

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393549** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.26

(22) Дата подачи заявки
2022.06.30

(51) Int. Cl. *C07K 16/30* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ПОЛИПЕПТИД, НАЦЕЛЕННЫЙ НА В7НЗ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **202110749481.6**

(32) **2021.07.01**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/103070**

(87) **WO 2023/274384 2023.01.05**

(71) Заявитель:
**НИНБО ТИ-МЭКСИМУМ
БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО.,
ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Шан Сяююнь, Цзян Хайцзюань, Ван
Дань, Ли Цзялу, Ма Шаовэнь, Шэнь
Хой, Ма Ли, Чэнь Вэйцзе (CN)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду, который специфически связывается с В7НЗ и содержит по меньшей мере одну комплементарность-определяющую область (CDR) варибельной области тяжелой цепи (VH) антитела, где VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25. Настоящее изобретение дополнительно относится к химерному антигенному рецептору, содержащему антигенсвязывающий полипептид, и к универсальной CAR-T-клетке, содержащей химерный антигенный рецептор. CAR-T-клетка распознает поверхностный антиген опухолевой клетки и одновременно нокаутирует гены TCR и HLA-A, экспрессируемые клеткой, а поэтому иммунное отторжение, вызванное аллогенной терапией CAR-T, снижается, продолжительность жизни клетки увеличивается, а противоопухолевый эффект улучшается.

A1

202393549

202393549

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579979EA/30

АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ПОЛИПЕПТИД, НАЦЕЛЕННЫЙ НА В7НЗ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники

Настоящая заявка относится к области биомедицины, а в частности, к антигенсвязывающему полипептиду, нацеленному на В7НЗ, и к его применению.

Предпосылки создания изобретения

Глиобластомы составляют 15% всех опухолей головного мозга и могут возникать из обычных клеток головного мозга или развиваться из астроцитов низкой степени злокачественности. Обычно, продолжительность жизни после постановки диагноза составляет от 12 до 15 месяцев, и из них только у 3% - 7% пациентов она составляет более пяти лет. Без лечения, продолжительность жизни обычно составляет 3 месяца. Ежегодно, приблизительно у 3 из каждых 100 тысяч человек впервые диагностируется глиобластома, которая является наиболее распространенным раком головного мозга и второй по распространенности опухолью головного мозга после менингиомы.

С развитием теории противоопухолевого иммунитета и с развитием новой технологии, клеточная иммунотерапия опухолей привлекает все больше внимания специалистов. Технология CAR-T-клеток представляет собой клеточный терапевтический подход, который дал отличные результаты в иммунотерапии опухолей, особенно при лечении гематологических опухолей. Генетически сконструированные Т-клетки, используемые в CAR-T-иммунотерапии, могут специфически распознавать и уничтожать опухолевые клетки, экспрессирующие специфические антигены, без рестрикции по МНС. CAR-T-иммунотерапия давала хорошие результаты при лечении различных В-клеточных злокачественных опухолей, например, были использованы CAR-T-клетки, нацеленные на CD19, для лечения острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) и неходжкинской лимфомы (НХЛ). В то же время, клиническое применение CAR-T-клеток для лечения множественной миеломы и рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы продолжается и дает обнадеживающие результаты.

В7НЗ, также называемый CD276, принадлежит к семейству иммуномодулирующих белков В7 и представляет собой мембранный белок типа I с последовательностью внеклеточного домена, сходной с таковыми у других членов семейства В7. Ген В7НЗ локализован на 15-й хромосоме человека и состоит из десяти экзонов, из которых экзоны 4-7 кодируют внеклеточные домены IgV-IgC. мРНК В7НЗ экспрессируется в различных нормальных тканях и в некоторых линиях опухолевых клеток и не обнаруживается в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК). Однако, экспрессия В7НЗ может быть индуцирована на дендритных клетках и моноцитах воспалительными цитокинами (IFN γ) и композициями РМА и иономицина. Хотя мРНК В7НЗ широко экспрессируется в нормальных тканях, однако, уровень экспрессии белка В7НЗ чрезвычайно низок или

вообще отсутствует в нормальных тканях, что указывает на то, что экспрессия белка B7H3 подвергается строгой посттранскрипционной регуляции. И напротив, белок B7H3 сверхэкспрессируется в различных злокачественных опухолях и связан с плохим прогнозом, относительно высокой степенью злокачественности опухоли и ее метастазированием, резистентностью к лекарственным средствам и низкой общей продолжительностью жизни.

Дифференциальная экспрессия B7H3 между опухолями и здоровыми тканями делает его весьма подходящим в качестве терапевтической мишени, поскольку воздействие на этот антиген дает очень незначительные побочные эффекты. Результаты доклинических исследований показали, что ингибирование или снижение уровня экспрессии белка B7H3 в опухолевых клетках может снижать пролиферацию клеток и гликолиз, а также повышать чувствительность опухолевых клеток к лекарственным средствам.

Была изучена терапия CAR-T-клетками, нацеленная на B7H3. Одно доклиническое исследование продемонстрировало, что CAR-T-клетки против B7H3, проявляют значительную противоопухолевую активность *in vivo* и могут способствовать регрессии сформировавшихся солидных сарком на различных моделях ксенотрансплантатов (включая остеосаркому, медуллобластому и саркому Юинга).

Однако, аутологичные T-клетки пациентов с трудом размножаются *in vitro* или имеют сниженные функции, что приводит к недостаточному количеству или низкому качеству полученных продуктов CAR-T-клеток. Универсальные CAR-T-клетки представляют собой T-клетки, выделенные у здоровых доноров, и полученные CAR-T-клетки не только обладают высокой эффективностью амплификации и высокой активностью, но также имеют повышенную вероятность инфицирования. Однако, универсальные CAR-T-клетки также ассоциируются с проблемами в отношении реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и иммунного отторжения. Система CRISPR/Cas9 представляет собой наиболее часто применяемый метод редактирования генов и может использоваться для получения T-клеток с дефицитом TCR и с дефицитом молекул HLA класса I, а также для снижения иммунного отторжения, вызванного аллогенной клеточной терапией.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к получению универсальной CAR-T-клетки, нацеленной на B7H3, которая распознает поверхностный антиген опухолевой клетки и одновременно нокаутирует гены TCR и HLA-A, экспрессируемые этой клеткой, так что иммунное отторжение, вызванное аллогенной терапией CAR-T-клетками снижается, время выживания клетки продлевается, и противоопухолевый эффект улучшается.

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду, который связывается с B7H3 и содержит по меньшей мере одну комплементарность-определяющую область (CDR) варибельной области тяжелой цепи (VH) антитела, где VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий полипептид содержит VH, где VH содержит комплементарность-определяющую область 1 тяжелой цепи (HCDR1), комплементарность-определяющую область 2 тяжелой цепи (HCDR2), и комплементарность-определяющую область 3 тяжелой цепи (HCDR3), и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит:

i) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; или

ii) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит каркасную область 1 тяжелой цепи (HFR1), каркасную область 2 тяжелой цепи (HFR2), каркасную область 3 тяжелой цепи (HFR3) и каркасную область 4 тяжелой цепи (HFR4), и HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HFR2 содержит

SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий полипептид включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело включает моноклональное антитело, поликлональное антитело, димер, полимер, мультиспецифическое антитело, интактное антитело, фрагмент антитела, человеческое антитело, гуманизованное антитело или химерное антитело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий фрагмент включает Fab-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv) или однодоменное антитело (VHH).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему нацеливающую группу, где нацеливающая группа содержит вышеупомянутый антигенсвязывающий полипептид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающая группа включает VHH.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит трансмембранный домен, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен, происходящий от одного или нескольких белков, выбранных из группы, состоящей из: CD8A, CD8B, CD28, CD3ε (CD3e), 4-1BB, CD4, CD27, CD7, PD-1, TRAC, TRBC, CD3ζ, CTLA-4, LAG-3, CD5, ICOS, OX40, NKG2D, 2B4 (CD244), FcεRIγ, BTLA, CD30, GITR, HVEM, DAP10, CD2, NKG2C, LIGHT, DAP12, CD40L (CD154), TIM1, CD226, DR3, CD45, CD80, CD86, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64 и SLAM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен, происходящий от CD8A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 42 - SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен, где внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD28, CD137, CD27, CD2, CD7, CD8A, CD8B, OX40, CD226, DR3, SLAM, CDS, ICAM-1, NKG2D, NKG2C, B7H3, 2B4, FcεRIγ, BTLA, GITR, HVEM, DAP10, DAP12, CD30, CD40, CD40L, TIM1, PD-1, LFA-1, LIGHT, JAML, CD244, CD100, ICOS, CD40 и MyD88.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен происходит от костимулирующего сигнального домена 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность,

представленную в любой из SEQ ID NO: 91 - SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен, где внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD3 ζ , CD3 δ , CD3 γ , CD3 ϵ , CD79a, CD79b, Fc ϵ RI γ , Fc ϵ RI β , Fc γ RIIIa, вируса лейкоза крупного рогатого скота gp30, вируса Эпштейна-Барра (EBV) LMP2A, вируса иммунодефицита обезьян PBj14 Nef, DAP10, DAP-12, и домен, содержащий по меньшей мере один ITAM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен, происходящий от CD3 ζ .

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 124 - SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит шарнирную область, расположенную между нацеливающим фрагментом и трансмембранным доменом, где шарнирная область содержит шарнирную область, происходящую от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD28, IgG1, IgG4, IgD, 4-1BB, CD4, CD27, CD7, CD8A, PD-1, ICOS, OX40, NKG2D, NKG2C, Fc ϵ RI γ , BTLA, GITR, DAP10, TIM1, SLAM, CD30 и LIGHT.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирная область содержит шарнирную область, происходящую из CD8A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 135-SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ненацеливающая часть химерного антигенного рецептора содержит трансмембранный домен молекулы CD8A, шарнирную область CD8A, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB и внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ .

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ненацеливающая часть химерного антигенного рецептора содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор дополнительно содержит фрагмент сигнального пептида, где С-конец фрагмента сигнального пептида связан с N-концом нацеливающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент сигнального пептида включает фрагмент сигнального пептида CD8A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент сигнального пептида содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ

ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к одной или нескольким выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим вышеупомянутый антигенсвязывающий полипептид или вышеупомянутый химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему вышеупомянутую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой экспрессионный вектор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор выбран из ДНК-вектора, РНК-вектора, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора и ретровирусного вектора.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к клетке, i) содержащей вышеупомянутую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вышеупомянутый вектор; и/или ii) экспрессирующей вышеупомянутый антигенсвязывающий полипептид или химерный антигенный рецептор.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к иммунной эффекторной клетке, содержащей вышеупомянутую молекулу нуклеиновой кислоты или вышеупомянутый вектор и/или экспрессирующей вышеупомянутый CAR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает человеческую клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (НК-клетку), макрофаг, НКТ-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает аутологичную или неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает модифицированную иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированная иммунная эффекторная клетка включает клетку, которая уменьшает иммунное отторжение, вызванное аллогенной клеточной терапией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, функции Т-клеточного антигенного рецептора (TCR) и главных комплексов гистосовместимости (МНСI, МНСII) в модифицированной иммунной эффекторной клетке ингибируются в Т-клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает снижение уровня экспрессии и/или активности одного или нескольких генов, ассоциированных с иммунным отторжением.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген, ассоциированный с иммунным отторжением, выбран из одной или нескольких нижеуказанных групп: TRAC, TRBC, HLA-A, HLA-B, B2M и СРТА.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в модифицированной иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена СРТА в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена B2M в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в модифицированной иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена B2M в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена СРТА в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, снижение уровня экспрессии и/или активности гена включает снижение экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или снижение экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает: нокаут гена, мутацию гена и/или сайленсинг гена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут любого из двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной эффекторной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут экзона гена TRAC и нокаут экзона гена HLA-A в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку одного или нескольких веществ, выбранных из группы, состоящей из: антисмысловой РНК, киРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация дополнительно

включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена TRAC, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 157-SEQ ID NO: 171.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 172-SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент Cas включает белок Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антисмысловая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка представляет собой клетку, гомозиготную по HLA-B.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B*54 и гомозиготу HLA-B*55.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка представляет собой клетку, гомозиготную или гетерозиготную по HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота или гетерозигота HLA-A включает гомозиготу HLA-A*02, гомозиготу HLA-A*11, гетерозиготу HLA-A*02/A*11 или гомозиготу HLA-A*24.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения иммунной эффекторной клетки, который включает введение вышеупомянутой молекулы нуклеиновой кислоты или вышеупомянутого вектора в иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает: модификацию иммунной эффекторной клетки до/после введения молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. XX-XX или вектора по любому из пп. XX-XX в иммунную эффекторную клетку, где модификация включает подавление экспрессии и/или активности одного или нескольких генов, ассоциированных с иммунным отторжением.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген, ассоциированный с иммунным отторжением, выбран из одной или нескольких из нижеследующих групп:

TRAC, TRBC, HLA-A, HLA-B, B2M и СИТА.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в иммунной эффекторной клетке снижается по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующего гена в соответствующей немодифицированной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена СИТА не снижается по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующего гена в соответствующей немодифицированной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена B2M не снижается по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующего гена в соответствующей немодифицированной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена СИТА не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена B2M не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, снижение уровня экспрессии и/или активности гена включает снижение экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или снижение экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает: нокаут гена, мутацию гена и/или сайленсинг гена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут любого из двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной эффекторной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут экзона гена TRAC и нокаут экзона гена HLA-A в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку одного или нескольких веществ, выбранных из группы, состоящей из: антисмысловой РНК, киРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на

экзонную часть гена TRAC, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 157-SEQ ID NO: 171.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 172-SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент Cas включает белок Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает человеческую клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (НК-клетку), макрофаг, НКТ-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает аутологичную или неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой клетку, гомозиготную по HLA-B.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B*54 и гомозиготу HLA-B*55.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой клетку, гомозиготную или гетерозиготную по HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота или гетерозигота HLA-A включает гомозиготу HLA-A*02, гомозиготу HLA-A*11, гетерозиготу HLA-A*02/A*11 или гомозиготу HLA-A*24.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутого химерного антигенного рецептора, вышеупомянутой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, вышеупомянутого вектора, вышеупомянутой клетки или вышеупомянутой иммунной эффекторной клетки при получении CAR-T-клетки.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической

композиции, содержащей вышеупомянутый антигенсвязывающий полипептид, вышеупомянутый химерный антигенный рецептор, вышеупомянутую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, вышеупомянутый вектор, вышеупомянутую клетку и/или вышеупомянутую иммунную эффекторную клетку, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутого антигенсвязывающего полипептида, вышеупомянутого антигенного химерного рецептора, вышеупомянутой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, вышеупомянутого вектора, вышеупомянутой клетки, вышеупомянутой иммунной эффекторной клетки и/или вышеупомянутой фармацевтической композиции при лечении заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией В7Н3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает заболевание или расстройство, ассоциированное с усилением экспрессии В7Н3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает рак.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак включает аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак прямой и ободочной кишки, лимфому, рак пищевода, глиому головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркому, меланому, рак желудка, рак тимуса или рак эндометрия.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутого антигенсвязывающего полипептида, вышеупомянутого химерного антигенного рецептора, вышеупомянутой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, вышеупомянутого вектора, вышеупомянутой клетки, вышеупомянутой иммунной эффекторной клетки и/или вышеупомянутой фармацевтической композиция в целях приготовления лекарственного средства для лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак включает В7Н3-позитивный рак.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак включает аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак прямой и ободочной кишки, лимфому, рак пищевода, глиому головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркому, меланому, рак желудка, рак тимуса или рак эндометрия.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу профилактики или лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией В7Н3, где указанный способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества вышеупомянутого антигенсвязывающего полипептида, вышеупомянутого

химерного антигенного рецептора, вышеупомянутой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, вышеупомянутого вектора, вышеупомянутой клетки, вышеупомянутой иммунной эффекторной клетки и/или вышеупомянутой фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает заболевание или расстройство, ассоциированное с усилением экспрессии В7Н3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает рак.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак включает аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак прямой и ободочной кишки, лимфому, рак пищевода, глиому головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркому, меланому, рак желудка, рак тимуса или рак эндометрия.

Другие аспекты и преимущества настоящей заявки будут хорошо понятны специалистам в данной области исходя из нижеследующего подробного описания. В нижеследующем подробном описании показаны и описаны только репрезентативные варианты осуществления изобретения. Как будет понятно специалистам в данной области, содержание настоящей заявки позволяет специалисту в данной области вносить изменения в конкретные раскрытые варианты осуществления изобретения, которые не выходят за рамки существа и объема изобретения, и которые описаны в настоящей заявке. Соответственно, описания, приведенные на чертежах и в описании самой заявки, являются лишь иллюстративными, но не ограничивающими.

Краткое описание чертежей

Конкретные признаки изобретения, к которым относится настоящая заявка, изложены в прилагаемой формуле изобретения. Особенности и преимущества изобретения, к которым относится настоящая заявка, будут лучше поняты при рассмотрении репрезентативных вариантов осуществления изобретения и чертежей, подробно описанных ниже. Ниже приводится краткое описание чертежей:

На фиг. 1А показан вектор экспрессии лентивирусного гена CAR, кодирующего антитело против В7Н3, как описано в настоящей заявке;

На фиг. 1В проказана стратегия конструкции UCAR-T клетки пртив В7Н3 как описано в настоящей заявке;

На фиг. 2 показаны кривые аффинности для антител VHH против В7Н3, описанных в настоящей заявке;

На фиг. 3 показаны результаты анализа функции ADCC с использованием антител VHH против В7Н3, описанных в настоящей заявке;

На фиг. 4А-4С показаны результаты анализа фенотипа UCAR-T-клеток, содержащих антитело против В7Н3, как описано в настоящей заявке;

На фиг. 5 показан результат уничтожения клеток-мишеней UCAR-T-клетками,

содержащими антитело против В7Н3 и описанными в настоящей заявке;

На фиг. 6А-6С показаны результаты анализа секреции цитокинов UCAR-T-клетками, содержащими антитело против В7Н3, которые были описаны в настоящей заявке, и совместно культивированы с клетками-мишенями;

На фиг. 7 показан противоопухолевый эффект *in vivo* UCAR-T-клеток, содержащих антитело против В7Н3 и описанных в настоящей заявке;

На фиг. 8А-8В показаны результаты *in vivo* ответа на GVHD и реакции отторжения для нацеливания на UCAR-T-клетки, содержащие антитело против В7Н3 и описанные в настоящей заявке;

На фиг. 9 показан нецелевой анализ UCAR-T-клеток, содержащих антитело против В7Н3 и описанные в настоящей заявке;

На фиг. 10 показан анализ хромосомной транслокации UCAR-T-клеток, содержащих антитело против В7Н3 и описанных в настоящей заявке;

На фиг. 11 показан анализ кариотипа UCAR-T-клеток, содержащих антитело против В7Н3 и описанных в настоящей заявке;

На фиг. 12 показан анализ на остаточное количество Cas9 в UCAR-T-клетках, содержащих антитело против В7Н3 и описанных в настоящей заявке;

На фиг. 13 показаны результаты секвенирования по Сэнгеру гена TRAC после редактирования Sg9-РНК как описано в настоящей заявке;

На фиг. 14 показаны результаты анализа клонирования TA гена TRAC после редактирования Sg9-РНК как описано в настоящей заявке;

На фиг. 15 показаны результаты анализа методом проточной цитометрией гена TRAC после редактирования Sg9-РНК как описано в настоящей заявке;

На фиг. 16 показаны результаты секвенирования по Сэнгеру гена HLA-A02 после редактирования Sg2-РНК как описано в настоящей заявке;

На фиг. 17 показаны результаты секвенирования по Сэнгеру гена HLA-A02 после редактирования Sg5-РНК как описано в настоящей заявке;

На фиг. 18 показаны результаты секвенирования по Сэнгеру гена HLA-A11 после редактирования Sg21РНК как описано в настоящей заявке;

На фиг. 19 показаны результаты секвенирования по Сэнгеру гена HLA-A11 после редактирования Rsg2РНК как описано в настоящей заявке;

На фиг. 20А-20В показаны результаты одновременного нокаута HLA-A02 и TRAC в модифицированных иммунных эффекторных клетках согласно изобретению;

На фиг. 21А-21В показаны уровни белка HLA-A02 и TRAC в модифицированных иммунных эффекторных клетках согласно изобретению;

На фиг. 22 показаны уровни мРНК TRAC, HLA-A, B2М и СИТА в модифицированных иммунных эффекторных клетках согласно изобретению;

На фиг. 23А-23В показаны уровни белка B2М и СИТА в модифицированных иммунных эффекторных клетках согласно изобретению;

На фиг. 24А-24D показаны уровни белков TRAC, HLA-A, B2М и СИТА в

модифицированных иммунных эффекторных клетках согласно изобретению;

На фиг. 25А-25В показан нокаут TRAC и HLA-A на уровнях мРНК в модифицированных иммунных эффекторных клетках согласно изобретению;

На фиг. 26А-26В показаны уровни белка CD69 и CD137 в модифицированных иммунных эффекторных клетках согласно изобретению;

На фиг. 27 показано совместное культивирование модифицированных иммунных эффекторных клеток согласно изобретению и NK-клеток;

На фиг. 28 показан уровень экспрессии IFN- γ в модифицированных иммунных эффекторных клетках согласно изобретению;

На фиг. 29А-29D показаны уровни белков TRAC, HLA-A, B2M и СРТА в модифицированных иммунных эффекторных клетках согласно изобретению;

На фиг. 30 показана эффективность инфицирования модифицированных иммунных эффекторных клеток согласно изобретению в отношении CAR;

На фиг. 31 показана укладка амплификации модифицированных иммунных эффекторных клеток согласно изобретению;

На фиг. 32 показано уничтожение CD19-позитивных клеток-мишеней модифицированными иммунными эффекторными клетками согласно изобретению;

На фиг. 33 показана схема дозирования для введения модифицированных иммунных эффекторных клеток согласно изобретению; и

На фиг. 34 показано уничтожение опухолей у мышей под действием модифицированных иммунных эффекторных клеток согласно изобретению.

Подробное описание

Варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже со ссылкой на конкретные примеры, и другие преимущества и эффекты настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области исходя из приведенного здесь описания настоящей заявки.

