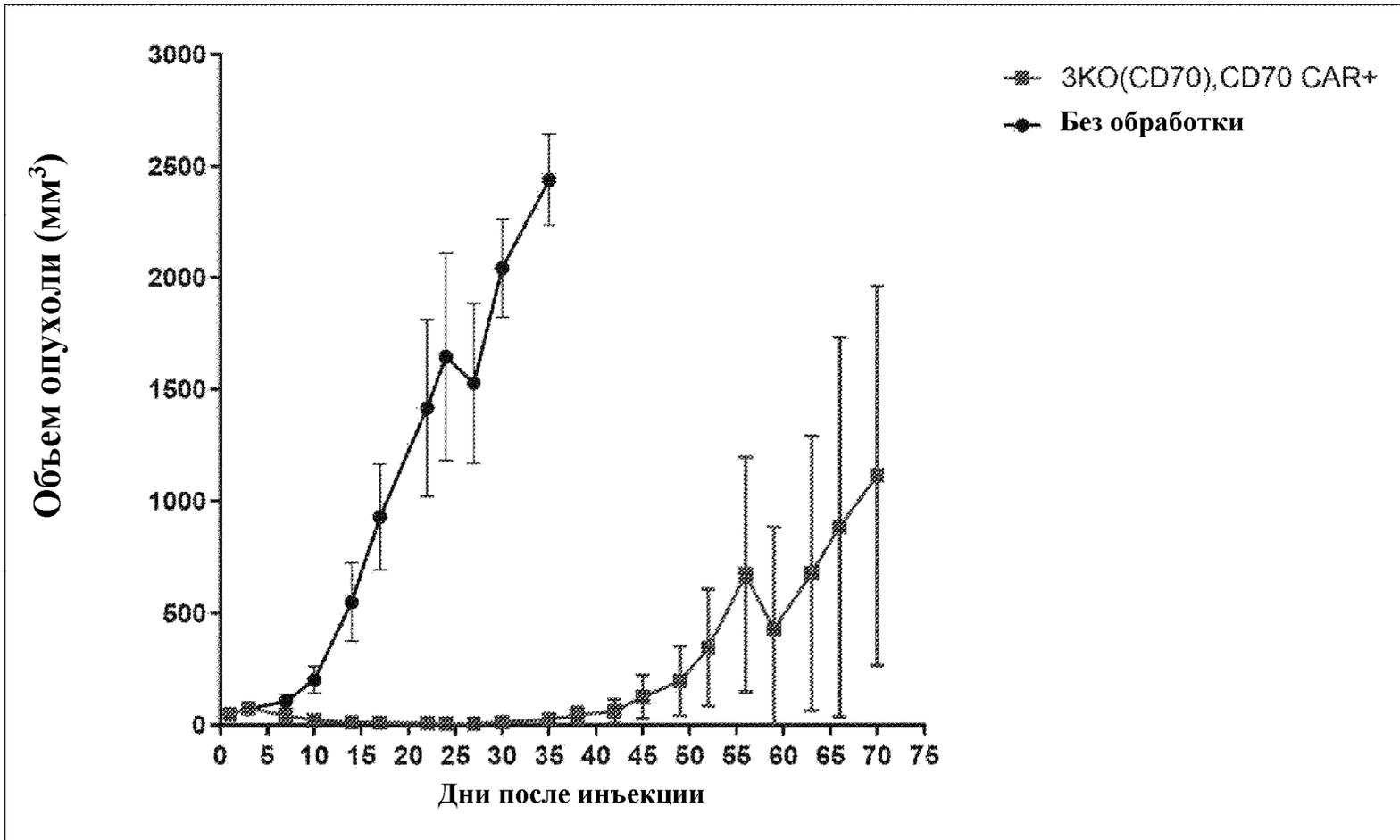
Фиг.41А



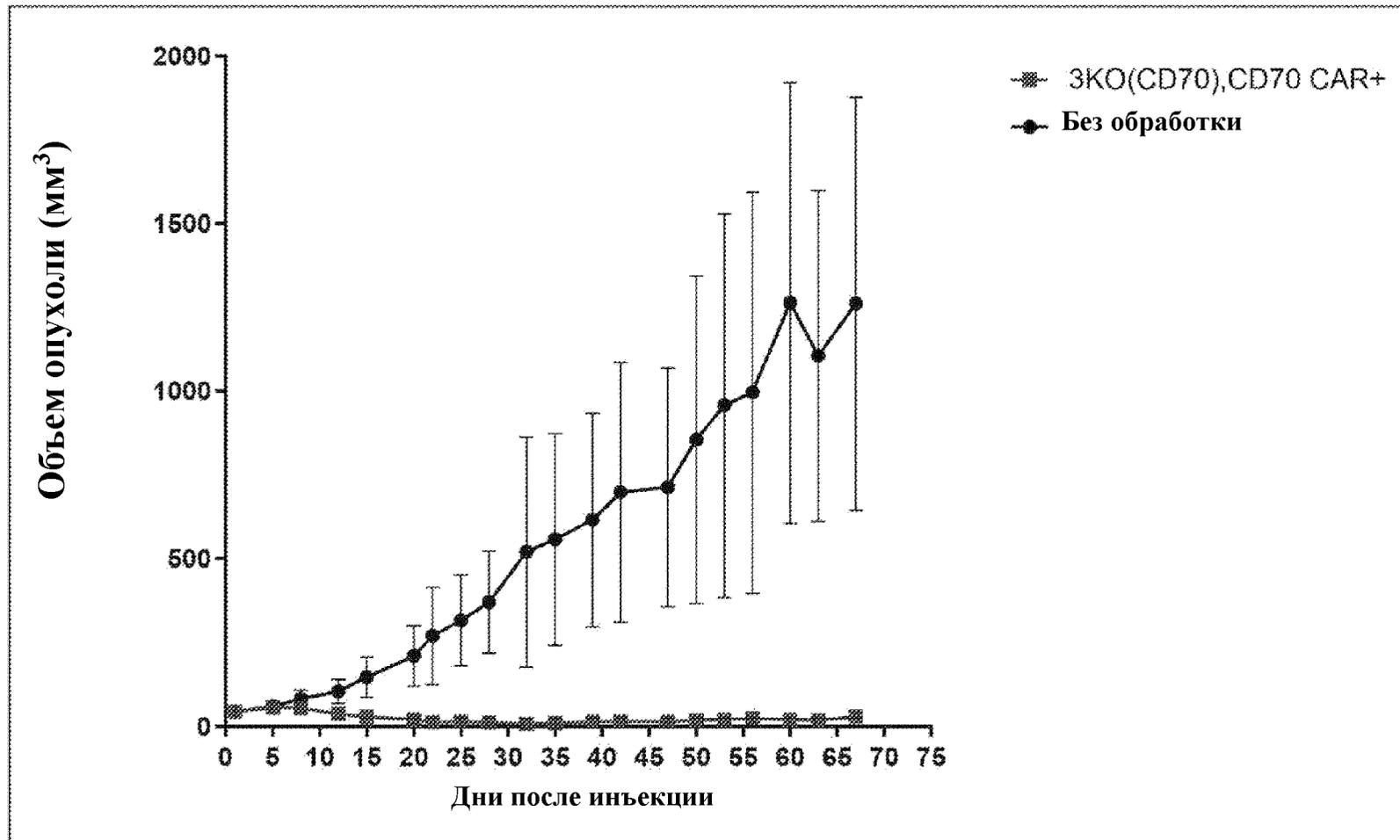
Фиг.41В