Определения терминов

В настоящей заявке, термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» обычно относится к группе полипептидов, обычно двух типов в самом простом варианте осуществления изобретения, которые, если они присутствуют в иммунной эффекторной клетке, сообщают клетке специфичность к клетке-мишени (обычно к раковой клетке) и продуцируют внутриклеточный сигнал. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR содержит по меньшей мере один внеклеточный антигенсвязывающий домен (такой как VHH, scFv или его часть), трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый здесь «внутриклеточным сигнальным доменом»), который содержит функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, как определено ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения, группа полипептидов находится в одной и той же полипептидной цепи (например, содержит химерный слитый белок). В некоторых вариантах осуществления изобретения, группы полипептидов не являются смежными друг

с другом, например, они находятся в разных полипептидных цепях. В некоторых аспектах, группа полипептидов включает переключатель димеризации, который может связывать полипептиды друг с другом в присутствии молекулы димеризации, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В одном аспекте, стимулирующая молекула CAR представляет собой ζ -цепь, связанную с рецепторным комплексом Т-клеток. В одном аспекте, цитоплазматический сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен (например, первичный сигнальный домен CD3- ζ). В одном аспекте, цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, происходящих по меньшей мере из одной костимулирующей молекулы, как определено ниже. В одном аспекте, костимулирующая молекула может быть выбрана из 4-1BB (то есть, CD137), CD27, ICOS и/или CD28. В одном аспекте, CAR содержит химерный слитый белок, который может содержать внеклеточный домен распознавания антигена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте, CAR содержит химерный слитый белок, который может содержать внеклеточный домен распознавания антигена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте, CAR содержит химерный слитый белок, который может содержать внеклеточный домен распознавания антигена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, происходящий от одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте, CAR содержит химерный слитый белок, который может содержать внеклеточный домен распознавания антигена, трансмембранный домен, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, происходящих от одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте, CAR содержит, но необязательно, лидерную последовательность на аминоконце (N-конце) слитого белка CAR. В одном аспекте, CAR дополнительно содержит лидерную последовательность на N-конце внеклеточного домена распознавания антигена, где лидерная последовательность необязательно отщепляется от домена распознавания антигена (например, VHH) во время процессинга клетки и определяет локализацию CAR в клеточной мембране.

В настоящей заявке, термин «антитело», обычно употребляется в самом широком смысле и конкретно охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, полимеры, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают желаемой биологической активностью (Miller et al., (2003) *Jour. of Immunology* 170: 4854-4861). Антитело может представлять собой мышинное антитело, человеческое антитело, гуманизованное антитело

или химерное антитело или антитело, происходящее от других видов.

Полноразмерное антитело обычно относится к антителу, которое состоит из двух «тяжелых цепей полноразмерного антитела» и двух «легких цепей полноразмерного антитела». «Тяжелая цепь полноразмерного антитела» обычно относится к полипептиду, состоящему, от N-конца до C-конца, из переменного домена тяжелой цепи антитела (VH), константного домена 1 тяжелой цепи антитела (CH1), шарнирной области антитела (HR), константного домена 2 тяжелой цепи антитела (CH2) и константного домена 3 тяжелой цепи антитела (CH3), сокращенно обозначенных как VH-CH1-HR-CH2-CH3; и, в случае антител подкласса IgE, необязательно дополнительно содержащему константный домен 4 тяжелой цепи антитела (CH4). В некоторых вариантах осуществления изобретения, «тяжелая цепь полноразмерного антитела» представляет собой полипептид, состоящий, от N-конца до C-конца, из VH, CH1, HR, CH2 и CH3. «Легкая цепь полноразмерного антитела» обычно представляет собой полипептид, состоящий от N-конца до C-конца из переменного домена легкой цепи антитела (VL) и константного домена легкой цепи антитела (CL), сокращенно обозначаемых VL-CL. Константный домен легкой цепи антитела (CL) может представлять собой κ (каппа) или λ (лямбда). Две цепи полноразмерного антитела связаны между собой полипептидными дисульфидными связями, расположенными между доменом CL и доменом CH1, а также между шарнирными областями тяжелых цепей полноразмерных антител. Примерами типичных полноразмерных антител являются природные антитела, такие как IgG (например, IgG1 и IgG2), IgM, IgA, IgD и IgE.

В настоящей заявке, термин «антигенсвязывающий фрагмент» (также называемый здесь «нацеливающим фрагментом» или «антигенсвязывающим фрагментом») обычно относится к части молекулы антитела, которая содержит аминокислоты, ответственные за специфическое связывание между антителом и антигеном. Часть антигена, специфически распознаваемая и связываемая антителом, называется «эпитопом», описанным выше. Антигенсвязывающий домен обычно может содержать переменную область легкой цепи антитела (VL) и переменную область тяжелой цепи антитела (VH); однако, он не обязательно включает и то и другое. Например, фрагмент Fd имеет две области VH и обычно сохраняет некоторые антигенсвязывающие функции интактного антигенсвязывающего домена. Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают: (1) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, имеющий VL, VH, константную легкую цепь (CL) и домен CH1; (2) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, имеющий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (3) фрагмент Fd, имеющий два домена VH и CH1; (4) фрагмент Fv, имеющий домены VL и VH одной цепи антитела; (5) фрагмент dAb (см. публикацию Ward et al., «Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From Escherichia coli», *Nature* 341: 544-546 (1989), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), имеющий домен VH; (6) выделенную комплементарность-определяющую область (CDR); (7) одноцепочечный Fv (scFv), например, происходящий от библиотеки scFV. Хотя

два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, однако, их можно соединить друг с другом рекомбинантным методом с использованием синтетического линкера, который позволяет получить их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием одновалентных молекул (называемых одноцепочечным Fv (scFv)) (см., например, Huston et al., «Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in *Escherichia coli*», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988)); и (8) VHH, который относится к переменным антигенсвязывающим доменам антител тяжелой цепи антител, происходящих от животных семейства верблюдовых (верблюдов, одногорбых верблюдов, лам, альпак и т.п.) (см., Nguyen V.K. et al., 2000, *The EMBO Journal*, 19, 921-930; Muyldermans S., 2001, *J Biotechnol.*, 74, 277-302 и обзор Vanl and schoot P. et al., 2011, *Antiviral Research* 92, 389-407). VHH также может называться наноантителом (Nb) и/или однодоменным антителом. Эти фрагменты антитела получают с применением обычных методов, известных специалистам в данной области, и оценивают их функцию таким же способом, как и для интактных антител. Антигенсвязывающий фрагмент, нацеленный на IL13R α 2, также описан в публикациях Международных патентных заявок WO2014072888A1 и WO2021041725A1, каждая из которых в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

В настоящей заявке, термин «однодоменное антитело» или «VHH» обычно относится к классу антител, у которых отсутствует легкая цепь антитела, и которые имеют только переменную область тяжелой цепи. В некоторых случаях, однодоменное антитело может быть получено от двугорбых верблюдов, дромадеров, альпак, лам, акул-нянек, обыкновенных кунных акул или ромбовых скатов (см., например, Kang Xiaozhen et al., *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(12): 1974-1984). Например, однодоменное антитело может быть получено от альпак. Однодоменное антитело может состоять из переменной области тяжелой цепи (VH). Термин «переменная область тяжелой цепи» обычно относится к аминоконцевому домену тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента. Переменная область тяжелой цепи может быть дополнительно подразделена на гиперпеременные области, называемые комплементарность-определяющими областями (CDR), которые подразделены на еще более консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая переменная область тяжелой цепи может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Переменная область тяжелой цепи содержит связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

В настоящей заявке, термин «комплементарность-определяющая область» (CDR), обычно относится к комплементарность-определяющей области внутри переменной области антигенсвязывающего фрагмента. В настоящей заявке, в переменной области тяжелой цепи присутствуют 3 CDR, и эти CDR обозначены HCDR1, HCDR2 и HCDR3 для каждой переменной области. Точные границы этих CDR определяются по-разному в

разных системах. Система, описанная Кэбатом (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)), обеспечивает не только четкую систему нумерации остатков, применимую к любой вариабельной области антигенсвязывающий фрагмент, но также и точные границы остатков, определяющие 3 CDR. Эти CDR могут называться CDR по Кэбату. Чотия и сотрудники (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987) и Chothia et al., Nature 342: 877-883 (1989)) обнаружили, что, хотя существует большое разнообразие на уровне аминокислотной последовательности, однако, определенные субчасти CDR по Кэбату обычно имеют почти идентичные конформации пептидного остова. Эти субчасти были обозначены L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где «L» и «H» относятся к областям легкой и тяжелой цепи, соответственно. Эти области могут называться CDR по Чотию, границы которых совпадают с CDR по Кэбату. Другие границы, определяющие CDR, которые перекрываются с CDR по Кэбату, были описаны Padlan (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) и MacCallum (J Mol Biol 262 (5): 732-45 (1996)). Кроме того, другие определения границ CDR могут не точно следовать одной из вышеперечисленных систем, но, тем не менее, они будут перекрываться с CDR по Кэбату, хотя они могут быть сокращены или удлинены в соответствии с предсказанными или экспериментальными данными о том, что конкретный остаток или определенная группа остатков или даже целые CDR не оказывают существенного влияния на связывание антигена. В настоящей заявке используется схема нумерации IMGT.

В настоящей заявке, термин «FR» обычно относится к более высококонсервативным частям вариабельных доменов антитела, которые называются каркасными областями. Например, каждый из вариабельных доменов природных тяжелых и легких цепей может содержать четыре области FR, а именно, четыре в VH (H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4) и четыре в VL (L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4). «Каркасная область» обычно относится к части вариабельной области антитела, которая известна специалистам в данной области, и которая присутствует между более дивергентными (то есть, гипервариабельными) CDR. Такие каркасные области обычно называются каркасными областями 1-4 (FR1, FR2, FR3 и FR4) и обеспечивают остов для презентации шести CDR (трех из тяжелой цепи и трех из легкой цепи) в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности.

В настоящей заявке, термин «гомология» обычно может быть эквивалентен термину «идентичность» последовательностей. Гомологичная последовательность может включать аминокислотную последовательность, которая может быть по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или на 99,9% идентична рассматриваемой последовательности. Обычно, гомолог может содержать такой же активный сайт и т.п., как и рассматриваемая аминокислотная последовательность. Гомологию можно рассматривать с точки зрения сходства (то есть, это означает, что аминокислотные остатки имеют сходные химические свойства/функции) или с точки зрения идентичности последовательностей. В настоящей заявке, ссылка на

последовательность, имеющую процент идентичности с любой из SEQ ID NO аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, относится к последовательности, имеющей процент идентичности по всей длине указанной SEQ ID NO. Для определения идентичности последовательностей может быть проведено выравнивание последовательностей различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием программного обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN, NEEDLE или Megalign (DNASTAR) и т.п. Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения оптимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

В настоящей заявке, термин «специфическое связывание», относящийся к взаимодействию связывающей молекулы (например, антитела) с ее партнером по связыванию (например, антигеном), обычно означает, что взаимодействие зависит от присутствия специфической структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на партнере по связыванию. Другими словами, антитело будет преимущественно связываться с партнером по связыванию или распознавать его, даже если партнер по связыванию присутствует в смеси других молекул или организмов. Связывание может быть опосредовано ковалентными или нековалентными взаимодействиями или их комбинацией. Другими словами, термин «специфическое связывание» обычно относится к иммуноспецифическому связыванию с антигенной детерминантой или эпитопом и неиммуноспецифическому связыванию с другими антигенными детерминантами или эпитопами. Связывающая молекула, которая иммуноспецифично связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами с относительно низкой аффинностью, что может быть определено, например, с помощью радиоиммунного анализа (РИА), твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), BIACORE или с помощью других анализов, известных специалистам в данной области. Связывающая молекула или ее фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с антигеном, могут перекрестно реагировать с родственным антигеном с тем же эпитопом. В некоторых случаях, связывающая молекула или ее фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с антигеном, не вступает в перекрестную реакцию с другими антигенами.

В настоящей заявке, термин «*KD*» используется как синоним «*KD*» и обычно относится к константе равновесной диссоциации, и выражается в М (моль/л) конкретного взаимодействия антитело-антиген. *KD* можно вычислить по концентрации вещества АВ и концентрации вещества А и вещества В, образующихся в результате диссоциации: $KD = c(A) \times c(B) / c(AB)$. Из этого уравнения видно, что больший *KD* указывает на большую диссоциацию и меньшую аффинность между веществами А и В; и наоборот, меньший *KD* указывает на меньшую диссоциацию и более высокую аффинность между веществами А и В.

В настоящей заявке, термин «выделенная молекула нуклеиновой кислоты» обычно относится к выделенной форме нуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов или

рибонуклеотидов или их аналогов любой длины, выделенных из их природного окружения или искусственно синтезированных.

В настоящей заявке, термин «вектор» обычно относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к саморепликации в подходящем хозяине, которая переносит встроенную молекулу нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина и/или между клетками-хозяевами. Вектор может включать векторы, преимущественно предназначенные для встраивания ДНК или РНК в клетку; векторы, преимущественно предназначенные для репликации ДНК или РНК, и векторы, преимущественно предназначенные для экспрессии транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Вектор также включает векторы, имеющие множество вышеописанных функций. Вектор может представлять собой полинуклеотид, способный транскрибироваться и транслироваться в полипептид при введении в подходящую клетку-хозяина. Обычно, вектор может продуцировать желаемый продукт экспрессии посредством культивирования соответствующей клетки-хозяина, содержащей этот вектор.

В настоящей заявке, термин «вирусный вектор» используется в широком смысле для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты (например, плазмиды для переноса) или вирусной частицы, которая опосредует перенос нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты включает элементы нуклеиновой кислоты вирусного происхождения, которые обычно облегчают перенос или интеграцию молекул нуклеиновой кислоты в геном клетки. Вирусная частица обычно включает различные вирусные компоненты и иногда дополнительно включает компоненты клетки-хозяина в дополнение к нуклеиновым кислотам. Вирусный вектор может относиться к вирусу или к вирусной частице, способной переносить нуклеиновые кислоты в клетку, или к самой переносимой нуклеиновой кислоте.

В настоящей заявке, термин «лентивирус» обычно относится к группе (или к роду) сложных ретровирусов. Типичные лентивирусы включают, но не ограничиваются ими: вирус иммунодефицита человека (ВИЧ; включая ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2); вирус висны-маеди (VMV); вирус артрита-энцефалита коз (CAEV); вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV); вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). В одном варианте осуществления изобретения, предпочтительным является остов вектора на основе ВИЧ (то есть, цис-действующий элемент последовательности ВИЧ). В конкретных вариантах осуществления изобретения, лентивирус используют для доставки полинуклеотида, содержащего CAR, в клетку.

В настоящей заявке, термин «клетка-хозяин» или «клетка» обычно относится к отдельной клетке, клеточной линии или клеточной культуре, которая может содержать или содержит вектор, включающий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящей заявке, или которая способна экспрессировать выделенный антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке. Клетка-хозяин может содержать потомство одной клетки-хозяина. Из-за природных, случайных или специально

вносимых мутаций, клетки-потомки не обязательно могут быть идентичны по морфологии или геному исходной родительской клетке, но при этом, могут экспрессировать выделенный антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящей заявке. Клетка-хозяин может быть получена путем трансфекции клеток описанным здесь вектором *in vitro*. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку (например, *E. coli*) или эукариотическую клетку (например, дрожжевую клетку, клетку COS, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку HeLa, клетку HEK293, клетку COS-1, клетку NS0 или клетку миеломы). Например, клеткой-хозяином может быть клетка *E. coli*. Например, клеткой-хозяином может быть дрожжевая клетка. Например, клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего. Например, клетка млекопитающего может представлять собой клетку CHO-K1.

В настоящей заявке, термин «Т-клетка» или «Т-лимфоцит» может означать любую Т-клетку, такую как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка, или Т-клетка из культивируемой линии Т-клеток, или Т-клетка, полученная от млекопитающего (предпочтительно приматов некоторых видов, включая обезьян, собакоподобных обезьян или человека). Если Т-клетки берут у млекопитающего, то их можно получить из ряда источников, включая, но не ограничиваясь ими, кровь, костный мозг, лимфатические узлы, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетка также может быть обогащена или очищена. Т-клетку можно получить путем созревания гемопоэтической стволовой клетки в Т-клетку *in vitro* или *in vivo*. В репрезентативных аспектах, Т-клетка представляет собой Т-клетку человека. В иллюстративных аспектах, Т-клетка представляет собой Т-клетку, выделенную у человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку любого типа, включая НКТ-клетки, и может находиться на любой стадии развития, включая, но не ограничиваясь ими, Т-клетки, позитивные по CD4/CD8; хелперные CD4⁺-Т-клетки; например, клетки Th1 и Th2, CD8⁺-Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки); мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК); лейкоциты периферической крови (ЛПК); опухолевые инфильтрирующие клетки (TIL); Т-клетки памяти; необработанные Т-клетки и т.п. Предпочтительно, Т-клетка представляет собой CD8⁺-Т-клетку или CD4⁺-Т-клетку. В некоторых альтернативных вариантах, Т-клетка является аллогенной (происходит от разных доноров одного и того же вида) для реципиента, который получает клетку или клетку, которая должна быть ему введена (например, клетки, которые находятся в форме терапевтической композиции); в некоторых альтернативных вариантах осуществления изобретения, Т-клетка является аутологичной (то есть, одной и той же для донора и реципиента); а в некоторых альтернативных вариантах осуществления изобретения, Т-клетка является сингенной (в этом случае донор и реципиент отличаются друг от друга, но являются гомозиготными близнецами).

В настоящей заявке, термин «иммунная эффекторная клетка» обычно относится к иммунной клетке, участвующей в иммунном ответе и выполняющей эффекторную функцию. Например, выполнение эффекторной функции может включать удаление чужеродных антигенов, стимуляцию иммунного эффекторного ответа и т.п. Иммунная

эффекторная клетка может включать плазматические клетки, Т-клетки, В-клетки, природные клетки-киллеры (NK), природные Т-клетки-киллеры (NKT), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения.

Иммунная эффекторная клетка согласно изобретению может быть аутологичной/аутогенной («собственной») или неаутологичной («чужой», например, аллогенной, сингенной или ксеногенной). В настоящей заявке, термин «аутологичный» обычно относится к клеткам одного и того же индивидуума. Термин «аллогенный» обычно означает, что клетки принадлежат к тому же виду, что и клетки, с которыми их сравнивают, но генетически отличаются от них. Термин «сингенный» обычно означает, что клетки происходят от разных индивидуумов, но генетически идентичны клеткам, с которыми их сравнивают. Термин «ксеногенный» обычно означает, что клетки относятся к разным видам, то есть, отличаются от клетки, с которой их сравнивают. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки согласно изобретению являются аутологичными или аллогенными.

В настоящей заявке, термин «модификация» обычно относится к изменению состояния или структуры клетки и/или к модификации состояния или структуры клетки. Изменение обычно обнаруживают при сравнении состояния или структуры соответствующей немодифицированной клетки. Изменение может включать изменение уровня или функции экспрессии эндогенного гена, например, снижение, повышение или отсутствие уровня экспрессии эндогенного гена в клетке с помощью средств генной инженерии, которые могут включать гомологичную рекомбинацию, редактирование генов с использованием системы CRISPR/Cas9 и т.п.; изменение может также включать изменение экспрессии, структуры или функции клеточного белка, например, изменение экспрессии, структуры или функции соответствующего белка, достигаемое посредством модификации уровня экспрессии или функции эндогенного гена, такой как изменение экспрессии, структуры или функции белка, достигаемое путем регуляции трансляции белка и посттрансляционной модификации; и изменение может также включать введение чужеродных генов, экспрессию чужеродных белков и т.п.

В настоящей заявке, термин «TRAC» обычно относится к константной области α -цепи Т-клеточного рецептора (к константе альфа-цепи Т-клеточного рецептора). Т-клеточный рецептор (TCR) обычно относится к специфическому рецептору, расположенному на поверхности Т-клетки, который способен распознавать антигены, которые связываются с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). TCR обычно состоят из двух разных белковых цепей (то есть, гетеродимеров). У человека, TCR в большинстве Т-клеток состоят из одной α -цепи и одной β -цепи (кодируемых TRA и TRB, соответственно), и этот класс Т-клеток называется $\alpha\beta$ -Т-клетками; а в некоторых Т-клетках, TCR состоят из γ -цепи и δ -цепи (кодируемых TRG и TRD, соответственно), и этот класс Т-клеток называется $\gamma\delta$ -Т-клетками. Обычно, $\alpha\beta$ -Т-клетки составляют приблизительно 95% от общего числа Т-клеток, $\gamma\delta$ -Т-клетки составляют приблизительно 5% от общего числа Т-клеток, и эти соотношения варьируются в процессе онтогенеза и при патологических

состояниях (например, при лейкозе), а также различаются у различных видов. Каждая цепь, составляющая TCR, содержит переменную область и константную область. У человека, ген, кодирующий α -цепь (TRA, например, информация, показанная HGNC:12027), расположен на хромосоме 14 и состоит из множества фрагментов гена, включая переменный фрагмент (V), связывающий фрагмент (J) и константный фрагмент (C). Ген TRAC обычно относится к геновой последовательности, кодирующей константную область α -цепи рецептора Т-клеток (C) (например, информация показана как HGNC:12029), и расположен на хромосоме 14 (14q11.2; 14:22,547,505-22,552,131). Обычно, один из генов переменных фрагментов (V), кодирующих N-фрагмент домена распознавания антигена, подвергается реаранжировке под действием одного из связывающих фрагментов (J) с образованием функционального экзона V-области, который транскрибируется и связывается с константной областью (C) посредством сплайсинга, что тем самым приводит к образованию кодирующей последовательности α -цепи Т-клеточного рецептора.

В настоящей заявке, термин «антиген главного комплекса гистосовместимости» («МНС», также называемый «человеческим лейкоцитарным антигеном» («HLA») у человека) обычно относится к белку, экспрессируемому на поверхности клетки, который сообщает клетке уникальную антигенную идентичность. Антигены МНС/HLA представляют собой молекулы-мишени, которые распознаются Т-клетками и NK-клетками как происходящие от того же источника гемопоэтических стволовых клеток, что и иммунные эффекторные клетки («собственные»), или как происходящие от другого источника гемопоэтических репопулирующих клеток («чужеродные»). Специалисты выделяют два основных класса антигенов HLA: HLA класса I и HLA класса II. Антигены HLA класса I (A, B и C у человека) позволяют каждой клетке распознаваться как «собственная», тогда как антигены HLA класса II (DR, DP и DQ у человека) участвуют в реакциях между лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками. Оба этих антигена участвуют в отторжении трансплантированных органов. Важным аспектом системы генов HLA является ее полиморфизм. Каждый ген МНС класса I (A, B и C) и МНС класса II (DP, DQ и DR) присутствует в разных аллелях. Аллели HLA обозначаются цифрами и индексами. Например, два неродственных человека могут нести гены HLA-B класса I B5 и Bw41, соответственно. Аллельные продукты отличаются одной или несколькими аминокислотами α - и/или β -доменов. Ряд специфических антител или реагентов нуклеиновых кислот используют для типирования гаплотипов HLA индивидуумов с использованием лейкоцитов, которые экспрессируют молекулы класса I и класса II. Гены, обычно используемые для типирования HLA, представляют собой шесть белков МНС классов I и II, то есть, по два аллеля для каждого из HLA-A, HLA-B и HLA-DR. Гены HLA сгруппированы в «суперлокусе», присутствующем в положении бр21 хромосомы, где «суперлокус» кодирует 6 классических трансплантационных генов HLA и по меньшей мере 132 гена, кодирующих белки, которые также играют важную роль в регуляции иммунной системы, а также в некоторых других фундаментальных молекулярных и клеточных процессах. Полный локус имеет размер приблизительно 3,6 Mb и содержит по меньшей

мере 224 локуса. Одним из последствий такой кластеризации является то, что «гаплотип», то есть, группа аллелей, присутствующих на одной хромосоме, наследуется от одного родителя и имеет тенденцию наследоваться как группа. Группа аллелей, унаследованных от каждого родителя, образует гаплотип, в котором некоторые аллели имеют тенденцию ассоциироваться вместе. Идентификация гаплотипов пациента может помочь спрогнозировать вероятность нахождения подходящего донора и помочь сформулировать стратегию поиска, поскольку некоторые аллели и гаплотипы более распространены, чем другие, и они распределяются с разной частотой в разных расовых и этнических группах.

В настоящей заявке, «HLA-A» обычно относится к классу полипептидных цепей человеческого лейкоцитарного антигена, кодируемых геном HLA-A, расположенным на хромосоме человека 6p21.3 (например, информация представлена в HGNC:4931). HLA-A является одним из трех основных типов полипептидов, которые составляют молекулы МНС класса I на поверхности клеток человека, а другие также включают HLA-B и HLA-C. Гетеродимер, состоящий из α -цепи, кодируемой геном HLA-A, и β -цепи, кодируемой геном B2M (β 2-микроглобулин), представляет собой молекулу МНС I класса HLA-A. α -Цепь, кодируемая геном HLA-A, может содержать домен α 1, домен α 2, домен α 3, трансмембранную область и цитоплазматическую область, где домен α 1 и домен α 2 могут связываться с пептидным фрагментом таким образом, чтобы презентировать пептидный фрагмент иммунной клетке под действием молекулы МНС I (например, класса HLA-A). У человека, как и у большинства млекопитающих, α -цепь молекулы МНС I является полиморфной, и существует множество вариаций ее первичной структуры. По состоянию на декабрь 2013 года, всего известно 2432 аллеля HLA-A, которые кодируют 1740 активных белков и 117 неактивных белков. В настоящей заявке, аллели HLA-A могут включать информацию о последовательностях различных аллелей HLA-A, имеющуюся в базе данных IMGT/HLA версии 3.38.0 (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) и представленную Комитетом по номенклатуре факторов HLA ВОЗ.

В настоящей заявке, термин «HLA-B» обычно относится к части семейства генов комплексов антигенов лейкоцитов человека (HLA). HLA представляет собой человеческий вариант главного комплекса гистосовместимости (МНС), а МНС представляет собой семейство генов, присутствующее у многих видов. Эти комплексные гены подразделяются на три основные группы: класс I, класс II и класс III. У человека, ген HLA-B и два родственных гена HLA-A и HLA-C представляют собой основные гены МНС класса I. Ген HLA-B расположен в клеточной полосе 21.3 короткого (p) плеча хромосомы 6 от пар оснований 31353871 до 31357211. HLA-B представляет собой один из трех основных HLA, которые должны совпадать у донора и реципиента. Эти гены представляют собой HLA-A, HLA-B (оба относятся к классу МНС I) и HLA-DR (МНС класса II). Если две ткани имеют одинаковые гены, кодирующие три HLA, то вероятность и тяжесть отторжения сводятся к минимуму. Известны сотни вариантов (аллелей) HLA-B, и каждый вариант имеет определенный номер (например, HLA-B27). Близкородственные аллели сгруппированы вместе, например, по меньшей мере 28 очень похожих аллелей являются подтипами HLA-

B27. Эти подтипы обозначаются как HLA-B*2701 - HLA-B*2728.

В настоящей заявке, термин «совместимый по HLA» относится к паре донор-реципиент, в которой ни один из антигенов HLA не имеет несоответствия между донором и реципиентом, например, если донор предоставляет трансплантат гемопоэтических стволовых клеток реципиенту, нуждающемуся в трансплантационной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками. HLA-совместимые (то есть, в которых совпадают все 6 аллелей) пары донор-реципиент имеют меньший риск отторжения трансплантата, поскольку эндогенные Т-клетки и NK-клетки с меньшей вероятностью будут распознавать вводимый трансплантат как чужеродный и, следовательно, с меньшей вероятностью будут продуцировать иммунный ответ против трансплантата.

В настоящей заявке, термин «несовместимый по HLA» относится к паре донор-реципиент, в которой по меньшей мере один антиген HLA (особенно в отношении HLA-A, HLA-B и HLA-DR) не совпадает у донора и реципиента, например, у донора, предоставляющего трансплантат гемопоэтических стволовых клеток реципиенту, нуждающемуся в терапии по трансплантации гемопоэтическими стволовыми клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один гаплотип является совместимым, а другой нет. Пары донор-реципиент с несовпадением по HLA могут иметь повышенный риск отторжения трансплантата по сравнению с парами донор-реципиент, совпадающими по HLA, поскольку эндогенные Т-клетки и NK-клетки с большей вероятностью будут распознавать вводимый трансплантат как чужеродный в случае пары донор-реципиент с несовместимостью по HLA, и такие Т-клетки и NK-клетки, с большей вероятностью будут продуцировать иммунный ответ против трансплантата.

В настоящей заявке, термин «B2M» обычно относится к β 2-микроглобулину, который является одним из компонентов молекул МНС класса I. Микроглобулин β 2 (также называемый β -цепью) может образовывать молекулу МНС класса I с α -цепью, кодируемой HLA. B2M обычно экспрессируется во всех ядро-содержащих клетках. У человека, микроглобулин β 2 кодируется геном B2M, расположенным в положении 15q21.1 (например, информация представлена HGNC:914).

В настоящей заявке, термин «СИТА» обычно относится к трансактиватору главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II). Трансактиватор может представлять собой белок, имеющий кислотный домен активации транскрипции, 4 LRR (богатых лейцином повтора) и GTP-связывающий домен. Белок может располагаться в ядре клетки, действовать как позитивный регулятор транскрипции генов главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II) и может называться «главным фактором регуляции» экспрессии этих генов. Белок также может связываться с GTP и использовать связывание с GTP для транспорта в ядро клетки, где он обычно действует за счет активности ацетилтрансферазы (АТ) по принципу коактиватора. У человека, белок кодируется геном, расположенным в положении 16p13.13 (например, информация показана HGNC:7067), и можно получить несколько вариантов транскрипта, кодирующих различные изоформы.

В настоящей заявке, термин «клетка дикого типа» обычно относится к клетке,

которая встречается в природе или имеет природное происхождение.

В настоящей заявке, термин «нуклеиновая кислота», или «полинуклеотид», или «молекула нуклеиновой кислоты» обычно относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) и к их полимерам в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Если это не оговорено особо, то этот термин может включать нуклеиновые кислоты, содержащие аналоги природных нуклеотидов, которые обладают такими же связывающими свойствами, как и эталонная нуклеиновая кислота (например, с показанной информацией о последовательности), и метаболизируются аналогично встречающимся в природе нуклеотидам. Если это не оговорено особо, то последовательность нуклеиновой кислоты может включать ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также конкретно указанные последовательности.

В настоящей заявке, термин «экспрессия» обычно относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности.

В настоящей заявке, термин «генная мутация» обычно относится к изменению состава или порядка расположения пар оснований, происходящему в структуре генов, например, к точковой мутации, вызванной изменением одного основания или делецией, дупликацией, инсерцией и т.п. множества оснований.

В настоящей заявке, термин «сайленсинг генов» обычно относится к предотвращению экспрессии определенных генов с помощью регуляторных механизмов. Сайленсинг генов может главным образом включать сайленсинг двух типов: один из них представляет собой транскрипционный сайленсинг генов (TGS), вызываемый такими факторами, как метилирование ДНК, гетерохроматизация и эффект положения на уровне транскрипции, а другой представляет собой посттранскрипционный сайленсинг генов (PTGS), который влияет на экспрессию генов на посттранскрипционном уровне посредством специфического воздействия на РНК-мишень. Обычно, если ген подавляется, то экспрессия соответствующего гена также подавляется/снижается. Если ген нокаутирован, то он обычно не экспрессируется. Например, экспрессия определенного гена в клетке исчезает, когда все аллели конкретного гена нокаутированы. Сайленсинг генов обычно рассматривается как механизм нокдауна генов, и методы, обычно применяемые для сайленсинга генов, могут представлять собой, например, РНКи и т.п.

В настоящей заявке, термин «эндогенный» относится к любому веществу, полученному или продуцируемому внутри организма, клетки, ткани или системы.

В настоящей заявке, термин «экзогенный» относится к любому веществу, введенному в организм, клетку, ткань или систему или продуцированному вне организма, клетки, ткани или системы.

В настоящей заявке, термин «антисмысловая РНК» обычно относится к одноцепочечной РНК, комплементарной мРНК транскрипта (информационной РНК). Антисмысловая РНК может ингибировать экспрессию генов посредством связывания с

мРНК. Например, связывание антисмысловой РНК с мРНК-мишенью приводит к повышению чувствительности молекулы двухцепочечной РНК к ферменту РНК III и вызывает разложение молекулы двухцепочечной РНК. Например, антисмысловая РНК связывается с расположенной выше некодирующей областью мРНК, и тем самым напрямую ингибирует трансляцию мРНК-мишени.

В настоящей заявке, термин «киРНК» обычно относится к аббревиатуре малой интерферирующей РНК или короткой интерферирующей РНК. киРНК относится к классу двухцепочечных некодирующих молекул РНК, длина которых составляет приблизительно 18-28 пар оснований, и может вызывать разложение мРНК за счет комплементарного связывания с мРНК, что тем самым будет препятствовать экспрессии конкретного гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, киРНК может представлять собой продукт, полученный путем обработки длинной двухцепочечной РНК или кшРНК ферментом Dicer. В некоторых вариантах осуществления изобретения, киРНК проникает в клетку с образованием РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC) с другими белками, после чего смысловая цепь разрушается, а антисмысловая цепь может связываться с комплементарной нацеливающей последовательностью, что тем самым приводит к сайленсингу гена.

В настоящей заявке, термин «кшРНК» обычно относится к аббревиатуре короткой шпилечной РНК, то есть, означает «короткую шпилечную РНК». кшРНК обычно состоит из двух коротких инвертированных повторов, разделенных последовательностью «стебель-петля», образующей структуру «шпильки». Обычно, кшРНК может дополнительно содержать 5-6 оснований Т в качестве терминаторов транскрипции для РНК-полимеразы III. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кшРНК может проникать в клетку посредством вирусного вектора или плазмиды и транскрибироваться под действием полимеразы II или полимеразы III. Транскрипты экспортируются из клеточного ядра (обычно посредством экспортина 5), а затем транспортируются в RISC после обработки ферментом Dicer. Смысловая цепь разрушается, а антисмысловая цепь может связываться с комплементарной нацеливающей последовательностью, что тем самым приводит к сайленсингу гена.

В настоящей заявке, термин «система CRISPR/Cas» обычно относится к группе молекул, включающей РНК-ориентированную нуклеазу или другие эффекторные молекулы и молекулу рРНК, и эти молекулы способны направлять и осуществлять модификацию нуклеиновой кислоты посредством РНК-ориентированной нуклеазы или других эффекторных молекул в последовательности-мишени, например, они могут вызывать расщепление последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, система CRISPR содержит рРНК и белок Cas, например, белок Cas9. Система, содержащая Cas9 или его функциональный мутант, называется здесь «системой Cas9» или «системой CRISPR/Cas9». В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула рРНК и молекула Cas могут образовывать комплекс, а именно, рибонуклеопротеиновый комплекс (RNP).

В настоящей заявке, термины «молекула рРНК», «руководящая РНК», «корректирующая РНК», «прямая РНК», «молекула руководящей РНК» и «рРНК» могут использоваться как синонимы и обычно относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, способной облегчать специфическое нацеливание РНК-ориентированной нуклеазы или других эффекторных молекул (обычно в комплексе с молекулой рРНК) на последовательность-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такое нацеливание достигается посредством гибридизации части рРНК с ДНК (например, посредством направляющего домена рРНК) и связывания части молекулы рРНК с РНК-ориентированной нуклеазой или с другими эффекторными молекулами (например, по меньшей мере посредством *tracr*-рРНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула рРНК состоит из одной непрерывной полинуклеотидной молекулы, называемой здесь «одноцепочечной руководящей РНК», «оцрРНК» или т.п. В других вариантах осуществления изобретения, молекула рРНК состоит из множества (например, двух) полинуклеотидных молекул, которые сами по себе способны к ассоциации (обычно посредством гибридизации), и называются здесь «двухцепочечной руководящей РНК», «дцрРНК» или т.п.

В настоящей заявке, термин «белок Cas» обычно относится к ферменту, ответственному за расщепление ДНК в системе CRISPR/Cas. Этот фермент может включать ферменты систем CRISPR/Cas типов I, II и III, например, Cas3, Cas9 и Cas10.

В настоящей заявке, термин «белок Cas9» обычно относится к ферменту, ответственному за расщепление ДНК, которое происходит из бактериальной системы CRISPR/Cas типа II. Cas9 может включать белки дикого типа и их функциональные мутанты.

В настоящей заявке, «аллель» обычно относится к форме последовательности гена в локусе, которая может иметь различные варианты. Локус также называют сайтом или участком гена, и этот локус относится к фиксированному положению на хромосоме, например, где расположен ген. Расположение локуса в геноме называется генетической картой.

В настоящей заявке, термин «гомозигота» обычно относится к генотипу индивидуума, у которого два аллеля гомологичных хромосом идентичны в одном и том же локусе. Пары противоположных генов могут присутствовать у индивидуумов с двумя генотипами AA и aa.

В настоящей заявке, термин «гетерозигота» обычно относится к генотипу индивидуума, у которого два аллеля в одном и том же сайте на гомологичных хромосомах диплоида не являются идентичными, например, Aa. Гетерозиготные генотипы обычно более адаптивны, чем гомозиготные доминантные или гомозиготные рецессивные генотипы, и такой феномен называется преимуществом гетерозигот.

В настоящей заявке, термины «опухоль» и «рак» используются как синонимы и обычно относятся к заболеванию, характеризующемуся быстрым и неконтролируемым ростом аномальных клеток. Раковые клетки могут распространяться в другие части тела

локально или через кровоток и лимфатическую систему. Примеры различных видов рака описаны в настоящей заявке, и включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, рак прямой и ободочной кишки, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких и т.п. Термин «рак» или «опухоль» включает предраковые и злокачественные раковые заболевания и опухоли, а также охватывает солидные и несоллидные опухоли.

В настоящей заявке, термин «фармацевтически приемлемый» обычно относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые соизмеримы с разумным соотношением польза/риск и могут быть использованы исходя из оценки специалистов-медиков для их применения в целях контактирования с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других патологий или осложнений.

В настоящей заявке, термин «фармацевтически приемлемый носитель» обычно относится к любому из традиционно используемых носителей и ограничивается только физическими или химическими факторами (такими как растворимость и отсутствие способности реагировать с активными связывающими агентами) и способом введения. Фармацевтически приемлемый носитель, такой как наполнитель, адъювант, эксципиент и разбавитель, описанные в настоящей заявке, хорошо известен специалистам в данной области и легко доступен для приобретения. В одном аспекте изобретения, фармацевтически приемлемый носитель представляет собой носитель, который является химически инертным по отношению к активному ингредиенту фармацевтической композиции, и который не дает неблагоприятных побочных или токсических эффектов в условиях применения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, носитель не вызывает побочных, аллергических или других нежелательных реакций при введении животному или человеку. В некоторых аспектах, фармацевтическая композиция не содержит пирогенов и других примесей, которые могут представлять опасность для человека или животных. Фармацевтически приемлемый носитель включает любые растворители, дисперсионные среды, пвещества для нанесения окрытий, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т.п.; и применение такого фармацевтически приемлемого носителя хорошо известно специалистам в данной области.

Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов и предпочтительно инертны в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат или другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; полипептиды с низкой молекулярной массой; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулин; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрин; хелатообразующие агенты, такие как

EDTA; спирты ряда сахаров, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Твин, Pluronic или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В настоящей заявке, термин «эффективное количество» или «эффективная доза» обычно относится к количеству, достаточному для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. «Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического агента обычно представляет собой любое количество лекарственного средства, которое способствует снижению тяжести заболевания (о чем свидетельствует снижению тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомной фазы заболевания или предупреждение повреждения или инвалидности вследствие развития заболевания) при его применении отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством.

«Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» CAR-T-клеток, содержащих антитело против В7Н3, также представляет собой количество или дозу, которые оказывают терапевтически полезный эффект по сравнению с любыми токсическими или нежелательными эффектами, такими как CRS, для CAR-T-клеток, содержащих антитело против В7Н3. Термин «терапевтически эффективное количество» включает количество, эффективное для «лечения» индивидуума (например, пациента). В одном варианте осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза представляет собой минимальную эффективную дозу (MED) CAR-T-клетки, содержащей антитело против В7Н3 для лечения множественной миеломы у индивидуума. В одном варианте осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза представляет собой максимально переносимую дозу (MTD) CAR-T-клетки, содержащей антитело против В7Н3, которая не вызывает у пациента нежелательных CRS.

В настоящей заявке, термин «содержать» или «содержащий» обычно означает включение, систематизацию, содержание или охватывание. В некоторых случаях, этот термин также означает «представляющий собой» или «состоящий из...».

В настоящей заявке, термин «приблизительно» обычно означает изменение на 0,5%-10% выше или ниже указанного значения, например, изменение на 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5% или на 10% выше или ниже указанного значения.

В настоящей заявке, термин «индивидуум» обычно относится к человеку или к животному, не являющемуся человеком, включая, но не ограничиваясь ими, кошек, собак, лошадей, свиней, коров, овец, кроликов, мышей, крыс, обезьян и т.п.

Подробное описание изобретения

Антигенсвязывающий полипептид

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду, содержащему по меньшей мере одну комплементарность-определяющую область (CDR) вариабельной области тяжелой цепи антитела (VH), где VH содержит

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий полипептид содержит VH, где VH содержит комплементарность-определяющую область 1 тяжелой цепи (HCDR1), комплементарность-определяющую область 2 тяжелой цепи (HCDR2), комплементарность-определяющую область 3 тяжелой цепи (HCDR3), и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. Например, HCDR3 может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. Например, HCDR3 может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4. Например, HCDR2 может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%,

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и HCDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит:

i) HCDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и HCDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; или

ii) HCDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, HCDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и HCDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит каркасную область 1 тяжелой цепи (HFR1), каркасную область 2 тяжелой цепи (HFR2), каркасную область 3 тяжелой цепи (HFR3) и каркасную область 4 тяжелой цепи (HFR4), где HFR1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. Например, HFR1 может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HFR1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14. Например, HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15. Например, HFR2 может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на

в SEQ ID NO: 19, и HFR4, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

ii) HFR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, HFR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, HFR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и HFR4, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24;

iii) HFR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, HFR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, HFR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и HFR4, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; и

vi) HFR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, HFR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, HFR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и HFR4, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25. Например, VH может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29. Например, VH может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий полипептид включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело включает моноклональное антитело, поликлональное антитело, димер, полимер, мультиспецифическое антитело, интактное антитело, фрагмент антитела, человеческое антитело, гуманизованное антитело или химерное антитело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий фрагмент включает Fab-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv) или

однодоменное антитело (VHH).

Химерный антигенный рецептор

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), нацеленному на B7H3 и содержащему нацеливающую группу, где нацеливающая группа содержит вышеупомянутый антигенсвязывающий полипептид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий фрагмент включает VHH.

Например, нацеливающий фрагмент содержит VHH, где VHH может содержать: HCDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и HCDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

В качестве другого примера, нацеливающий фрагмент содержит VHH, где VHH может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит трансмембранный домен, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен, происходящий от одного или нескольких белков, выбранных из группы, состоящей из: CD8A, CD8B, CD28, CD3ε (CD3e), 4-1BB, CD4, CD27, CD7, PD-1, TRAC, TRBC, CD3ζ, CTLA-4, LAG-3, CD5, ICOS, OX40, NKG2D, 2B4 (CD244), FcεRIγ, BTLA, CD30, GITR, HVEM, DAP10, CD2, NKG2C, LIGHT, DAP12, CD40L (CD154), TIM1, CD226, DR3, CD45, CD80, CD86, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64 и SLAM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен, происходящий от CD8A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 42 - SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен, где внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD28, CD137, CD27, CD2, CD7, CD8A, CD8B, OX40, CD226, DR3, SLAM, CDS, ICAM-1, NKG2D, NKG2C, B7H3, 2B4, FcεRIγ, BTLA, GITR, HVEM, DAP10, DAP12, CD30, CD40, CD40L, TIM1, PD-1, LFA-1, LIGHT, JAML, CD244, CD100, ICOS, CD40 и MyD88.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен происходит от костимулирующего сигнального

домена 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в любой из последовательностей SEQ ID NO: 91 - SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен, где внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD3 ζ , CD3 δ , CD3 γ , CD3 ϵ , CD79a, CD79b, Fc ϵ RI γ , Fc ϵ RI β , Fc γ RIIa, вируса лейкоза крупного рогатого скота gp30, вируса Эпштейна-Барра (EBV) LMP2A, вируса иммунодефицита обезьян PBj14 Nef, DAP10, DAP-12, и домен, содержащий по меньшей мере один ITAM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен, происходящий от CD3 ζ .

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 124 - SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит шарнирную область между нацеливающим фрагментом и трансмембранным доменом, где шарнирная область содержит шарнирную область, происходящую от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD28, IgG1, IgG4, IgD, 4-1BB, CD4, CD27, CD7, CD8A, PD-1, ICOS, OX40, NKG2D, NKG2C, Fc ϵ RI γ , BTLA, GITR, DAP10, TIM1, SLAM, CD30 и LIGHT.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирная область содержит шарнирную область, происходящую от CD8A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 135 - SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ненацеливающая часть химерного антигенного рецептора содержит шарнирную область, трансмембранный домен, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ненацеливающая часть химерного антигенного рецептора содержит трансмембранный домен молекулы CD8A, шарнирную область CD8A, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB и внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ .

Например, химерный антигенный рецептор использует однодоменное антитело против B7H3 в качестве внеклеточного антигенсвязывающего домена, связанного с внутриклеточным сигнальным доменом посредством шарнирной области, и трансмембранный домен молекулы CD8A, где внутриклеточный сигнальный домен состоит из внутриклеточного костимулирующего сигнального домена 4-1BB и внутриклеточного сигнального домена CD3 ζ .

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ненацеливающая часть химерного антигенного рецептора содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор дополнительно содержит фрагмент сигнального пептида, где С-конец фрагмента сигнального пептида связан с N-концом нацеливающего фрагмента. Например, химерный антигенный рецептор может включать CAR, содержащий сигнальный пептид, VHH антитела против B7H3, шарнирный домен CD8A, трансмембранный домен CD8A, костимулирующий домен 4-1BB и первичный сигнальный домен CD3 ζ .

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент сигнального пептида включает фрагмент сигнального пептида CD8A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент сигнального пептида химерного антигенного рецептора содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31.