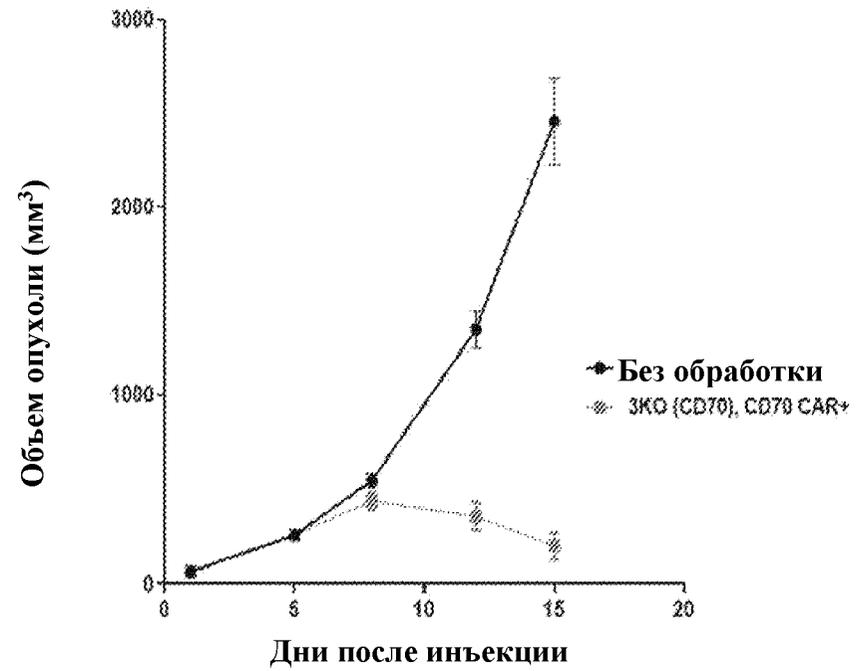
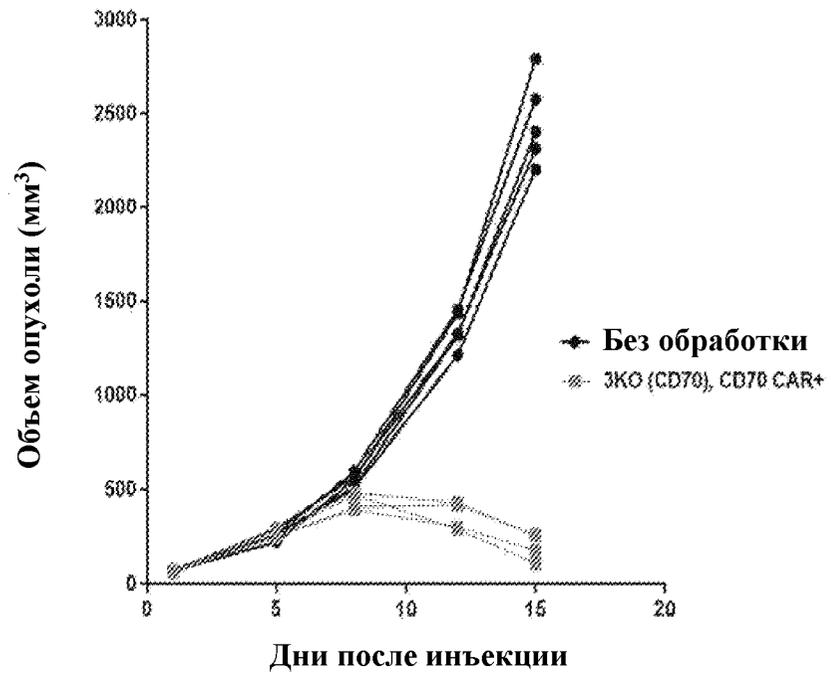
Фиг.42А



Фиг.42В



Фиг.42С



Фиг.42D