Молекула нуклеиновой кислоты, вектор и клетка

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к одной или нескольким выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим вышеупомянутый антигенсвязывающий полипептид или вышеупомянутый химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему вышеупомянутую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой экспрессионный вектор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор выбран из ДНК-вектора, РНК-вектора, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора и ретровирусного вектора. Например, вектор может представлять собой лентивирусный вектор.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к клетке i) содержащей вышеупомянутую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вышеупомянутый вектор; и/или ii) экспрессирующей вышеупомянутый антигенсвязывающий полипептид или химерный антигенный рецептор.

Иммунная эффекторная клетка

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к иммунной эффекторной клетке, содержащей вышеупомянутую молекулу нуклеиновой кислоты или вышеупомянутый вектор и/или экспрессирующей вышеупомянутый CAR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает человеческую клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (НК-клетку), макрофаг, НКТ-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови. Например, иммунная эффекторная клетка может представлять собой Т-клетку. В качестве другого примера, иммунная эффекторная клетка может представлять собой Т-клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает аутологичную или неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает модифицированную иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированная иммунная эффекторная клетка включает клетку, которая уменьшает иммунное отторжение, вызванное аллогенной клеточной терапией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, функции Т-клеточного антигенного рецептора (TCR) и главных комплексов гистосовместимости (МНСI, МНСII)

в модифицированной иммунной эффекторной клетке ингибируются в Т-клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает снижение экспрессии и/или активности одного или нескольких генов, ассоциированных с иммунным отторжением.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген, ассоциированный с иммунным отторжением, выбран из одной или нескольких из нижеследующих групп: TRAC, TRBC, HLA-A, HLA-B, B2M и СИТА.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген, ассоциированный с иммунным отторжением, выбран из одной или нескольких из нижеследующих групп: TRAC, TRBC, HLA-A и HLA-B.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген, ассоциированный с иммунным отторжением, выбран из одной или нескольких из нижеследующих групп: TRAC, TRBC и HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген, ассоциированный с иммунным отторжением, выбран из одной или нескольких из нижеследующих групп: TRAC и HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в модифицированной иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена СИТА в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена B2M в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в модифицированной иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена B2M в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена СИТА в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, снижение уровня экспрессии и/или активности гена включает снижение экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или подавление экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает: нокаут гена, мутацию гена и/или сайленсинг гена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут любого из двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной эффекторной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут экзона гена TRAC и нокаут экзона гена HLA-A в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку одного или нескольких веществ, выбранных из группы, состоящей из: антисмысловой РНК, киРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация дополнительно включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена TRAC, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 157 - SEQ ID NO: 171.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 172 - SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент Cas включает белок Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антисмысловая РНК содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%,

приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка представляет собой клетку, гомозиготную по HLA-B.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, гомозиготу HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B*54 и гомозиготу HLA-B*55.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка представляет собой клетку, гомозиготную или гетерозиготную по HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота или гетерозигота HLA-A включает гомозиготу HLA-A*02, гомозиготу HLA-A*11, гетерозиготу HLA-A*02/A*11 или гомозиготу HLA-A*24.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения иммунной эффекторной клетки, который включает введение вышеупомянутой молекулы нуклеиновой кислоты или вышеупомянутого вектора в иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает: модификацию иммунной эффекторной клетки до/после введения вышеупомянутой молекулы нуклеиновой кислоты или вышеупомянутого вектора в иммунную эффекторную клетку, где модификация включает снижение экспрессии и/или активности одного или более генов, ассоциированных с иммунным отторжением.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает: модификацию иммунной эффекторной клетки после введения вышеупомянутой молекулы нуклеиновой кислоты или вышеупомянутого вектора в иммунную эффекторную клетку, где модификация включает снижение экспрессии и/или активности одного или более генов, ассоциированных с иммунным отторжением.

Например, способ получения иммунной эффекторной клетки может включать:

(1) введение вышеупомянутой молекулы нуклеиновой кислоты или вышеупомянутого вектора в иммунную эффекторную клетку; и

(2) модификацию иммунной эффекторной клетки, где модификация включает снижение экспрессии и/или активности одного или более генов, ассоциированных с иммунным отторжением.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген, ассоциированный с иммунным отторжением, выбран из одной или нескольких из нижеследующих групп: TRAC, TRBC, HLA-A, HLA-B, B2M и CITA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в иммунной эффекторной клетке снижается по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующего гена в соответствующей

немодифицированной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена СПТА не снижается по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующего гена в соответствующей немодифицированной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена В2М не снижается по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующего гена в соответствующей немодифицированной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена СПТА не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена В2М не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, снижение уровня экспрессии и/или активности гена включает снижение экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или подавление экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает: нокаут гена, мутацию гена и/или сайленсинг гена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут любого из двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной эффекторной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает нокаут экзона гена TRAC и нокаут экзона гена HLA-A в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку одного или нескольких веществ, выбранных из группы, состоящей из: антисмысловой РНК, киРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена TRAC, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 157-SEQ ID NO: 171.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена

HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 172 - SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент Cas включает белок Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антисмысловая РНК содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 99,5% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает человеческую клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (НК-клетку), макрофаг, НКТ-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови. Например, иммунная эффекторная клетка может представлять собой Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает аутологичную или неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой клетку, гомозиготную по HLA-B.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, гомозиготу HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B*54 и гомозиготу HLA-B*55.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой клетку, гомозиготную или гетерозиготную по HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота или гетерозигота HLA-A включает гомозиготу HLA-A*02, гомозиготу HLA-A*11, гетерозиготу HLA-A*02/A*11 или гомозиготу HLA-A*24.

Например, способ получения иммунной эффекторной клетки может включать:

(1) сбор периферической крови у здоровых людей, проведение анализа на типирование HLA, отбор типов, отвечающих нужным требованиям, разделение МКПК, добавление магнитных шариков с CD3 в соответствии с нужным отношением для инкубирования и сортировка CD3⁺-Т-клеток; равномерное смешивание магнитных шариков, связанных с антителами против CD3/CD28; вычисление соответствующего количества суспензии магнитных шариков в соответствии с рассчитанным количеством; добавление суспензии магнитных шариков в систему культуры Т-клеток, активацию Т-клеток и культивирование в течение ночи;

(2) инфицирование Т-клеток титром вируса CAR против В7Н3;

(3) одновременный нокаут генов TRAC и HLA-A; и

(4) сортировка CD3-негативных Т-клеток: добавление магнитных шариков CD3 в соответствии с нужным количеством и сбор CD3-Т-клеток (клеток, не связанных с магнитными шариками).

Применение, фармацевтическая композиция и способ лечения

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутого химерного антигенного рецептора, вышеупомянутой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, вышеупомянутого вектора, вышеупомянутой клетки или вышеупомянутой иммунной эффекторной клетки для получения CAR-Т-клетки.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вышеупомянутый антигенсвязывающий полипептид, вышеупомянутый химерный антигенный рецептор, вышеупомянутую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, вышеупомянутый вектор, вышеупомянутую клетку и/или вышеупомянутую иммунную эффекторную клетку и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

Например, фармацевтическая композиция может включать: буферы, такие как нейтрально забуференный физиологический раствор, забуференный фосфатным физиологический раствор и т.п.; сахара, такие как глюкоза, манноза, сахароза, декстран или маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адьюванты, такие как гидроксид алюминия; и консерванты.

Например, фармацевтическая композиция содержит вышеупомянутую иммунную эффекторную клетку и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутого антигенсвязывающего полипептида, вышеупомянутого химерного антигенного рецептора, вышеупомянутой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, вышеупомянутого вектора, вышеупомянутой клетки, вышеупомянутой иммунной эффекторной клетки и/или вышеупомянутой фармацевтической композиции для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией В7Н3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство,

ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает заболевание или расстройство, ассоциированное с усилением экспрессии В7Н3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает рак.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак включает аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак прямой и ободочной кишки, лимфому, рак пищевода, глиому головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркому, меланому, рак желудка, рак тимуса или рак эндометрия.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутого антигенсвязывающего полипептида, вышеупомянутого химерного антигенного рецептора, вышеупомянутой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, вышеупомянутого вектора, вышеупомянутой клетки, вышеупомянутой иммунной эффекторной клетки и/или вышеупомянутой фармацевтической композиции в целях получения лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией В7Н3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает заболевание или расстройство, ассоциированное с усилением экспрессии В7Н3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает рак.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак включает аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак прямой и ободочной кишки, лимфому, рак пищевода, глиому головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркому, меланому, рак желудка, рак тимуса или рак эндометрия.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу профилактики или лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией В7Н3, где указанный способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества вышеупомянутого антигенсвязывающего полипептида, вышеупомянутого химерного антигенного рецептора, вышеупомянутой выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, вышеупомянутого вектора, вышеупомянутой клетки, вышеупомянутой иммунной эффекторной клетки и/или вышеупомянутой фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает заболевание или расстройство, ассоциированное с усилением экспрессии В7Н3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает рак.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак включает аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак прямой и ободочной кишки, лимфому, рак пищевода, глиому головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркому, меланому, рак желудка, рак тимуса или рак эндометрия.

Модифицированная иммунная эффекторная клетка

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к модифицированной иммунной эффекторной клетке, где экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A снижается, экспрессия и/или активность гена B2M не снижается, и экспрессия и/или активность гена СИТА не снижается по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующих генов в соответствующей немодифицированной клетке; и типирование HLA-B модифицированной иммунной эффекторной клетки соответствует типированию HLA-B у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированная иммунная эффекторная клетка является гетерозиготой HLA-B и соответствует двум аллелям HLA-B у индивидуума, или модифицированная иммунная эффекторная клетка является гомозиготой HLA-B и соответствует одному из аллелей HLA-B у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, гомозиготу HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B*54 и гомозиготу HLA-B*55.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация позволяет снижать экспрессию и/или активность двух генов, где эти два гена состоят из гена TRAC и гена HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A снижается, экспрессия и/или активность гена B2M не снижается, и экспрессия и/или активность гена СИТА не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность двух генов снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа, где два гена состоят из гена TRAC и гена HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, снижение уровня экспрессии и/или активности гена включает снижение экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или снижение экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает: мутацию гена и/или сайленсинг гена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает

введение в иммунную эффекторную клетку одного или нескольких веществ, выбранных из группы, состоящей из антисмысловой РНК, киРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 172-SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация дополнительно включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена TRAC, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 157-SEQ ID NO: 171.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент Cas включает белок Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антисмысловая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированная иммунная эффекторная клетка экспрессирует CAR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирную область, трансмембранный домен, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий домен специфически связывается с опухолевым антигеном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, CD33, BCMA, IL13Ra2, EGFR, Her2, GD2 и V7H3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из: моноклонального антитела, поликлонального антитела, димера, полимера, мультиспецифического антитела, интактного антитела, фрагмента антитела, человеческого антитела, гуманизованного антитела, химерного антитела, фрагмента Fv, F(ab')₂, одноцепочечного Fv(scFv) и однодоменного антитела (VHH).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен

содержит трансмембранный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD8A, CD8B, CD28, CD3ε (CD3e), 4-1BB, CD4, CD27, CD7, PD-1, TRAC, TRBC, CD3ζ, CTLA-4, LAG-3, CD5, ICOS, OX40, NKG2D, 2B4 (CD244), FcεRIγ, BTLA, CD30, GITR, HVEM, DAP10, CD2, NKG2C, LIGHT, DAP12, CD40L (CD154), TIM1, CD226, DR3, CD45, CD80, CD86, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64 и SLAM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD28, CD137, CD27, CD2, CD7, CD8A, CD8B, OX40, CD226, DR3, SLAM, CDS, ICAM-1, NKG2D, NKG2C, B7H3, 2B4, FcεRIγ, BTLA, GITR, HVEM, DAP10, DAP12, CD30, CD40, CD40L, TIM1, PD-1, LFA-1, LIGHT, JAML, CD244, CD100, ICOS, CD40 и MyD88.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD3ζ, CD3δ, CD3γ, CD3ε, CD79a, CD79b, FcεRIγ, FcεRIβ, FcγRIIIa, вируса лейкоза крупного рогатого скота gp30, вируса Эпштейна-Барра (EBV) LMP2A, вируса иммунодефицита обезьян PBj14 Nef, DAP10, DAP-12, и домен, содержащий по меньшей мере один ITAM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирная область содержит шарнирную область, происходящую от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD28, IgG1, IgG4, IgD, 4-1BB, CD4, CD27, CD7, CD8A, PD-1, ICOS, OX40, NKG2D, NKG2C, FcεRIγ, BTLA, GITR, DAP10, TIM1, SLAM, CD30 и LIGHT.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR дополнительно содержит фрагмент сигнального пептида, где С-конец фрагмента сигнального пептида связан с N-концом нацеливающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент сигнального пептида включает фрагмент сигнального пептида CD8A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает человеческую клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (НК-клетку), макрофаг, НКТ-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения вышеупомянутой модифицированной иммунной эффекторной клетки, включающему следующие стадии:

1) отбора иммунных эффекторных клеток, которые соответствуют типу HLA-B у индивидуум; и

2) снижения экспрессии и/или активности гена TRAC и гена HLA-A в иммунной эффекторной клетке, сохранения экспрессии и/или активности гена B2M и сохранения экспрессии и/или активности гена СИТА по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующих генов в соответствующей немодифицированной клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированная иммунная эффекторная клетка является гетерозиготой HLA-B и соответствует двум аллелям HLA-B у индивидуума, или модифицированная иммунная эффекторная клетка является гомозиготой HLA-B и соответствует одному из аллелей HLA-B индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, гомозиготу HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B*54 и гомозиготу HLA-B*55.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация позволяет снижать экспрессию и/или активность двух генов, где эти два гена состоят из гена TRAC и гена HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A снижается, экспрессия и/или активность гена B2M не снижается, и экспрессия и/или активность гена СИТА не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия и/или активность двух генов снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа, где два гена состоят из гена TRAC и гена HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, снижение уровня экспрессии и/или активности гена включает снижение экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или снижение экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает: мутацию гена и/или сайленсинг гена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку одного или нескольких веществ, выбранных из группы, состоящей из: антисмысловой РНК, кпРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена HLA-A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 172-SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрПНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, оцрПНК, нацеленная на экзонную часть гена TRAC, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 157-SEQ ID NO: 171.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент Cas включает белок Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антисмысловая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 213 - SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает человеческую клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (НК-клетку), макрофаг, НКТ-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунная эффекторная клетка включает неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей вышеупомянутую модифицированную иммунную эффекторную клетку и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутой модифицированной иммунной эффекторной клетки при получении CAR-T-клетки.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутых модифицированных иммунных эффекторных клеток в целях приготовления лекарственного средства для аллогенной терапии.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутых модифицированных иммунных эффекторных клеток в целях приготовления лекарственного средства для лечения опухоли.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль включает солидную опухоль и несолитарную опухоль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль выбрана из группы, состоящей из: рака печени, рака желудка, рака легких, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, В-лимфомы, лимфомы Ходжкина, глиомы, хронического миелогенного лейкоза и острого миелоидного лейкоза.

В настоящей заявке дополнительно раскрываются нижеследующие варианты

осуществления изобретения:

128. Модифицированная иммунная эффекторная клетка, где экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A снижается, экспрессия и/или активность гена B2M не снижается, и экспрессия и/или активность гена СИТА не снижается по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующих генов в соответствующей немодифицированной клетке; и типирование HLA-B модифицированной иммунной эффекторной клетки соответствует типированию HLA-B у индивидуума.

129. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п.128, где модифицированная иммунная эффекторная клетка является гетерозиготой HLA-B и соответствует двум аллелям HLA-B у индивидуума, или модифицированная иммунная эффекторная клетка является гомозиготой HLA-B и соответствует одному из аллелей HLA-B у индивидуума.

130. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п.129, где гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, гомозиготу HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B* 54 и гомозиготу HLA-B*55.

131. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-130, где модификация позволяет подавлять экспрессию и/или активность двух генов, где эти два гена состоят из гена TRAC и гена HLA-A.

132. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-131, где экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A снижается, экспрессия и/или активность гена B2M не снижается, и экспрессия и/или активность гена СИТА не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

133. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-132, где экспрессия и/или активность двух генов снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа, где два гена состоят из гена TRAC и гена HLA-A.

134. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-133, где снижение уровня экспрессии и/или активности гена включает снижение экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или снижение экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

135. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-134, где модификация включает: мутацию гена и/или сайленсинг гена.

136. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-135, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку одного или более веществ, выбранных из группы, состоящей из антисмысловой РНК, киРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

137. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-136, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

138. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п. 137, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена HLA-A.

139. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п. 138, где оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 172 - SEQ ID NO: 212.

140. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 137-139, где модификация дополнительно включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

141. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п. 140, где оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена TRAC, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 157 - SEQ ID NO: 171.

142. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 137-141, где модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

143. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п. 142, где фермент Cas содержит белок Cas9.

144. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п. 136, где антисмысловая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 213 - SEQ ID NO: 216.

145. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-144, где иммунная эффекторная клетка экспрессирует CAR.

146. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п. 145, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирную область, трансмембранный домен, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

147. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п. 146, где антигенсвязывающий домен специфически связывается с опухолевым антигеном.

148. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно п. 147, где опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, CD33, BCMA, IL13Ra2, EGFR, Her2, GD2 и B7H3.

149. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 146-148, где антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела, димера, полимера, мультиспецифического антитела, интактного антитела, фрагмента антитела, человеческого антитела, гуманизованного антитела, химерного антитела, фрагмента Fv, F(ab')₂, одноцепочечного Fv(scFv) и однодоменного антитела (VHH).

150. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 146-149, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD8A, CD8B, CD28, CD3e (CD3e), 4-1BB, CD4, CD27, CD7, PD-1, TRAC, TRBC, CD3ζ, CTLA-4, LAG-3, CD5, ICOS,

OX40, NKG2D, 2B4 (CD244), FcεRIγ, BTLA, CD30, GITR, HVEM, DAP10, CD2, NKG2C, LIGHT, DAP12, CD40L (CD154), TIM1, CD226, DR3, CD45, CD80, CD86, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64 и SLAM.

151. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 146-150, где внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD137, CD27, CD2, CD7, CD8A, CD8B, OX40, CD226, DR3, SLAM, CDS, ICAM-1, NKG2D, NKG2C, B7H3, 2B4, FcεRIγ, BTLA, GITR, HVEM, DAP10, DAP12, CD30, CD40, CD40L, TIM1, PD-1, LFA-1, LIGHT, JAML, CD244, CD100, ICOS, CD40 и MyD88.

152. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 146-151, где внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD3ζ, CD3δ, CD3γ, CD3ε, CD79a, CD79b, FcεRIγ, FcεRIβ, FcγRIIIa, вируса лейкоза крупного рогатого скота gp30, вируса Эпштейна-Барра (EBV) LMP2A, вируса иммунодефицита обезьян PBj14 Nef, DAP10, DAP-12, и домен, содержащий по меньшей мере один ITAM.

153. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 146-152, где шарнирная область содержит шарнирную область, происходящую от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD28, IgG1, IgG4, IgD, 4-1BB, CD4, CD27, CD7, CD8A, PD-1, ICOS, OX40, NKG2D, NKG2C, FcεRIγ, BTLA, GITR, DAP10, TIM1, SLAM, CD30 и LIGHT.

154. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 146-153, где CAR дополнительно содержит фрагмент сигнального пептида, а С-конец фрагмента сигнального пептида связан с N-концом нацеливающего фрагмента.

155. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 146-154, где фрагмент сигнального пептида содержит фрагмент сигнального пептида CD8A.

156. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-155, где иммунная эффекторная клетка содержит человеческую клетку.

157. Модифицированная иммунная эффекторная клетка согласно любому из пп. 128-156, где иммунная эффекторная клетка содержит Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (NK-клетку), макрофаг, NKT-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови.

158. Способ согласно любому из пп.128-157, где иммунная эффекторная клетка содержит неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

159. Способ получения модифицированной иммунной эффекторной клетки согласно любому из пп. 128-158, включающий следующие стадии:

1) отбора иммунных эффекторных клеток, которые соответствуют типу HLA-B у индивидуума; и

2) снижения экспрессии и/или активности гена TRAC и гена HLA-A в иммунной эффекторной клетке, сохранения экспрессии и/или активности гена B2M и сохранения

экспрессии и/или активности гена СИТА по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующих генов в соответствующей немодифицированной клетке.

160. Способ согласно п.159, где модифицированная иммунная эффекторная клетка является гетерозиготой HLA-B и соответствует двум аллелям HLA-B у индивидуума, или модифицированная иммунная эффекторная клетка является гомозиготой HLA-B и соответствует одному из аллелей HLA-B у индивидуума.

161. Способ согласно п.160, где гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, гомозиготу HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B*54 и гомозиготу HLA-B*55.

162. Способ согласно любому из пп.159-161, где модификация позволяет подавлять экспрессию и/или активность двух генов, где два гена состоят из гена TRAC и гена HLA-A.

163. Способ согласно любому из пп.159-162, где экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A снижается, экспрессия и/или активность гена B2M не снижается, и экспрессия и/или активность гена СИТА не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

164. Способ согласно любому из пп. 159-163, где экспрессия и/или активность двух генов снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа, где два гена состоят из гена TRAC и гена HLA-A.

165. Способ согласно любому из пп. 159-164, где подавление уровня экспрессии и/или активности гена включает подавление экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или подавление экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

166. Способ согласно любому из пп.159-165, где модификация включает: мутацию гена и/или сайленсинг гена.

167. Способ согласно любому из пп. 159-166, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку одного или более веществ, выбранных из группы, состоящей из: антисмысловой РНК, кРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

168. Способ согласно любому из пп.159-167, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

169. Способ согласно п. 168, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена HLA-A.

170. Способ согласно п. 169, где оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 172 - SEQ ID NO: 212.

171. Способ согласно любому из пп.168-171, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

172. Способ согласно п. 171, где оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена TRAC, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 157

- SEQ ID NO: 171.

173. Способ согласно любому из пп.168-172, где модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

174. Способ согласно п.173, где фермент Cas содержит белок Cas9.

175. Способ согласно п.167, где антисмысловая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 213 - SEQ ID NO: 216.

176. Способ согласно любому из пп. 159-175, где иммунная эффекторная клетка содержит человеческую клетку.

177. Способ согласно любому из пп. 159-176, где иммунная эффекторная клетка содержит Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (NK-клетку), макрофаг, NKT-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови.

178. Способ согласно любому из пп.159-177, где иммунная эффекторная клетка содержит неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

179. Композиция, содержащая модифицированную иммунную эффекторную клетку согласно любому из пп. 128-158 и фармацевтически приемлемый носитель.

180. Применение модифицированной иммунной эффекторной клетки согласно любому из пп. 128-158 при получении CAR-T-клетки.

181. Применение модифицированной иммунной эффекторной клетки согласно любому из пп. 128-158 при приготовлении лекарственного средства для аллогенной терапии.

182. Применение иммунной эффекторной клетки по любому из пп.128-158 при получении лекарственного средства для лечения опухоли.

183. Применение согласно п. 182, где опухоль включает солидную опухоль и несолидную опухоль.

184. Применение согласно любому из пп. 182-183, где опухоль выбрана из группы, состоящей из: рака печени, рака желудка, рака легких, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких, В-лимфом, лимфомы Ходжкина, глиомы, хронического миелогенного лейкоза и острого миелоидного лейкоза.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что нижеследующие примеры представлены только для иллюстрации химерного антигенного рецептора, иммунной эффекторной клетки, способа получения, применения и т.п. согласно изобретению и не должны рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1

1.1. Анализ на аффинность однодоменных антител

Рекомбинантный белок В7Н3-Fc иммобилизовали на чипе CM5 с помощью 10 мМ ацетатного буфера и способность каждого из вышеупомянутых однодоменных антител, полученных в результате скрининга, связываться с рекомбинантным белком В7Н3-Fc,

оценивали с использованием каждого из однодоменных антител в качестве подвижной фазы.

(1) Получение реагентов

Рабочий реагент, содержащий 10 мМ N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N-2-сульфоновой кислоты (HEPES), 150 мМ хлорида натрия (NaCl), 3 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) и 0,005% Твина-20, с рН, доведенным до 7,4.

Набор для захвата человеческого IgG (Fc), содержащий мышинное антитело против человеческого IgG (Fc), реагент для иммобилизации (ацетат натрия, рН 5,0) и реагент для регенерации (хлорид магния).

Набор для связывания аминов, включающий N-гидрохлорид сукцинимид (NHS), гидрохлорид 1-этил-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) и этаноламин (рН 8,5). В каждую пробирку с EDC и NHS добавляли по 10 мл деионизованной воды, затем смешанные растворы разделяли на аликвоты и хранили при температуре -18°C или ниже со сроком годности два месяца.

(2) Приготовление чипа

Мышиное антитело против человеческого IgG (Fc) разводили реагентом для иммобилизации (ацетатом натрия, рН 5,0): 950 мкл реагента для иммобилизации добавляли к 50 мкл мышинного антитела против человеческого IgG (Fc). Разведение использовали для иммобилизации в восьми каналах. Сначала, поверхность чипа CM5 активировали EDC и NHS в течение 360 сек. при скорости потока 10 мкл/мин. Затем мышинное антитело против человеческого IgG (Fc) инъецировали в каналы (каналы 1-8, Fc1,2) со скоростью потока 10 мкл/мин. в течение приблизительно 360 сек., с уровнем иммобилизации приблизительно от 7000 до 14000 ЕО. И наконец, чип блокировали этаноламином со скоростью 10 мкл/мин. в течение 420 секунд.

(3) Буферный обмен

Замену буфера осуществляли для человеческого белка В7Н3 с использованием обессоливающей колонки и соответствующего рабочего реагента и после замены определяли концентрацию образца.

(4) Захват лиганда

Антитело разводили до 10 мкг/мл рабочим реагентом, и это разведение вводили в экспериментальные каналы (Fc2) для захвата человеческого IgG (Fc) со скоростью потока 10 мкл/мин. приблизительно при 300 ЕО. В эталонных каналах (Fc1) захват лиганда не проводили.

(5) Многоцикловый анализ аналита

Человеческий белок В7Н3 разводили 2 раза рабочим реагентом. Разведенный человеческий белок В7Н3 последовательно инъецировали в экспериментальные каналы и эталонные каналы со скоростью потока 30 мкл/мин. при соответствующих периодах ассоциации и диссоциации. Все стадии ассоциации и диссоциации выполняли в присутствии рабочего реагента. После каждого анализа концентрации, чип необходимо было регенерировать хлоридом магния со скоростью потока 20 мкл/мин. в течение 30 сек.,

чтобы смыть лиганд и недиссоциировавший анализ. Для проведения следующего анализа концентрации, экспериментальным каналам необходимо было повторно захватить таким же количеством лиганда.

(б) Анализ данных

Величину KD вычисляли для каждого образца с использованием программного обеспечения для анализа Biacore 8K Biacore Insight Evaluation Software. Эталонные каналы (Fc1) использовали для вычитания фона.

Результаты показаны в Таблице 1. Однодоменные антитела 1A5 и 1G7 против B7H3 и их гуманизованные антитела согласно изобретению обладают относительно высокой аффинностью к человеческому белку B7H3.

Таблица 1. Результаты связывания однодоменных антител с рекомбинантным белком B7H3-Fc

	Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (M)
1A5	6,09 × 10 ⁵	0,004503	7,394 × 10 ⁻⁹
1G7	1,150 × 10 ⁶	0,006182	5,375 × 10 ⁻⁹

1.2. Кривые аффинности антител

Рекомбинантные антитела в различных концентрациях инкубировали с клетками U251 (экспрессирующими B7H3) и связывание антител с поверхностью клеток оценивали по средней интенсивности флуоресценции (MFI) клеток. Из результатов, показанных на фиг. 2, видно, что антитела 1A5 и 1G7 и их гуманизованные антитела могут эффективно связываться с поверхностью клеток U251.

1.3. Функция ADCC антител

Эквивалентное количество НК-клеток и клеток U251-LG культивировали совместно, а затем к ним добавляли 200 нг/мкл рекомбинантного антитела, и после совместного культивирования в течение 24 часов оценивали цитотоксичность, опосредованную антителом. Из результатов, показанных на фиг. 3, видно, что антитела 1A5 и 1G7 и их гуманизованные антитела могут эффективно уничтожать опухолевые клетки U251-LG посредством ADCC.

1.4. Конструирование химерного антигенного рецептора, содержащего антитело против B7H3 (CAR)

Структура CAR с антителом против B7H3 включала: антигенсвязывающую область B7H3 (происходящую от однодоменного антитела 1A5 против B7H3 и имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28), внеклеточную шарнирную область CD8A, трансмембранную область CD8A, внутриклеточный костимулирующий домен 4-1BB и домен сигнала активации CD3ζ. Аминокислотная последовательность неантигенсвязывающего домена анти-B7H3 CAR представлена в SEQ ID NO: 34, а нуклеотидная последовательность представлена в SEQ ID NO: 38.

1.5. Создание лентивирусного вектора, содержащего CAR с антителом против B7H3

В соответствии с информацией о последовательности В7Н3 и структуре вектора CAR был сконструирован лентивирусный вектор для экспрессии анти-В7Н3 CAR, и схема этого вектора показана на фиг. 1. Была проведена оптимизация: в качестве остова был выбран коммерчески доступный лентивирусный экспрессионный вектор рCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP и была проведена элементная модификация на основе вектора. Сначала, резистентный к ампициллину ген β -лактамазы на векторе был заменен аминогликозид-фосфотрансферазой, полученной из Tn5, чтобы обеспечить резистентность вектора к канамицину. Затем, авторами был удален промотор CMV и смежный с ним и расположенный ниже сайт множественного клонирования, которые потенциально представляли угрозу для применения *in vivo*. И наконец, ген copGFP, который начинал экспрессироваться с промотора EF1 в исходном векторе, был удален, сайт ферментативного расщепления SalI был сохранен, а сайт ферментативного расщепления SmaI был добавлен к 5'-концу SalI для конструирования вектора с образованием конечного целевого вектора. Добавленный сайт ферментативного расщепления SmaI представлял собой единственный сайт ферментативного расщепления конечного целевого вектора, а другие части последовательности вектора не имели сайта ферментативного расщепления. После оптимизации был сконструирован лентивирусный вектор для экспрессии химерного антигенного рецептора и была осуществлена упаковка лентивируса после подтверждения правильности последовательности путем секвенирования по Сэнгеру.

Пример 2

2.1. Конструирование руководящей РНК

Соответствующие последовательности генов были найдены и загружены через веб-сайт <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, последовательности генов были открыты с помощью программного обеспечения SnapGene, и оцрРНК могли быть сконструированы на различных экзонах генов-мишеней. оцрРНК системы CRISPR/Cas9, используемая в этом примере, была разработана в соответствии с нерестриктивным принципом: 5'-NNN(20)-NGG-3', где NGG упоминается как мотив, смежный с протоспейсером (PAM), где N представлены как A, T, C или G. Поскольку многие оцрРНК могут быть сконструированы на одном и том же экзоне, а оцрРНК, состоящая из 20 нуклеотидных последовательностей, может неоднократно встречаться в геноме, то конструирование и оценка оцрРНК были выполнены с использованием веб-сайта <http://Crispr.cos.uni-heidelberg.de>. Последовательность экзона была загружена на веб-сайт, а оцрРНК были сконструированы и подвергнуты прогностической оценке. Чем выше балл в оценке, тем выше эффективность редактирования и тем ниже может быть риск нецелевого использования. Для анализа были выбраны оцрРНК с более высокими показателями. оцрРНК, нацеленные на ген TRAC, представлены в SEQ ID NO: 157 - SEQ ID NO: 171, оцрРНК, нацеленные на ген HLA-A02, представлены в SEQ ID NO: 172 - SEQ ID NO: 193, оцрРНК, нацеленные на ген HLA-A11, представлены в SEQ ID NO: 194 - SEQ ID NO: 204, а оцрРНК, нацеленные на ген HLA-A24, представлены в SEQ ID NO: 205 - SEQ ID NO: 212, которые были синтезированы специалистами биотехнологической корпорации GenScript.

2.2. Выбор донора

Гомозиготы HLA-B, которые соответствовали типированию HLA-B рецептора, отбирали на основе типирования HLA-B рецептора.

Сначала, источник донора основывался на гомозиготах HLA-B для данной группы, и один из аллелей HLA-B у пациента соответствовал гомозиготе HLA-B у донора, а поэтому клетки этих доноров могли покрывать большое число групп пациентов, а реакция отторжения, вызванная несоответствием подтипов HLA-B, была снижена. В основном, отбирали HLA-B, например, гомозиготу В*40, гомозиготу В*15, гомозиготу В*46, гомозиготу В*13, гомозиготу В*51, гомозиготу В*58, гомозиготу В*07, гомозиготу В*35, гомозиготу В*44, гомозиготу В*52, гомозиготу В*57, гомозиготу В*54 и гомозиготу В*55, которые имели относительно высокую частоту в данной группе. Был выбран HLA-A, такой как гомозигота А*02, гомозигота А*11 и гетерозигота А*02/А11, которые имели относительно высокую частоту в данной группе.

2.3. Получение CD3⁺-Т-клеток

(1) Выделение МКПК из периферической крови

Периферическую кровь брали у здоровых доноров и разводили буфером PBS в соотношении 1:1. Раствор для выделения клеток (фиколл) с объемом крови 1/3 после разведения сначала добавляли в новую центрифужную пробирку емкостью 50 мл, затем очень медленно добавляли разведение клеток крови вдоль стенки пробирки и смесь центрифугировали при комнатной температуре в течение 20 минут при 800 g (для центрифуги, скорость ускорения устанавливали равной 1, а скорость замедления была установлена равной 0). После центрифугирования, жидкость в центрифужной пробирке разделяли сверху вниз на PBS, слой сыворотки, слой лейкоцитов, раствор для выделения лимфоцитов и слой эритроцитов. PBS и слой сыворотки удаляли. Слой лейкоцитов переносили в новую центрифужную пробирку емкостью 50 мл, добавляли PBS до 40 мл для промывки клеток и смесь центрифугировали 10 минут при 450 g. Супернатант отбрасывали после центрифугирования для получения мононуклеарных клеток периферической крови. Клетки ресуспендировали, а затем подсчитывали.

(2) Оттаивание криоконсервированных МКПК, взятых у здорового человека

Криоконсервированные клетки МКПК, взятые у здорового человека, оттаивали на водяной бане при температуре 37°C. После полного оттаивания, клетки помещали пипеткой в центрифужную пробирку емкостью 15 мл, содержащую 10 мл культуральной среды X-VIVO15, содержащей 10% FBS (приобретенной у LONZA), и центрифугировали в течение 8 минут при 400 g; супернатант отбрасывали, добавляли 2 мл культуральной среды X-VIVO15 (содержащей 10% FBS и ДНКазу I с конечной концентрацией 100 мкг/мл) и клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут и непрерывно встряхивали во время инкубирования; после инкубирования, раствор фильтровали с помощью фильтра 40 мкм; в пипетку вводили 10 мл буфера PBS для ресуспендирования клеток на дне, а затем клетки добавляли на фильтр; после фильтрации, клетки центрифугировали в течение 8 минут при 400 g, супернатант после центрифугирования отбрасывали; клетки

ресуспендировали, а затем подсчитывали.

(3) Сортинг CD3⁺-Т-клеток

Т-клетки из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) экстрагировали с использованием набора для сортирования Т-клеток человека EasySep™ (приобретенного у StemCell Technologies, номер по каталогу 17951). Плотность МКПК доводили до 5×10^7 клеток/мл и добавляли буфер PBS в диапазоне 0,25-2 мл, при этом, сначала добавляли коктейль и равномерно перемешивали, а затем добавляли коктейль для выделения в концентрации 50 мкл/мл; после равномерного перемешивания, смесь оставляли при комнатной температуре на 5 минут; RapidSpheres перемешивали на вихревом генераторе в течение 30 сек., затем добавляли в клетки в концентрации 40 мкл/мл и равномерно перемешивали, после чего в смесь добавляли буфер до объема 2,5 мл и осторожно пипетировали вверх и вниз 2-3 раза; затем смесь помещали в пробирки для криоконсервации по 2,5 мл в каждой пробирке, пробирки помещали на магнитную рамку и оставляли при комнатной температуре на 3 минуты; крышки пробирок для криоконсервации аккуратно снимали, а магнитную рамку осторожно подхватывали, взявшись за два конца магнитной рамки, и переворачивали в течение 2-3 сек.; клеточные жидкости одновременно переливали в новые центрифужные пробирки; клетки ресуспендировали в 10-20 мл буфера (в зависимости от количества клеток), а затем центрифугировали в течение 10 минут при 300 g и супернатант отбрасывали для получения CD3⁺-Т-клеток.

(4) Активация Т-клеток

Активирующий реагент приготавливали в соответствии с объемным соотношением «культуральная среда:трансактиватор»=99:1, где культуральная среда представляла собой культуральную среду X-VIVO15 (содержащую 5% FBS, 200 ед./мл IL2, 10 нг/мл IL7 и 5 нг/мл IL15), а трансактиватор был приобретен у MilteNY. Т-клетки тщательно ресуспендировали в 1 мл активирующего реагента (содержащего 10 мкл трансактиватора) на 1×10^6 клеток, а затем инкубировали в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в течение 1 дня.

Пример 3

3.1. Перенос вируса

CD3⁺-Т-клетки получали в соответствии с методом, описанным в Примере 2 (D0), и активировали магнитными шариками с антителом против CD3/CD28. После активации, лентивирусные векторы (лентивирусные векторы, экспрессирующие CAR против B7H3 и полученные как описано в Примере 1) трансфицировали на D1, лентивирусные векторы отмывали на D2 и проводили электропорацию на D3.

3.2. Нокаут гена

Комплексы RNP переносили на активированные Т-клетки, полученные в Примере 3.1 (клетки CAR-Т на D3 использовали в качестве исходных клеток) путем электропорации с использованием набора для электропорации (приобретенного у LONZA, номер по каталогу V4XXP-3024). После отбора проб и подсчета клеток, их собирали и центрифугировали, а осадок клеток ресуспендировали в PBS. Культуральную среду

(культуральную среду X-VIVO15+10% FBS+IL2 (200 ед/мл) + IL7 (10 нг/мл) + IL15 (5 нг/мл)) предварительно нагревали в лунках планшета в течение 30 минут. Буфер для электропорации приготавливали в соотношении раствор нуклеофактора:добавка=82:18; комплексы РНП распределяли согласно каждой системе электропорации с использованием 1×10^7 клеток (Cas9:оцрРНК=2:1). В пробирку для ПЦР сначала добавляли 10 мкг оцрРНК (без РНКазы), а затем добавляли 20 мкг белка Cas9 (приобретенного у Thermo, номер по каталогу A36499), смесь осторожно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 12 минут. Описанные выше клетки подсчитывали и центрифугировали в течение 8 минут при 300 g, а супернатант отбрасывали. Затем добавляли PBS для ресуспендирования клеток, клетки 1×10^7 отбирали пипеткой и снова центрифугировали в течение 8 минут при 300 g, а супернатант отбрасывали. Клетки ресуспендировали в 100 мкл приготовленного буфера для электропорации. Инкубированные комплексы РНП добавляли к клеточной суспензии, описанной выше. Смесь осторожно перемешивали и осторожно переносили в кювету для электропорации. Кювету для электропорации помещали в аппарат для электропорации Lonza-4D и подвергали электропорации с использованием программы электропорации EO-115. Предварительно нагретую культуральную среду добавляли в кювету для электропорации, клетки переносили в предварительно нагретую культуральную среду в луночном планшете с помощью подобранной пипетки, а затем помещали в инкубатор с 5% CO₂ при 37°C на 48 часов, после чего клетки собирали. Эффективность редактирования анализировали путем секвенирования по Сэнгеру, а эффективность нокаута собранных клеток анализировали с помощью FACS.

Ниже представлены последовательности оцрРНК: оцрРНК TRAC:
 AGAGTCTCTCAGCTGGTACA (SEQ ID NO: 157), оцрРНК A02:
 CTGACCATGAAGCCACCCTG (SEQ ID NO: 174) и оцрРНК A11:
 GGCCCCTCCTGCTSTATCCA (SEQ ID NO: 204).

3.3. Сортинг CD3-негативных Т-клеток

CD3-негативные Т-клетки сортировали. Клетки подсчитывали и центрифугировали, а супернатант отбрасывали; клетки ресуспендировали в буфере и равномерно перемешивали; магнитные шарики CD3 добавляли из расчета 20 мкл магнитных шариков CD3 на 10^7 клеток, смесь равномерно перемешивали и инкубировали в холодильнике при 4°C; клетки промывали буфером и центрифугировали, а затем выделяли магнитные шарики; колонку сначала ставили на магнитную подставку, а центрифужную пробирку соответственно помещали под магнитную подставку; колонку (LD) пропитывали буфером и клетки добавляли в колонку без образования пузырьков; колонку промывали 2 раза буфером, промытую жидкость (CD3-Т) собирали в центрифужную пробирку объемом 15 мл и часть клеток подсчитывали.

3.4. Культивирование клеток

Состояние клеток наблюдали под микроскопом. Клетки разводили, подсчитывали и добавляли полную культуральную среду для поддержания плотности клеток на уровне от 3

$\times 10^5$ до 1×10^6 клеток/мл. Жидкость добавляли/заменяли через определенный промежуток времени, и клетки культивировали при 37°C с $5\% \text{CO}_2$. Сбор клеток: клеточную суспензию собирали в клеточную центрифужную пробирку и центрифугировали, а супернатант отбрасывали. Клетки снова промывали нормальным физиологическим раствором и центрифугировали. Затем приготавливали раствор для криоконсервации и центрифугированные клетки ресуспендировали в растворе для криоконсервации. Суспензию клеток переносили пипеткой в пакет для криоконсервации клеток в целях получения конечного продукта, и пакет для криоконсервации клеток маркировали для последующего криоконсервирования.

3.5 Анализ на эффективность нокаута генов

(1) Анализ методом секвенирования по Сэнгеру

Клетки подсчитывали. 3×10^4 - 5×10^4 клеток центрифугировали в течение 5 минут при 2000 об/мин, и супернатант по возможности отбрасывали. В каждую пробирку добавляли по 20 мкл лизирующего буфера DE. Лизированные клетки добавляли в пробирку для ПЦР, мгновенно центрифугировали, а затем помещали в аппарат для ПЦР при следующих условиях: 65°C в течение 30 минут, 4°C в течение 30 сек., 95°C в течение 2 минут и 16°C на неограниченное время. ПЦР проводили с использованием пар праймеров TRAC-For/TRAC-Rev или HLA-A For/HLA-A Rev, а лизированный продукт использовали в качестве матрицы. Продукт ПЦР был отправлен в Genewiz для секвенирования по Сэнгеру. После получения результатов секвенирования по Сэнгеру, сайт редактирования и эффективность редактирования прогнозировали с помощью редактора EditR на сайте: https://moriaritylab.shinyapps.io/editr_v10/.

(2) Подсчет клеток методом проточной цитометрии

10^5 - 10^8 клеток центрифугировали в течение 5 минут при 2000 об/мин и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 100 мкл буфера PBS для ресуспендирования клеток и добавляли 5 мкл антитела против человеческого АВ TCR-APC (приобретенного у eBioscience), 5 мкл моноклонального антитела против HLA-A02 (BB7.2), APC и антитело eBioscience™ (приобретенное у Invitrogen). Смесь равномерно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. После центрифугирования в течение 5 минут при 2000 об/мин, клетки 2 раза промывали буфером PBS, ресуспендировали и анализировали на проточном цитометре BD FACSAria. Можно было получить положительные показатели экспрессии TCR и HLA-A02 на клеточной поверхности. Эффективность нокаута = $(\text{AB})/\text{A} \times 100\%$, где A представляет собой уровень позитивной экспрессии в контрольной группе; а B представляет собой уровень позитивной экспрессии в группе с нокаутом.

Результаты показаны на фиг. 4A-4C. Доля CAR-позитивных UCAR-T-клеток с антителом против B7H3 может составлять более 30% (фиг. 4A), коэффициент клеток центральной памяти, то есть, UCAR-T-клеток с антителом против B7H3 составляет приблизительно 50% (фиг. 4B), а эффективность двойного нокаута для UCAR-T-клеток с антителом против B7H3 составляет до 90% (фиг. 4C).

Пример 4. Анализ цитотоксичности *in vitro* UCAR-T-клеток с антителом против В7НЗ

4.1. Уничтожение клеток-мишеней с использованием UCAR-T-клеток с антителом против В7НЗ

(1) Клетки-мишени с В7НЗ: PANC-1-люцифераза; состояние клеток-мишеней доводили до логарифмической фазы, и перед экспериментами, клетки непрерывно пассировали 2 раза;

(2) Были приготовлены UCAR-T-клетки с антителом против В7НЗ и Т-клетки в контрольной группе CAR-T с антителом против В7НЗ. Эффективность нокаута, эффективность трансфекции, эффективность сортировки CD3-T и количества Т-клеток памяти анализировали с помощью проточной цитометрии и подсчитывали кратность амплификации;

(3) несколько групп полученных клеток собирали центрифугированием, где каждая группа составляла 6×10^6 клеток;

(4) клетки-мишени ресуспендировали в среде 1640+10% FBS. Для каждой мишени брали три 24-луночные планшета и клетки-мишени высевали из расчета 2×10^5 клеток/лунку (как мишени, так и эффекторные клетки высевали с плотностью 2×10^6 клеток/мл). Затем добавляли эффекторные клетки в соотношении Е/Т (отношение эффекторных клеток к мишени, эффекторные клетки:клетки-мишени). В каждую лунку дополняли максимальный объем (например, 600 мкл). Такое же количество клеток-мишеней высевали в контрольной группе без эффекторных клеток (600 мкл). Планшеты с лунками инкубировали в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в течение 24 часов. Клетки высевали при следующем соотношении Э/Т: 1:2, 1:1, 2:1, 5:1 и 10:1 и все это повторяли три раза; и

(5) Через 24 часа культивирования, луночные планшеты вынимали из инкубатора и собирали 200 мкл супернатанта. Затем способность рекомбинантных CAR-T-клеток к лизису клеток-мишеней оценивали с помощью анализа на люциферазную активность.

Формула вычисления процента лизиса клеток-мишеней представлена ниже:

$$\% \text{ лизиса} = \left(1 - \frac{\text{Luc-Активность}_{\text{смешанный образец}}}{\text{Luc-Активность}_{\text{контрольный образец}}} \right) \times 100\%$$

Анализ результатов: CAR-T-клетки с антителом против В7НЗ и UCAR-T-клетки с антителом против В7НЗ оказывают значительное уничтожающее действие на клетки с PANC-1-люциферазой. UCAR-T-клетки с антителом против В7НЗ могут достигать эффективности уничтожения более 90%, если соотношение эффектора к мишени составляет 10:1 (см. фиг. 5).

4.2. Анализ секреции цитокинов UCAR-T-клетками с антителом против В7НЗ, совместно культивированными с клетками-мишенями

Супернатант описанной выше системы совместного культивирования собирали и анализировали уровень секреции цитокинов. Анализ результатов (фиг. 6А-6С): CAR-T-клетки с антителом против В7НЗ и UCAR-T-клетки с антителом против В7НЗ могут быть в значительной степени активированы и могут секретировать цитокины IL-2, IFN- γ и TNF- α

в больших количествах.

Пример 5. Противоопухолевый эффект *in vivo* UCAR-T-клеток с антителом против B7H3

Мышам NSG в возрасте 8-10 недель подкожно вводили опухолевые клетки PANC-1-люцифераза-GFP (5×10^6) и мышей разделяли на три группы по 5 мышей в каждой, а время образования опухоли обычно составляло 2-4 недели. 5E6 UCAR-T-клеток с антителом против B7H3, CAR-T-клеток с антителом против B7H3 и T-клеток без нокаута гена отдельно вводили вовнутрь опухоли каждой группе мышей путем однократной инъекции в один участок с объемом инъекции 50 мкл. Регрессию опухоли у мышей контролировали с помощью люциферазы.

Анализ результатов (фиг. 7): Скорость роста опухоли у мышей, которым повторно вводили UCAR-T-клетки с антителом против-B7H3, была значительно замедлена, и CAR-T-клетки с антителом против B7H3 и UCAR-T-клетки с антителом против B7H3 продемонстрировали превосходные противоопухолевые эффекты.

Пример 6. Анализ времени полужизни *in vivo* UCAR-T-клеток с антителом против B7H3

15 мышей с гуманизованной иммунной системой (hHSC-NCG) были получены и разделены на 3 группы. Клетки приготавливали следующим образом: экспериментальная группа: UCAR-T-клетки с антителом против B7H3 (с нокаутом TRAC+HLA-A02); контрольная группа 1: CAR-T против B7H3; и контрольная группа 2: UCAR-T-клетки с антителом против B7H3 (с нокаутом TRAC+B2M). Каждой мышке вводили 1×10^7 клеток и кровь брали в разные моменты времени: на D0, через 2 часа, на D3, D7, D14, D21, D28, D35, D42, D49, D56 и на D60. Геномы из образцов крови в различные моменты времени экстрагировали и копию/нг геномной ДНК вычисляли методом абсолютного количественного определения QPCR. UCAR-T-клетки, собранные на 14-й день, использовали в качестве позитивного контроля, а воду DEPC использовали в качестве негативного контроля.

Анализ результатов: UCAR-T-клетки с антителом против B7H3 (с нокаутом TRAC+HLA-A02) сохранялись у мышей дольше всего.

Пример 7. Проверка безопасности универсальных T-клеток *in vitro*.

(1) Реакция ТПХ («трансплантат против хозяина»): были приготовлены T-клетки с двойным нокаутом TRAC и HLA-A и T-клетки без нокаута гена, аллогенные МКПК подвергали облучению, 2 группы приготовленных клеток стимулировали отдельно и анализировали на уровне IFN- γ .

Анализ результатов: группа T-клеток с двойным нокаутом TRAC и HLA-A имела очень низкий уровень секреции IFN- γ , что указывает на то, что нокаут TRAC снижает ТПХ-ответ.

(2) Аллогенный ответ: после стимуляции и облучения аллогенных МКПК, в 2 группах клеток анализировали уровень IFN- γ .

Анализ результатов: группа T-клеток с двойным нокаутом TRAC и HLA-A имела

очень низкий уровень секреции IFN- γ , что указывает на то, что нокаут HLA-A снижает аллогенный ответ.

Пример 8. Проверка безопасности универсальных Т-клеток *in vivo*.

Экспериментальная группа: 5×10^6 UCAR-T-клеток с антителом против B7H3, негативных по двум TCR-HLA-A, и 5×10^6 аллогенных Т-клеток были совместно инъецированы мышам NSG.

Контрольная группа: мышам NSG вводили 5×10^6 UCAR-T-клеток с TCR-B7H3, и 5×10^6 аллогенных Т-клеток.

В каждой группе было по 5 мышей NSG.

(1) ТПХ-реакция: в соответствии с клиническими критериями, такими как выживаемость, структура шерсти, целостность кожи и т.п., наблюдалась реакция «трансплантат против хозяина». Анализ цитокинов: брали сыворотку периферической крови для анализа уровней цитокинов, таких как IL6, IL-2, TNF- α , IFN- γ и т.п. Временные точки забора крови были следующими: за 24 часа, на день 3, на день 7, на день 14, на день 28 и за 2 месяца до повторной инфузии. Анализ поражения внутренних органов: в конце периода наблюдения (приблизительно в течение 2 месяцев) селезенку, печень, кожу, желудочно-кишечный тракт, легкие и почки мышей собирали для анализа путем HE-окрашивания срезов.

Анализ результатов: из 5 мышей, которым инъецировали необработанные Т-клетки, у 4 мышей в течение 2 месяцев после инъекции развивалась летальная реакция «ксенотрансплантат против хозяина» (РТПХ). Ни у одной из мышей, получавших клетки с двойным нокаутом TRAC и HLA-A, не развилась РТПХ; группа Т-клеток с двойным нокаутом TRAC и HLA-A имела очень низкие уровни секреции цитокинов, таких как IL6, IL-2, TNF- α и IFN- γ ; более того, различные органы у этих мышей были морфологически нормальными, что указывает на то, что реакция РТПХ в группе Т-клеток с двойным нокаутом TRAC и HLA-A значительно снижалась.

(2) Аллогенный ответ: были приготовлены CAR-T-клетки с двойным нокаутом TRAC и HLA-A и мышам NSG совместно инъецированы 1×10^7 CAR-T-клеток с двойным нокаутом TCR-HLA-A и 2×10^6 аллогенных Т-клеток. Контрольная группа: мышам NSG вводили 1×10^7 TCR-CAR-T-клеток.

Кровь брали в различные моменты времени для определения количества копий CAR. Изменения количества копий сравнивали для обеих групп CAR. Моменты времени были следующими: D1, D5, D7, D10, D14, D21 и D28.

Вывод: на D21, реакция отторжения у мышей в контрольной группе была значительной, и количество копий практически не обнаруживалось. Однако, количество копий в экспериментальной группе все еще находилось на относительно стабильном уровне, что указывает на то, что реакция отторжения значительно ослаблялась; время выживания клеток в экспериментальной группе у мышей было увеличено, что указывает на то, что реакция отторжения в группе CAR-T-клеток с двойным нокаутом TRAC и HLA-A значительно снижалась (см. фиг. 8A-8B).

Пример 9. Анализ безопасности редактирования генов

Были приготовлены Т-клетки с двойным нокаутом TRAC и HLA-A и Т-клетки без генного нокаута, и после анализа эффективности нокаута были проведены следующие анализы:

(1) Не-мишень:

Контрольная группа: трансгенный CAS9+метка ODN.

Экспериментальная группа: трансгенный CAS9+оцрPHK (TRAC+HLA-A) + метка ODN.

Целевое и нецелевое WGS (секвенирование всего генома): на D14 было собрано по 1×10^6 Т-клеток без генного нокаута и Т-клеток с двойным нокаутом TRAC и HLA-A и эти клетки были отправлены в Suzhou Genewiz Biological Technology Co., Ltd.

Анализ результатов: уровень клеток, не являющихся мишенями, в экспериментальной группе был очень низким, и нецелевые клетки были в основном сконцентрированы среди генов и интронов, а поэтому влияние не-мишеней на функции генов было невелико (см. фиг. 9).

(2) Хромосомная транслокация: метод кол.ПЦР применяли для количественной оценки реаранжировок, которые могут возникнуть при одновременном редактировании локусов TRAC и HLA. Две транслокации были обозначены как TRAC:HLA и HLA:TRAC. Позитивные эталонные образцы в синтезированной матричной плазмиде оценивали в качестве аналитического контроля. Амплифицированные фрагменты по обе стороны области-мишени генома HLA использовали в качестве внутреннего контроля. Геномную ДНК экстрагировали для проведения количественной ПЦР в реальном времени, и число копий геномной ДНК вычисляли в соответствии со стандартной кривой и значением C_q .

Анализ результатов: Т-клетки с двойным нокаутом (TRAC+HLA-A) были проанализированы на наличие хромосомной транслокации на день 14 (сбор), и результаты анализа показали, что значения анализа для двух типов методов транслокации были близки к нулю, что позволяет предположить об отсутствии реаранжировки локусов (см. фиг. 10).

(3) Картирование: 1×10^6 Т-клеток без нокаута гена и Т-клеток с двойным нокаутом TRAC и HLA-A, которые имели конfluence 70%-80%, помещали отдельно в две бутылки T25. Бутылки были заполнены культуральной средой, плотно закрыты герметичной крышкой, обернуты герметизирующей пленкой и отправлены в Компанию Zhejiang Ruyao Biotech Co., Ltd. для анализа.

Анализ результатов: по сравнению с контрольной группой, экспериментальная группа имела нормальный кариотип (см. фиг. 11).

(4) Остаток белка Cas9: при приготовлении клеток, 1×10^6 клеток в трех временных точках: до нокаута, после нокаута и перед сбором собирали отдельно для лизиса, а затем использовали набор для количественного определения белка (NOVATEINBIO, номер по каталогу NB-E1372PR), и каждую группу образцов доводили до 2 мкг одинакового количества загрузки образца и анализировали с помощью набора ELISA для белка CRISPR/Cas9 в соответствии с инструкцией. Белок Cas9 в образце прочно и стабильно

прикреплялся к отверстию бумаги для анализа. Связанный белок Cas9 затем распознавали с помощью тестируемого антитела, а затем проявляли с помощью проявляющего агента. Соотношение Cas9 было прямо пропорционально оптической плотности, а абсолютные количества белка Cas9 определяли количественно по сравнению с контрольными образцами Cas9.

Анализ результатов: Т-клетки с двойным нокаутом (TRAC+HLA-A) анализировали на остаток spCas9 в четырех временных точках: перед электропорацией (D3), перед заменой буфера и после электропорации (D5), D9 и D14 (сбор). Остатки не были обнаружены во всех трех временных точках, за исключением анализа следов остатков до замены буфера и после электропорации (D5). (см. фиг. 12).

Пример 10. Получение Т-клеток с нокаутом одного гена

Комплексы RNP переносили в активированные Т-клетки, полученные в Примере 2, путем электропорации с использованием набора для электропорации (приобретенного у LONZA, номер по каталогу V4XXP-3024). Культуральную среду (культуральную среду X-VIVO15+10% FBS+IL2 (200 ед/мл) + IL7 (10 нг/мл) + IL15 (5 нг/мл)) предварительно нагревали в лунке планшета в течение 30 минут. Буфер для электропорации приготавливали в соотношении раствор нуклеофактора:добавка=82:18. Препарат комплексов RNP: последовательность оцрПНК TRAC представляла собой Sg9 (представленный в SEQ ID NO: 157), а последовательность оцрПНК HLA-A представляла собой HLA-A02 Sg2 (представленный в SEQ ID NO: 173), HLA-A02 Sg5 (представленный в SEQ ID NO: 174), HLA-A11 Sg21 (представленный в SEQ ID NO: 204) или HLA-A11 Rsg2 (представленный в SEQ ID NO: 203). В пробирку для ПЦР сначала добавляли 20 мкг оцрПНК (без РНКазы), а затем добавляли 10 мкг белка Cas9 (приобретенного у Thermo, номер по каталогу A36499) и после осторожного перемешивания, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 12 минут. Активированные Т-клетки, культивированные как показано в Примере 2, подсчитывали и центрифугировали в течение 8 минут при 300 g, а супернатант отбрасывали. Затем добавляли PBS для ресуспендирования клеток. Клетки 1E7 отбирали пипеткой и снова центрифугировали в течение 8 минут при 300 g, а супернатант отбрасывали. Клетки ресуспендировали в 100 мкл приготовленного буфера для электропорации. Инкубированные комплексы РНП добавляли к клеточной суспензии, описанной выше. Смесь осторожно перемешивали и переносили в кювету для электропорации. Кювету для электропорации помещали в аппарат для электропорации Lonza-4D и подвергали электропорации с использованием программы электропорации EO-115. Предварительно нагретую культуральную среду добавляли в кювету для электропорации, и клетки переносили в предварительно нагретую культуральную среду в луночном планшете с помощью подобранной пипетки, а затем помещали в инкубатор с 5% CO₂ при 37°C.

Пример 11. Сравнение методов анализа на эффективность нокаута генов

(1) Анализ путем секвенирования по Сэнгеру

Клетки подсчитывали. 3×10^4 - 5×10^4 клеток центрифугировали в течение 5 минут при

2000 об/мин, и супернатант по возможности отбрасывали. В каждую пробирку добавляли по 20 мкл буфера для лизиса DE. Лизированные клетки добавляли в пробирку для ПЦР, мгновенно центрифугировали, а затем помещали в аппарат для ПЦР со следующими условиями: 65°C в течение 30 минут, 4°C в течение 30 сек., 95°C в течение 2 минут и 16°C на неопределенное время. ПЦР проводили с использованием пар праймеров TRAC-For/TRAC-Rev или HLA-A For/HLA-A Rev, а лизированный продукт использовали в качестве матрицы. Продукт ПЦР был отправлен в Genewiz для секвенирования по Сэнгеру. После получения результатов секвенирования по Сэнгеру, сайт редактирования и эффективность редактирования прогнозировали с помощью редактора EditR на web-сайте: https://moriaritylab.shinyapps.io/editr_v10/.

(2) Анализ путем секвенирования методом клонирования ТА

Продукт ПЦР очищали с использованием набора для очистки продукта ПЦР AxyPrep™ (приобретенного у AXYGEM), а затем к очищенному продукту ПЦР добавляли липкий конец с использованием набора (набора для присоединения по концам ДНК A-Tailing, приобретенного у TaKaRa). Продукт лигировали с вектором Т (с помощью набора для векторного клонирования rMDTM19-T, приобретенного у TaKaRa) с помощью набора для лигирования ДНК Ver2.1 (приобретенного у TaKaRa), и лигированный продукт переносили в компетентные клетки (DH5 альфа). Клетки наносили на планшет LB, содержащий ген резистентности к ампициллину, и планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение приблизительно 12 часов. Затем отобрали одну колонию и отправили ее в Genewiz для секвенирования. Эффективность нокаута=количество мутированных клонов/общее количество клонов.

(3) Подсчет клеток методом проточной цитометрии.

10^5 - 10^8 клеток центрифугировали в течение 5 минут при 2000 об/мин и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 100 мкл буфера PBS для ресуспендирования клеток и добавляли 5 мкл антитела против человеческого АВ TCR-APC (приобретенного у eBioscience), 5 мкл моноклонального антитела против HLA-A02 (BB7.2), APC и антитело eBioscience™ (приобретенное у Invitrogen). Смесь равномерно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. После центрифугирования в течение 5 минут при 2000 об/мин, клетки 2 раза промывали буфером PBS, ресуспендировали и анализировали на проточном цитометре BD FACSAria. В данном случае, можно было получить позитивные показатели экспрессии TCR и HLA-A02 на поверхности клеток. Эффективность нокаута= $(A-B)/A \times 100\%$, где А представляет собой уровень позитивной экспрессии в контрольной группе; а В представляет собой уровень позитивной экспрессии в группе с нокаутом.

Три результата анализа нокаута одного гена TRAC показаны на фиг. 13-15, а результаты вычисления эффективности нокаута показаны в Таблице 2. Три метода анализа были в основном одинаковыми, а эффективность редактирования оценивали только путем проведения секвенирования по Сэнгеру в последующих экспериментах.

Таблица 2. Результаты метода анализа эффективности нокаута генов

Ген-мишень	оцрРНК	Метод анализа	Эффективность нокаута, %
TRAC	Sg9	Секвенирование по Сэнгеру	90
		Секвенирование путем клонирования ТА	95
		Проточная цитометрия	93

Результаты метода секвенирования по Сэнгеру для редактирования гена HLA-A02 показаны на фиг. 16-17, а эффективность редактирования составляет 90%; при этом, результаты метода секвенирования по Сэнгеру для редактирования гена HLA-A11 показаны на фиг. 18-19.

Пример 12. Получение Т-клеток с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A.

Комплексы RNP переносили в активированные Т-клетки, полученные в Примере 2, путем электропорации с использованием набора для электропорации (приобретенного у LONZA, номер по каталогу V4XXP-3024). Культуральную среду (культуральную среду X-VIVO15+10% FBS+IL2 (200 ед/мл) + IL7 (10 нг/мл) + IL15 (5 нг/мл)) предварительно нагревали в лунке планшета в течение 30 минут. Буфер для электропорации приготавливали в соответствии с соотношением раствор нуклеофактора:добавка=82:18. Приготовление комплексов RNP: 20 мкг оцрРНК TRAC (TRAC Sg9) и 20 мкг оцрРНК HLA-A (HLA-A02 Sg2, HLA-A02 Sg5, HLA-A11 sg21 или оцрРНК, нацеленных на HLA-A*24:02:01, HLA-A*30:01:01:01, HLA-A*33:01:01:01, HLA-A*03:01:01:01, HLA-A*01:01:01:01 или HLA-A*26:01:01:01) отдельно добавляли в пробирки для ПЦР (без РНК), где в каждую пробирку добавляли по 10 мкг белка Cas9 (приобретенного у Thermo, номер по каталогу A36499) и пробирки осторожно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 12 минут. Активированные Т-клетки, культивированные как описано в Примере 2, подсчитывали и центрифугировали в течение 8 минут при 300 g, а супернатант отбрасывали. Затем добавляли PBS для ресуспендирования клеток. Клетки 1E7 отбирали пипеткой и снова центрифугировали в течение 8 минут при 300 g, а супернатант отбрасывали. Клетки ресуспендировали в 100 мкл приготовленного буфера для электропорации. Инкубированные комплексы RNP TRAC и HLA-A добавляли к клеточной суспензии, описанной выше. Смесь осторожно перемешивали и осторожно переносили в кювету для электропорации. Кювету для электропорации помещали в аппарат для электропорации Lonza-4D и подвергали электропорации с использованием программы электропорации EO-115. Предварительно нагретую культуральную среду добавляли в кювету для электропорации, и клетки переносили в предварительно нагретую культуральную среду в луночном планшете с помощью подобранной пипетки, а затем помещали в инкубатор с 5% CO₂ при 37°C.

Эффективность нокаута двух генов анализировали путем секвенирования, и в этом

случае можно было получить TRAC-негативные и HLA-A-негативные Т-клетки с эффективностью нокаута двух генов не менее 80%. Результаты показаны на фиг. 20-21. На фиг. 20А показаны результаты нокаута HLA-A02 с использованием HLA-A02 Sg5, где верхний ряд указывает на результаты для контрольной группы (то есть, HLA-A02 Sg5 не использовался для нокаута); в следующем ряду показаны результаты одновременного нокаута HLA-A02 и TRAC. На фиг. 20В показаны результаты нокаута TRAC с использованием TRAC Sg9, где в верхнем ряду показаны результаты для контрольной группы (то есть, TRAC Sg9 не использовался для нокаута); а в следующем ряду показаны результаты одновременного нокаута HLA-A02 и TRAC. На фиг. 21А-21В показан нокаут на уровнях белка после нокаута HLA-A02 и TRAC, где NEG относится к негативному контролю, WT относится к отсутствию каких-либо нокаутов, а нокаут двух TRAC+HLA-A относится к результатам одновременного нокаута HLA-A02 и TRAC.

Пример 13. Различия в экспрессии генов TRAC, HLA-A, В2М и СИТА в Т-клетках с нокаутом двух генов и соответствующих генов в соответствующих клетках.

(1) Активированные Т-клетки, полученные как описано в Примере 2, использовали и разделяли на две группы. Одну группу использовали в качестве контроля, а другую приготавливали в виде Т-клеток с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A в соответствии с методом, описанным в Примере 5. Секвенирование по Сэнгеру проводили в соответствии с методом, описанным в стадии (1) Примера 4. По результату секвенирования были получены клетки с двойным нокаутом генов TRAC и HLA-A. Приготовленные Т-клетки с двойным нокаутом гена инкубировали с соответствующими антителами против TRAC и HLA-A, а клеточный штамм с двойным нокаутом гена получали методом сортирования путем проточной цитометрии или сортирования на магнитных шариках.

(2) Было проанализировано изменение уровня экспрессии мРНК в Т-клетках с двойным нокаутом гена по сравнению с контрольной группой. РНК экстрагировали с использованием набора для экстракции РНК (приобретенного у QIAGEN, номер по каталогу 74004) и осуществляли обратную транскрипцию РНК с использованием набора для обратной транскрипции (приобретенного у Applied Biosystems, номер по каталогу 4368814) для получения кДНК. Количественный ПЦР-анализ проводили с использованием кДНК в качестве матрицы.

(3) Было проанализировано изменение уровня экспрессии белка в Т-клетках с двойным нокаутом гена по сравнению с контрольной группой. Белки экстрагировали с использованием реагента для экстракции полноразмерного белка (приобретенного у Thermo Scientific, номер по каталогу 87787), а уровень экспрессии белка анализировали методом Вестерн-блоттинга или проточной цитометрии с использованием антитела против TRAC (приобретенного у eBioscience, номер по каталогу 17-9986-42), антитела против HLA-A (приобретено у Merck, номер по каталогу 17-9876-41), антитела против В2М (приобретено у Invitrogen, номер по каталогу A15770) и антитела против СИТА (приобретено у OriGene, номер по каталогу CF812200).

Анализ путем секвенирования по Сэнгеру показал, что нуклеотидная

последовательность генов TRAC и/или HLA-A в Т-клетках с двойным нокаутом гена была изменена по сравнению с контрольной группой; а количественная ПЦР показала, что уровень экспрессии мРНК генов TRAC и/или HLA-A снижался в Т-клетках с двойным нокаутом генов, но уровень экспрессии мРНК генов B2M и/или СПТА не снижался. Результаты FACS и Вестерн-блоттинга показали, что уровень экспрессии белка в Т-клетках с двойным нокаутом гена снижался, а уровень экспрессии белка B2M и/или СПТА не снижался.

Результаты показаны на фиг. 22-23. На фиг. 22 показано определение уровня экспрессии мРНК-генов, а на фиг. 22 показаны уровни мРНК TRAC, HLA-A, B2M и СПТА, где WT относится к случаю без какой-либо обработки для нокаута, а группа двойного нокаута относится к результату Т-клеток с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A. На фиг. 23 показано определение уровня белка при экспрессии генов, где на фиг. 23А-23В показаны уровни экспрессии белков B2M и СПТА, соответственно; NEG относится к негативному контролю, WT относится к случаю без какой-либо обработки для нокаута, а нокаут двух TRAC+HLA-A относится к результату для Т-клеток с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A.

Пример 14. Получение Т-клеток с тройным нокаутом гена TRAC, гена HLA-A/B2M и гена СПТА и подтверждения изменений в экспрессии соответствующих трех генов.

(1) Контрольную группу, клетки с тройным нокаутом гена TRAC, гена HLA-A и гена СПТА, а также клетки с тройным нокаутом гена TRAC, гена B2M и гена СПТА, получали методом, описанным в стадии (1) Примера 13.

(2) Изменения уровней экспрессии белка анализировали методами FACS и Вестерн-блоттинга в соответствии с методом на стадии (3) Примера 13.

Уровни экспрессии белков генов TRAC, HLA-A и СПТА в Т-клетках с тройным нокаутом генов TRAC, HLA-A и СПТА были снижены по сравнению с клетками контрольной группы; уровни экспрессии белков генов TRAC, HLA-A и СПТА в Т-клетках с тройным нокаутом генов TRAC, B2M и СПТА были снижены по сравнению с клетками контрольной группы.

(3) Эффективность нокаута клеток с нокаутом по двум генам в Примере 13 и двух клеток с нокаутом по трем генам в этом примере анализировали методом проточной цитометрии с использованием антитела против TRAC (приобретенного у eBioscience, номер по каталогу 17-9986-42), антитела против HLA-A (приобретенного у Merck, номер по каталогу 17-9876-41) и антитела против B2M (приобретенного у Invitrogen, номер по каталогу A15770), и результаты показали, что эффективность множественного нокаута генов была достигнута одновременно на уровне одной клетки, и что эффективность нокаута двух генов была значительно выше, чем эффективность нокаута трех генов.

Результаты показаны на фиг. 24А-24D. На фиг. 24А-24С последовательно показан нокаут TRAC, HLA-A и B2M на уровнях белка, где WT относится к случаю без какой-либо обработки для нокаута, двойной нокаут генов TRAC+HLA-A относится к результату для Т-

клеток с двойным нокаутом генов TRAC и HLA-A; Тройной нокаут TRAC+HLA-A+СИТА относится к результату для Т-клеток с тройным нокаутом генов TRAC, HLA-A и СИТА; Тройной нокаут TRAC+B2M+СИТА относится к результату для Т-клеток с тройным нокаутом генов B2M, СИТА и TRAC; а нокдаун TRAC+HLA-A относится к результату для Т-клеток с нокдауном генов TRAC и HLA-A, полученному как описано в Примере 16. На фиг. 24D показан нокаут СИТА на уровне белка.

Результаты на Фиг. 24 показали, что уровни белка TRAC, HLA-A, СИТА и B2M снижены по сравнению с контрольной группой WT. Между тем, по сравнению с тройным нокаутом TRAC+HLA-A+СИТА или тройным нокаутом TRAC+B2M+СИТА, эффективность двойного нокаута TRAC+HLA-A была выше.

Пример 15. Конструирование последовательности антисмысловой РНК

Последовательности транскрипционных РНК соответствующих генов (гена TRAC и гена HLA-A) были получены из базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> или www.ensembl.org/, а кРНК была получена в соответствии со следующими принципами:

По возможности, следует избегать наличия последовательностей, которые имеют на 50-100 нуклеотидов ниже иницирующего кодона и на 100 нуклеотидов выше стоп-кодона; были выбраны последовательности длиной менее 30 нуклеотидов; при этом, следует избегать наличия 4 или более последовательно расположенных идентичных оснований; следует также избегать наличия интронных областей; следует избегать повторяющихся последовательностей; следует избегать наличия сайтов с полиморфизмом по одному нуклеотиду (SNP); при этом, предпочтительно выбрать последовательности, имеющие содержание GC в диапазоне от 30% до 60%; структуры последовательностей AA (N_{19}), NA (N_{21}) или NAR (N_{17}) YNN, где A представляет собой аденозин, T представляет собой тимидин, R представляет собой аденозин или гуанозин (пурины), Y представляет собой тимидин или цитидин (пиримидины), N представляет собой аденозин, тимидин, гуанозин или цитидин; где сравнение и анализ гомологии проводили на выбранных последовательностях, чтобы избежать значительной гомологии антисмысловой РНК с другими генами или последовательностями и возникновения нецелевых эффектов. Анализ гомологии проводили с использованием программы NCBI Blast: программы для нуклеотидов BLAST (blastn), программы UCSC Blat или Ensembl Blast.

Последовательности антисмысловой РНК, полученные с помощью такого конструирования, включали HLA-A-гомо-551, HLA-A-гомо-NEG, TRAC-гомо-375 и TRAC-гомо-NEG.

Пример 16. Получение Т-клеток с нокдауном гена TRAC и гена HLA-A.

Двойной нокдаун гена осуществляли с использованием антисмысловой РНК, созданной как описано в Примере 15. Lentivirus, содержащий последовательности антисмысловой РНК гена TRAC и гена HLA-A, был получен от Компании Genepharma. CD3⁺-Т-клетки получали методом, описанным в Примера 2 (D0) и активировали магнитными шариками с антителами против CD3/CD28. Lentivirus, несущий антисмысловые последовательности РНК гена TRAC и гена HLA-A, трансфицировали в

активированные Т-клетки (D1). На день 2, лентивирусный вектор отмывали и клетки продолжали культивировать до дня 5. Т-клетки, культивированные до дня 5, собирали, и эффективность нокдауна гена анализировали с помощью количественной ПЦР или Вестерн-блоттинга и т.п. Полученные Т-клетки метили соответствующими антителами против TRAC и HLA-A, а Т-клетки с нокдауном гена TRAC и гена HLA-A можно получить методами сортировки с помощью проточной цитометрии или сортировки на магнитных шариках. Результаты показали, что уровни экспрессии мРНК и белка TRAC и HLA-A были снижены в группе с нокдауном генов TRAC и HLA-A. На фиг. 25А-25В показан нокаут TRAC и HLA-A на уровнях мРНК, где WT относится к случаю без какой-либо обработки для нокаута, а двойной нокаут TRAC+HLA-A относится к результату для Т-клеток с нокаутом двух генов TRAC и HLA-A. Среди них, уровень нокаута TRAC и HLA-A на уровне белка можно видеть исходя из результатов, показанных на фиг. 24.

Пример 17. Различия в активностях различных Т-клеток.

Были приготовлены Т-клетки без нокаута гена, с двойным нокаутом гена, с тройным нокаутом гена и с двойным нокдауном гена как описано в Примерах 2, 12, 14 и 16 и было проведено сравнение активностей нескольких Т-клеток. Каждую группу клеток подсчитывали и высевали в 24-луночные планшеты по 1×10^6 клеток, и к клеткам в лунках добавляли РНА (0,3 мкг/мл) (иономицин+) или 5 нг/мл РМА и 50 нг/мл иономицина. Клетки культивировали еще 5 часов, а затем оценивали состояние активации клеток с использованием антител против CD69 (ранняя активация) (приобретенных у BD Biosciences, номер по каталогу FN50) и против CD137 (более поздняя стадия) (приобретенных у BD Biosciences, номер по каталогу 4В4-1) методом проточной цитометрии. Результаты показали, что активности Т-клеток с двойным нокаутом гена и двойным нокдауном гена превосходила активность Т-клеток с тройным нокаутом гена.

Экспрессия CD69 и CD137 на уровне белка показана на фиг. 26А-26В, соответственно, где WT относится к случаю без какой-либо обработки для нокаута, двойной нокаут TRAC+HLA-A относится к результату для Т-клеток с двойным нокаутом генов TRAC и HLA-A; тройной нокаут TRAC+HLA-A+СПТА относится к результату для Т-клеток с тройным нокаутом генов TRAC, HLA-A и СПТА; тройной нокаут TRAC+B2M+СПТА относится к результату для Т-клеток с тройным нокаутом генов B2M, СПТА и TRAC; и нокдаун TRAC+HLA-A относится к результату для Т-клеток с нокдауном генов TRAC и HLA-A, полученных как описано в Примере 16.

Пример 18. Различие в реактивности разных Т-клеток к аллогенным НК-клеткам.

Мечение CFSE (Invitrogen, C34554) осуществляли на Т-клетках без нокаута гена, с двойным нокаутом гена, с тройным нокаутом гена и с двойным нокдауном гена как описано в Примерах 2, 12, 14 и 16. Клетки подсчитывали, и 1×10^6 клеток собирали и культивировали совместно с НК-клетками (NK92MI) в соотношении 1:1. Через 24 часа, совместно культивированные клетки собирали из каждой группы и определяли соотношение CFSE-положительных клеток в смешанных клетках с помощью проточной

цитометрии.

Результаты показали, что токсичность уничтожения НК-клеток по отношению к Т-клеткам с двойным нокаутом гена и двойным генным нокдауном была ниже, чем у Т-клеток с тройным нокаутом гена. Результаты показаны на фиг. 27, где НК+Т относится к случаю, когда НК-клетки культивировали совместно с Т-клетками без какой-либо обработки для нокаута; нокдаун НК+TRAC+HLA-A относится к случаю, когда НК-клетки совместно культивировали с полученными Т-клетками с нокдауном гена TRAC и гена HLA-A, полученными как описано в Примере 16; двойной нокаут НК+TRAC+HLA-A относится к случаю, когда НК-клетки культивировали совместно с Т-клетками с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A; тройной нокаут НК+TRAC+HLA-A+СПТА относится к случаю, когда НК-клетки культивировали совместно с Т-клетками с тройным нокаутом генов TRAC, HLA-A и СПТА; тройной нокаут НК+TRAC+B2M+СПТА относится к случаю, когда НК-клетки культивировали совместно с Т-клетками с тройным нокаутом генов B2M, СПТА и TRAC.

Пример 19. Различие в аллогенном иммунном отторжении у различных Т-клеток

Периферическую кровь, взятую у донора 1, использовали для получения Т-клеток без нокаута гена, с двойным нокаутом гена, с тройным нокаутом гена и с двойным нокдауном гена как описано в Примерах 2, 12, 14 и 16. Периферическую кровь, взятую у донора 2, использовали для получения CD3⁺-Т-клеток. Каждую группу клеток, полученную из периферической крови донора 1, смешивали с CD3⁺-Т-клетками, полученными из периферической крови донора 2 согласно Примеру 2, в равной пропорции. Через 24 часа анализировали уровень экспрессии IFN- γ в системе смеси клеток. Результаты показали, что уровень экспрессии IFN- γ в группе Т-клеток с двойным нокаутом гена был ниже, чем в группе Т-клеток с тройным нокаутом гена.

Результаты показаны на фиг. 28. WT относится к случаю без какой-либо обработки для нокаута, двойной нокаут TRAC+HLA-A относится к результату для Т-клеток с двойным нокаутом генов TRAC и HLA-A; тройной нокаут TRAC+HLA-A+СПТА относится к результату для Т-клеток с тройным нокаутом генов TRAC, HLA-A и СПТА; тройной нокаут TRAC+B2M+СПТА относится к результату для Т-клеток с тройным нокаутом генов B2M, СПТА и TRAC; и нокдаун TRAC+HLA-A относится к результату для Т-клеток с нокдауном генов TRAC и HLA-A, полученных как описано в Примере 16.

Пример 20. Получение CAR-Т-клеток с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A, CAR-Т-клеток с тройным нокаутом гена TRAC, гена HLA-A и гена СПТА и CAR-Т-клеток с нокаутом гена TRAC, гена B2M и гена СПТА

(1) CD3⁺-Т-клетки были получены в соответствии с методом Примера 2 (D0) и активированы магнитными шариками с антителом против CD3/CD28. После активации, лентивирусные векторы (лентивирусы, содержащие CD19-CAR, CD20-CAR или BCMA-CAR) трансфицировали на D1, лентивирусные векторы отмывали на D2, CAR-позитивные Т-клетки сортировали на D3 и клетки продолжали культивировать до D5.

(2) В качестве исходных клеток использовали CAR-T-клетки, полученные на D5, а клетки с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A, CAR-T-клетки с тройным нокаутом гена TRAC, HLA-A и СПТА, и CAR-T-клетки с тройным нокаутом гена TRAC, гена В2М и гена СПТА получали способами, описанными в Примерах 12 и 14, соответственно.

(3) CAR-T-клетки с нокаутом двух генов и нокаутом трех генов, описанные выше, могут быть получены с помощью анализа методом проточной цитометрии, при этом, выход CAR-T-клеток с нокаутом двух генов был выше, чем выход CAR-T-клеток с нокаутом трех генов.

Результаты показаны на фиг. 29А-29Д. На фиг. 29А-29С последовательно продемонстрирован нокаут TRAC, HLA-A и В2М на уровнях белка. На фиг. 29Д показан нокаут СПТА на уровне белка, где WT относится к случаю без какой-либо обработки для нокаута, двойной нокаут TRAC+HLA-A относится к результату для CAR-T-клеток с двойным нокаутом генов TRAC и HLA-A; тройной нокаут TRAC+HLA-A+СПТА относится к результату для CAR-T-клеток с тройным нокаутом генов TRAC, HLA-A и СПТА; тройной нокаут TRAC+В2М+СПТА относится к результату для CAR-T-клеток с тройным нокаутом генов В2М, СПТА и TRAC.

Среди них, эффективность трансфекции CD19CAR показана на фиг. 30А-30В, где CAR30%+ представляет эффективность трансфекции CD19 CAR.

На фиг. 31 показана кратность амплификации различных клеток, где CAR-T-клетки с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A имели самую высокую кратность амплификации.

Пример 21. Противоопухолевый эффект CAR-T-клеток с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A

CAR-T-клетки с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A (нацеленным на CD19, CD20 или BCMA) получали как описано в Примере 21. Клетки-мишени, экспрессирующие ген люциферазы (позитивные по гену-мишени клеточные линии лейкоза или лимфомы, такие как Raji, Jurkat, MM1S и т.п.) высевали на луночный планшет. CAR-T-клетки с нокаутом двух генов, CAR-T-клетки с нокаутом трех генов или Т-клетки без нокаута гена добавляли в различных соотношениях эффектор-мишень (1:2,5, 1:1, 5:1, и 10:1), соответственно. После 24-часового совместного культивирования, клетки переносили в планшет с лунками для анализа, добавляли субстрат люциферазы и определяли величину флуоресценции с помощью микропланшет-ридера. Эффективность уничтожения=1 - значение флуоресценции Т-клеток, совместно культивированных с клетками-мишенями/значение флуоресценции клеток-мишеней, культивируемых отдельно.

Результаты показали, что CAR-T-клетки с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A оказывали значительное цитолитическое действие на опухолевые клетки.

На фиг. 32 показано цитолитическое действие на клетки-мишени Raji с CD19 b люциферазой, при этом, CAR-T-клетки с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A давали наиболее значительный эффект уничтожения. При каждом соотношении Е/Т, результаты, соответствующие описаниям к А-Д, были показаны слева направо.

Пример 22. Противоопухолевый эффект CAR-T-клеток с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A

Мышам NSG вводили опухолевые клетки внутривенно. После того, как опухоль была успешно детектирована, мышам делали повторную инфузию CAR-T-клеток с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A, CAR-T-клеток с тройным нокаутом генов и T-клеток без генного нокаута. Затем проводили мониторинг объема опухоли у мышей.

Мыши, которым повторно вводили CAR-T-клетки с нокаутом двух генов, продемонстрировали значительно более медленную скорость роста опухоли.

Результаты показаны на фиг. 33-34, где на фиг. 33 показан способ введения мышам, *i.v.* означает внутривенную инъекцию, CAR-T-клетки представляют собой CAR-T-клетки с двойным нокаутом гена и CAR-T-клетки с тройным нокаутом гена, экспрессирующие CD19 CAR. На фиг. 34 показан объем опухоли у мышей после введения CAR-T-клеток, при этом, на фиг. 34 показан, от левого столбца к правому столбцу, объем опухоли у мышей после последовательного введения нормального физиологического раствора, немодифицированных T-клеток, CD19-CAR-T-клеток с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A, CD19-CAR-T-клеток с тройным нокаутом генов TRAC, HLA-A и СПТА, а также CD19-CAR-T-клеток с тройным нокаутом генов B2M, СПТА и TRAC по отдельности. Результаты показали, что мыши, которым были повторно введены путем инфузии CAR-T-клетки с двойным нокаутом гена TRAC и гена HLA-A, продемонстрировали значительно более медленную скорость роста опухоли.

В итоге:

1. В настоящем изобретении получен химерный антигенный рецептор, нацеленный на B7H3, где антигенсвязывающий домен рекомбинантного рецептора получен из наноантитела, и рекомбинантный рецептор имеет такие свойства, как небольшую молекулярную массу и стабильную структуру.

2. Настоящее изобретение относится к лентивирусному экспрессионному вектору. *pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP* использовали в качестве остова, а ген β -лактамазы, резистентный к ампициллину в векторе, был заменен аминогликозидфосфотрансферазой, происходящей от *Tn5*, чтобы обеспечить устойчивость вектора к канамицину; промотор *CMV* и смежный с ним и расположенный ниже сайт множественного клонирования, которые потенциально представляют угрозу для применения *in vivo*, были deletированы; ген *copGFP*, который начинал экспрессироваться с промотора *EF1* в исходном векторе, был удален, сайт ферментативного расщепления *SalI* был сохранен, а сайт ферментативного расщепления *SmaI* был добавлен к 5'-концу *SalI* для конструирования вектора с образованием конечного вектора-мишени.

3. В настоящей заявке оптимизирована технология электротрансфекции комплекса белок-РНК. Было достигнуто более 90% эффективности нокаута двух генов в первичных T-клетках.

4. В настоящей заявке, источник донора основан на гомозиготах HLA-B, которые часто встречаются в определенной группе, и один из аллелей HLA-B у пациента

соответствует гомозиготам донора, а поэтому, клетки от этих доноры могут охватывать большое количество групп пациентов, а реакция отторжения, вызванная HLA-B, может быть снижена.

5. В соответствии с настоящим изобретением, молекулы HLA-A, тесно ассоциированные с отторжением, были скринированы на наличие нокаута, а другие молекулы HLA-I были сохранены, так, чтобы отторжение аллогенных клеток снижалось, при этом, следует избегать полного нокаута молекул HLA и элиминации молекул HLA NK-клетками в целях значительного увеличения времени полужизни аллогенных CAR-T-клеток *in vivo*.

6. В настоящей заявке сначала были сконструированы UCAR-T-клетки с антителом против B7H3, обладающие высокоэффективным двойным нокаутом TCR и HLA-A, и было создано безопасное, готовое к применению терапевтическое средство, которое позволяет улучшить противоопухолевый эффект и может быть применено для лечения таких заболеваний, как аденокарцинома, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарцинома, рак прямой и ободочной кишки, лимфома, рак пищевода, глиома головного мозга, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркома, меланома, рак желудка, рак тимуса и рак эндометрия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий полипептид, содержащий по меньшей мере одну комплементарность-определяющую область (CDR) варибельной области тяжелой цепи (VH) антитела, где VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

2. Антигенсвязывающий полипептид по п. 1, где VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

3. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1-2, содержащий VH, где VH содержит комплементарность-определяющую область 1 тяжелой цепи (HCDR1), комплементарность-определяющую область 2 тяжелой цепи (HCDR2), и комплементарность-определяющую область 3 тяжелой цепи (HCDR3), и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

4. Антигенсвязывающий полипептид по п. 3, где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

5. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-4, где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

6. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-5, где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

7. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-6, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

8. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-7, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

9. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-8, где VH включает: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

10. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-9, где VH включает:

i) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; или

ii) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

11. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-10, где VH содержит каркасную область 1 тяжелой цепи (HFR1), каркасную область 2 тяжелой цепи (HFR2), каркасную область 3 тяжелой цепи (HFR3) и каркасную область 4 тяжелой цепи (HFR4), а

HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

12. Антигенсвязывающий полипептид по п. 11, где HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

13. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 11-12, где HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

14. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 11-13, где HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17.

15. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 11-14, где HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

16. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 11-15, где HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

17. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 11-16, где HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

18. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 11-17, где HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24.

19. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-18, где VH содержит HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4, а HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4 выбраны из:

i) HFR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, HFR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, HFR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и HFR4, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

ii) HFR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, HFR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, HFR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и HFR4, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24;

iii) HFR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, HFR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, HFR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и HFR4, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; и

vi) HFR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, HFR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, HFR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и HFR4, содержащей аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 24.

20. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-19, где VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

21. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 3-20, где VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

22. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1-21, где антигенсвязывающий полипептид содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

23. Антигенсвязывающий полипептид по п. 22, где антитело содержит моноклональное антитело, поликлональное антитело, димер, полимер, мультиспецифическое антитело, интактное антитело, фрагмент антитела, человеческое антитело, гуманизованное антитело или химерное антитело.

24. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 22-23, где антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv) или однодоменное антитело (VHH).

25. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий нацеливающую группу, где нацеливающая группа содержит антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1-24.

26. Химерный антигенный рецептор по п. 25, где нацеливающая группа содержит VHH.

27. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-26, содержащий трансмембранный домен, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD8A, CD8B, CD28, CD3ε (CD3e), 4-1BB, CD4, CD27, CD7, PD-1, TRAC, TRBC, CD3ζ, CTLA-4, LAG-3, CD5, ICOS, OX40, NKG2D, 2B4 (CD244), FcεRIγ, BTLA, CD30, GITR, HVEM, DAP10, CD2, NKG2C, LIGHT, DAP12, CD40L (CD154), TIM1, CD226, DR3, CD45, CD80, CD86, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64 и SLAM.

28. Химерный антигенный рецептор по п. 27, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен, происходящий от CD8A.

29. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 27-28, где трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 42 - SEQ ID NO: 90.

30. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-29, содержащий внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен, где внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD28, CD137, CD27, CD2, CD7, CD8A, CD8B, OX40, CD226, DR3, SLAM, CDS, ICAM-1, NKG2D, NKG2C, B7H3, 2B4, FcεRIγ, BTLA, GITR, HVEM, DAP10, DAP12, CD30, CD40, CD40L, TIM1, PD-1, LFA-1, LIGHT, JAML, CD244, CD100, ICOS, CD40 и MyD88.

31. Химерный антигенный рецептор по п. 30, где внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен происходит от костимулирующего сигнального домена 4-1BB.

32. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 30-31, где внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 91 - SEQ ID NO: 123.

33. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-32, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, где внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, происходящий от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD3 ζ , CD3 δ , CD3 γ , CD3 ϵ , CD79a, CD79b, Fc ϵ RI γ , Fc ϵ RI β , Fc γ RIIIa, вируса лейкоза крупного рогатого скота gp30, вируса Эпштейна-Барра (EBV) LMP2A, вируса иммунодефицита обезьян PBj14 Nef, DAP10, DAP-12, и домен, содержащий по меньшей мере один ITAM.

34. Химерный антигенный рецептор по п. 33, где внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен, происходящий от CD3 ζ .

35. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 33-34, где внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 124 - SEQ ID NO: 134.

36. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 27-35, содержащий шарнирную область между нацеливающим фрагментом и трансмембранным доменом, где шарнирная область содержит шарнирную область, происходящую от одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из: CD28, IgG1, IgG4, IgD, 4-1BB, CD4, CD27, CD7, CD8A, PD-1, ICOS, OX40, NKG2D, NKG2C, Fc ϵ RI γ , BTLA, GITR, DAP10, TIM1, SLAM, CD30 и LIGHT.

37. Химерный антигенный рецептор по п. 36, где шарнирная область содержит шарнирную область, происходящую от CD8A.

38. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 36-37, где шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 135 - SEQ ID NO: 156.

39. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-38, где ненацеливающий фрагмент химерного антигенного рецептора содержит трансмембранный домен молекулы CD8A, шарнирную область CD8A, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB и внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ .

40. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-39, где ненацеливающий фрагмент химерного антигенного рецептора содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

41. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-40, дополнительно содержащий фрагмент сигнального пептида, где С-конец фрагмента сигнального пептида связан с N-концом нацеливающего фрагмента.

42. Химерный антигенный рецептор по п. 41, где фрагмент сигнального пептида содержит фрагмент сигнального пептида CD8A.

43. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 41-42, где фрагмент сигнального пептида содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31.

44. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-43, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35.

45. Одна или несколько выделенных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1-24 или химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-44.

46. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39.

47. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46.

48. Вектор по п. 47, где вектор представляет собой экспрессионный вектор.

49. Вектор по любому из пп. 47-48, где вектор выбран из ДНК-вектора, РНК-вектора, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора и ретровирусного вектора.

50. Клетка i) содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46 или вектор по любому из пп. 47-49; и/или ii) экспрессирующая антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1-24 или химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-44.

51. Иммунная эффекторная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46 или вектор по любому из пп. 47-49, и/или экспрессирующая CAR по любому из пп. 25-44.

52. Иммунная эффекторная клетка по п. 51, где иммунная эффекторная клетка содержит человеческую клетку.

53. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 51-52, где иммунная эффекторная клетка содержит Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (NK-клетку), макрофаг, NKT-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови.

54. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 51-53, где иммунная эффекторная клетка содержит аутологичную или неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

55. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 51-54, где иммунная эффекторная клетка содержит модифицированную иммунную эффекторную клетку.

56. Иммунная эффекторная клетка по п. 55, где модифицированная иммунная эффекторная клетка содержит клетку, которая уменьшает иммунное отторжение,

вызванное аллогенной клеточной терапией.

57. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-56, где функции Т-клеточного антигенного рецептора (TCR) и главных комплексов гистосовместимости (МНСI, МНСII) в модифицированной иммунной эффекторной клетке ингибируются в Т-клетке.

58. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-57, где модификация включает снижение экспрессии и/или активности одного или более генов, ассоциированных с иммунным отторжением.

59. Иммунная эффекторная клетка по п. 58, где ген, ассоциированный с иммунным отторжением, выбран из одной или нескольких из нижеследующих групп: TRAC, TRBC, HLA-A, HLA-B, B2M и СИТА.

60. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-59, где экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в модифицированной иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой.

61. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-60, где экспрессия и/или активность гена СИТА в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой.

62. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-61, где экспрессия и/или активность гена B2M в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой.

63. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-62, где экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в модифицированной иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа. .

64. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-63, где экспрессия и/или активность гена B2M в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

65. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-64, где экспрессия и/или активность гена СИТА в модифицированной иммунной эффекторной клетке не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

66. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-65, где снижение уровня экспрессии и/или активности гена включает снижение экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или снижение экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

67. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-66, где модификация включает нокаут гена, мутацию гена и/или сайленсинг гена.

68. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-67, где модификация включает нокаут любого из двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной эффекторной клетке.

69. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-68, где модификация включает нокаут двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной

клетке.

70. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-69, где модификация включает нокаут экзона гена TRAC и нокаут экзона гена HLA-A в иммунной клетке.

71. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-70, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку одного или более веществ, выбранных из группы, состоящей из: антисмысловой РНК, киРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

72. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 55-71, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

73. Иммунная эффекторная клетка по п. 72, где модификация дополнительно включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

74. Иммунная эффекторная клетка по п. 73, где оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена TRAC, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 157 - SEQ ID NO: 171.

75. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 72-74, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена HLA-A.

76. Иммунная эффекторная клетка по п. 75, где оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 172 - SEQ ID NO: 212.

77. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 72-76, где модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

78. Иммунная эффекторная клетка по п. 77, где фермент Cas содержит белок Cas9.

79. Иммунная эффекторная клетка по п. 71, где антисмысловая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 213 - SEQ ID NO: 216.

80. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 51-79, где иммунная эффекторная клетка представляет собой клетку, гомозиготную по HLA-B.

81. Иммунная эффекторная клетка по п. 80, где гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, гомозиготу HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B*54 и гомозиготу HLA-B*55.

82. Иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 51-81, где иммунная эффекторная клетка представляет собой клетку, гомозиготную или гетерозиготную по HLA-A.

83. Иммунная эффекторная клетка по п. 82, где гомозигота или гетерозигота HLA-A включает гомозиготу HLA-A*02, гомозиготу HLA-A*11, гетерозиготу HLA-A*02/A*11 или гомозиготу HLA-A*24. .

84. Способ получения иммунной эффекторной клетки, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46 или вектора по любому из пп. 47-49 в иммунную эффекторную клетку.

85. Способ по п. 84, дополнительно включающий: модификацию иммунной эффекторной клетки до/после введения молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46 или вектора по любому из пп. 47-49 в иммунную эффекторную клетку, где модификация включает снижение экспрессии и/или активности одного или более генов, ассоциированных с иммунным отторжением.

86. Способ по п. 85, где ген, ассоциированный с иммунным отторжением, выбран из одной или нескольких из нижеследующих групп: TRAC, TRBC, HLA-A, HLA-B, B2M и СИТА.

87. Способ по любому из пп. 85-86, где экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующего гена в соответствующей немодифицированной клетке.

88. Способ по любому из пп. 85-87, где экспрессия и/или активность гена СИТА не подавляется по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующего гена в соответствующей немодифицированной клетке.

89. Способ по любому из пп. 85-88, где экспрессия и/или активность гена B2M не снижается по сравнению с экспрессией и/или активностью соответствующего гена в соответствующей немодифицированной клетке.

90. Способ по любому из пп. 85-89, где экспрессия и/или активность гена TRAC и гена HLA-A в иммунной эффекторной клетке снижена по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

91. Способ по любому из пп. 85-90, где экспрессия и/или активность гена СИТА не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

92. Способ по любому из пп. 85-91, где экспрессия и/или активность гена B2M не снижается по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

93. Способ по любому из пп. 85-92, где снижение уровня экспрессии и/или активности гена включает снижение экспрессии и/или активности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей ген; и/или снижение экспрессии и/или активности белкового продукта, кодируемого этим геном.

94. Способ по любому из пп. 85-93, где модификация включает нокаут гена, мутацию гена и/или сайленсинг гена.

95. Способ по любому из пп. 85-94, где модификация включает нокаут любого из двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной эффекторной клетке.

96. Способ по любому из пп. 85-95, где модификация включает нокаут двух аллелей TRAC и нокаут любого из двух аллелей HLA-A в иммунной клетке.

97. Способ по любому из пп. 85-96, где модификация включает нокаут экзона гена TRAC и нокаут экзона гена HLA-A в иммунной клетке.

98. Способ по любому из пп. 85-97, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку одного или более веществ, выбранных из группы, состоящей из: антисмысловой РНК, киРНК, кшРНК и системы CRISPR/Cas9.

99. Способ по любому из пп. 85-98, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку системы CRISPR/Cas9.

100. Способ по п. 99, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена TRAC.

101. Способ по п. 100, где оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена TRAC, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 157 - SEQ ID NO: 171.

102. Способ по любому из пп. 99-101, где модификация включает введение в иммунную эффекторную клетку оцрРНК, нацеленной на экзонную часть гена HLA-A.

103. Способ по п. 102, где оцрРНК, нацеленная на экзонную часть гена HLA-A, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 172 - SEQ ID NO: 212.

104. Способ по любому из пп. 99-103, где модификация дополнительно включает введение в клетку фермента Cas.

105. Способ по п. 104, где фермент Cas содержит белок Cas9.

106. Способ по п. 98, где антисмысловая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-SEQ ID NO: 216.

107. Способ по любому из пп. 84-106, где иммунная эффекторная клетка содержит человеческую клетку.

108. Способ по любому из пп. 84-107, где иммунная эффекторная клетка содержит Т-клетку, В-клетку, природную клетку-киллер (НК-клетку), макрофаг, НКТ-клетку, моноцит, дендритную клетку, гранулоцит, лимфоцит, лейкоцит и/или мононуклеарную клетку периферической крови.

109. Способ по любому из пп. 84-108, где иммунная эффекторная клетка содержит аутологичную или неаутологичную иммунную эффекторную клетку.

110. Способ по любому из пп. 84-109, где клетка представляет собой клетку, гомозиготную по HLA-B.

111. Способ по п. 110, где гомозигота HLA-B включает гомозиготу HLA-B*40, гомозиготу HLA-B*15, гомозиготу HLA-B*46, гомозиготу HLA-B*13, гомозиготу HLA-B*51, гомозиготу HLA-B*58, гомозиготу HLA-B*07, гомозиготу HLA-B*35, гомозиготу HLA-B*44, гомозиготу HLA-B*52, гомозиготу HLA-B*57, гомозиготу HLA-B*54 и гомозиготу HLA-B*55.

112. Способ по любому из пп. 84-111, где клетка представляет собой клетку, гомозиготную или гетерозиготную по HLA-A.

113. Способ по п. 112, где гомозигота или гетерозигота HLA-A включает гомозиготу HLA-A*02, гомозиготу HLA-A*11, гетерозиготу HLA-A*02/A*11 или гомозиготу HLA-A*24.

114. Применение химерного антигенного рецептора по любому из пп. 25-44, выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46, вектора по любому из пп. 47-49, клетки по п. 50, или иммунной эффекторной клетки по любому из пп. 51-83 при получении CAR-T-клетки.

115. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1-24, химерный антигенный рецептор по любому из пп. 25-44, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46, вектор по любому из пп. 47-49, клетку по п. 50 и/или иммунную эффекторную клетку по любому из пп. 51-83, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

116. Применение антигенсвязывающего полипептида по любому из пп. 1-24, химерного антигенного рецептора по любому из пп. 25-44, выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46, вектора по любому из пп. 47-49, клетки по п. 50 и иммунной эффекторной клетки по любому из пп. 51-83, и/или фармацевтической композиции по п. 115 для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией В7Н3.

117. Применение по п. 116, где заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает заболевание или расстройство, ассоциированное с повышением уровня экспрессии В7Н3.

118. Применение по любому из пп. 116-117, где заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает рак.

119. Применение по п. 118, где рак включает аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак прямой и ободочной кишки, лимфому, рак пищевода, глиому головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркому, меланому, рак желудка, рак тимуса или рак эндометрия.

120. Применение антигенсвязывающего полипептида по любому из пп. 1-24, химерного антигенного рецептора по любому из пп. 25-44, выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46, вектора по любому из пп. 47-49, клетки по п. 50 и иммунной эффекторной клетки по любому из пп. 51-83, и/или фармацевтической композиции по п. 115 при получении лекарственного средства для лечения рака.

121. Применение по п. 120, где рак включает В7Н3-позитивный рак.

122. Применение по п. 122, где рак включает аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак прямой и ободочной кишки, лимфому, рак пищевода, глиому головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркому, меланому, рак желудка, рак тимуса или рак эндометрия.

123. Способ профилактики или лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией В7Н3, включающий введение индивидууму,

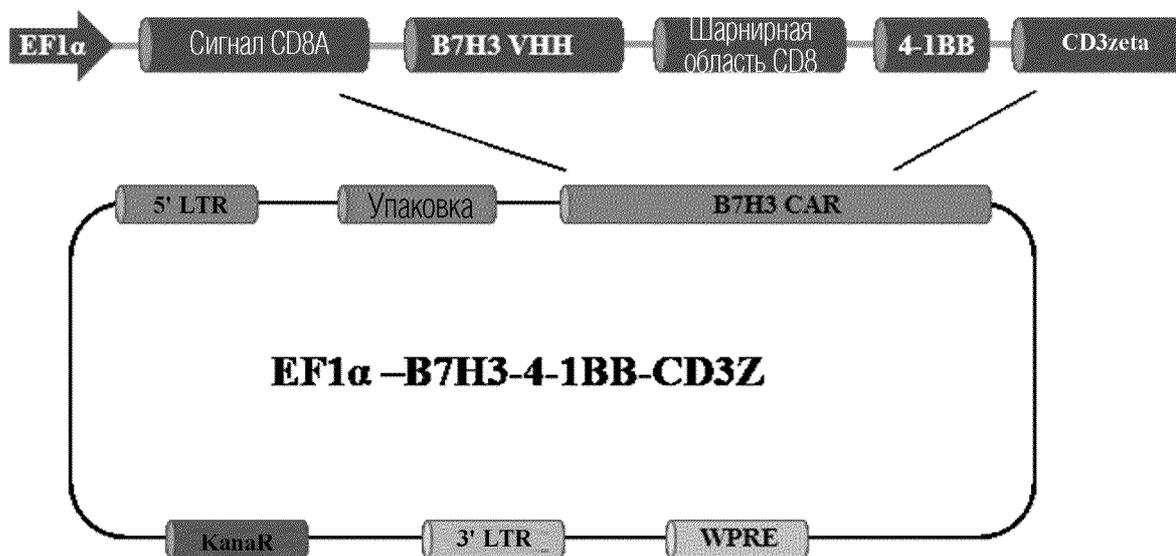
нуждающемуся в этом, эффективного количества антигенсвязывающего полипептида по любому из пп. 1-24, химерного антигенного рецептора по любому из пп. 25-44, выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-46, вектора по любому из пп. 47-49, клетки по п. 50 и иммунной эффекторной клетки по любому из пп. 51-83, и/или фармацевтической композиции по п. 115.

124. Способ по п. 124, где заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает заболевание или расстройство, ассоциированное с повышением уровня экспрессии В7Н3.

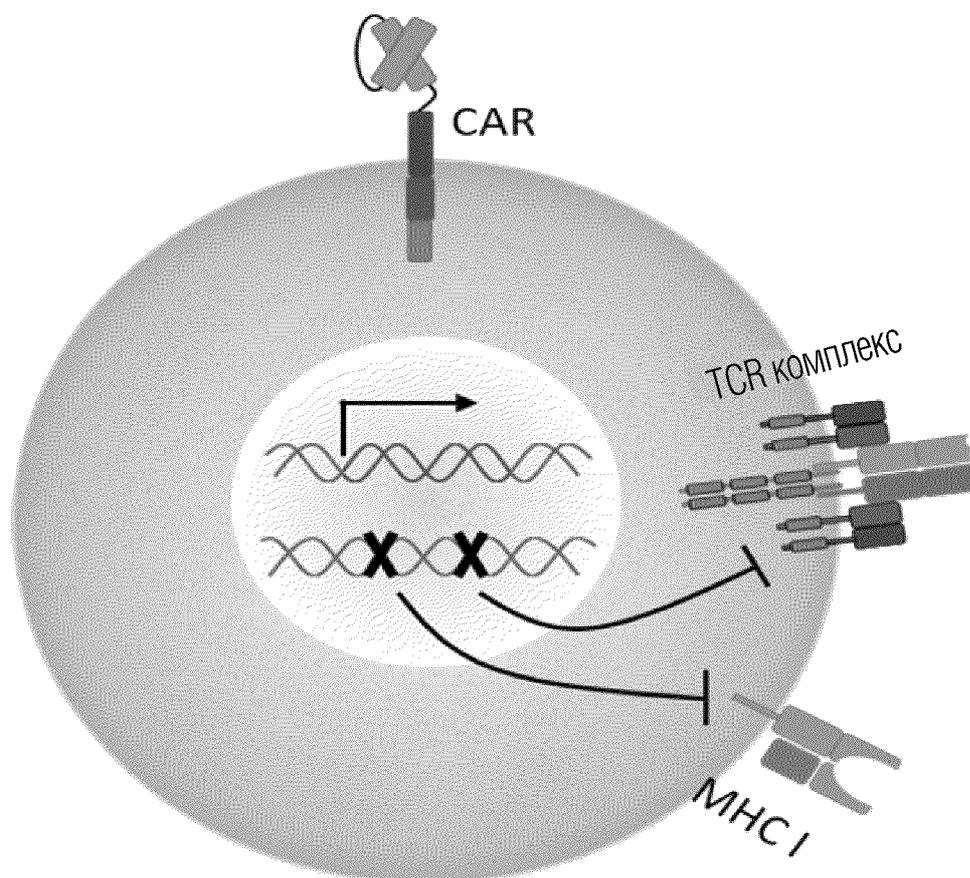
125. Способ по любому из пп. 124-125, где заболевание или расстройство, ассоциированное с экспрессией В7Н3, включает рак.

126. Способ по п. 126, где рак включает аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак прямой и ободочной кишки, лимфому, рак пищевода, глиому головного мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, саркому, меланому, рак желудка, рак тимуса или рак эндометрия.

По доверенности

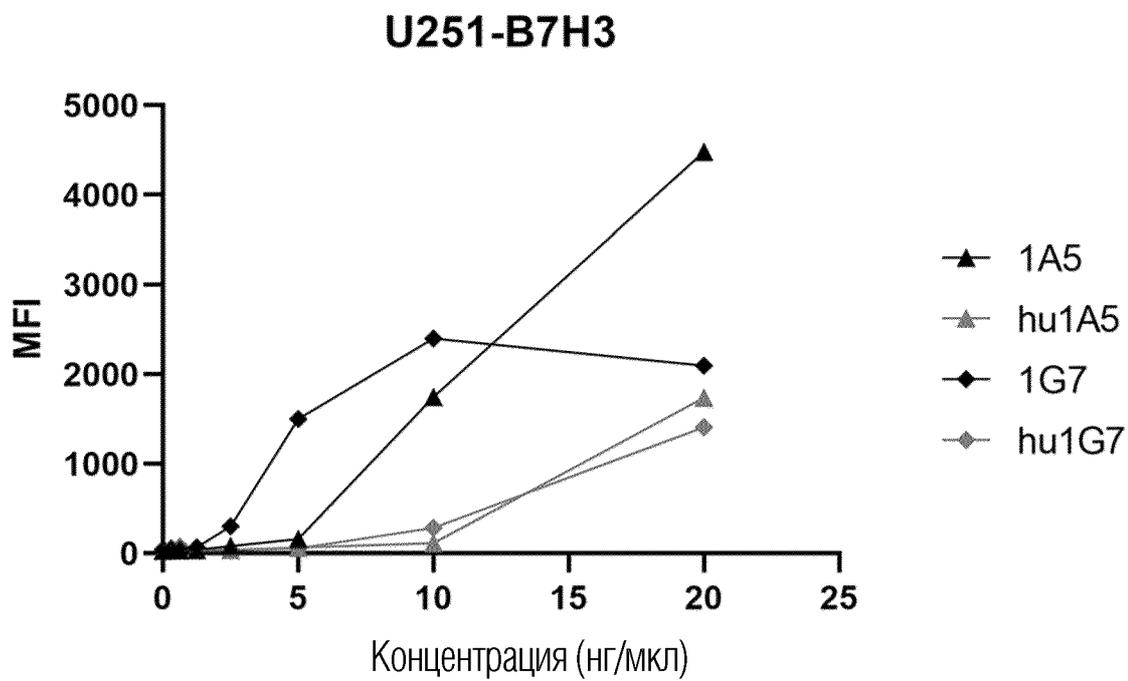


ФИГ. 1А



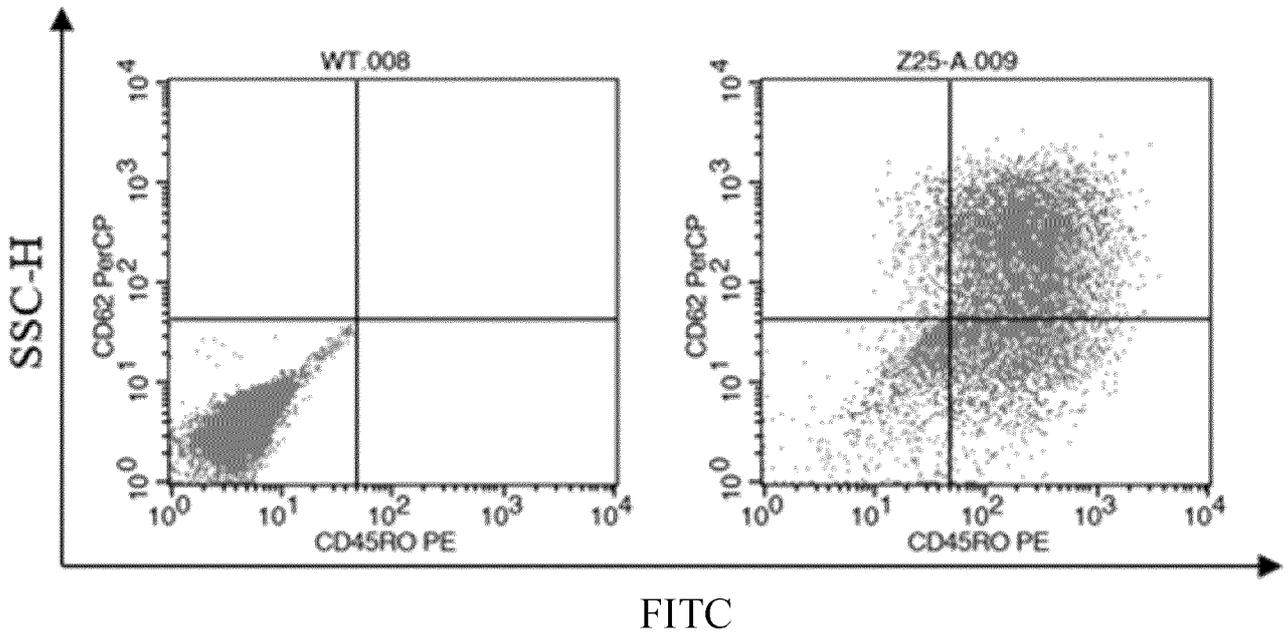
ФИГ. 1В

ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА



ФИГ. 2

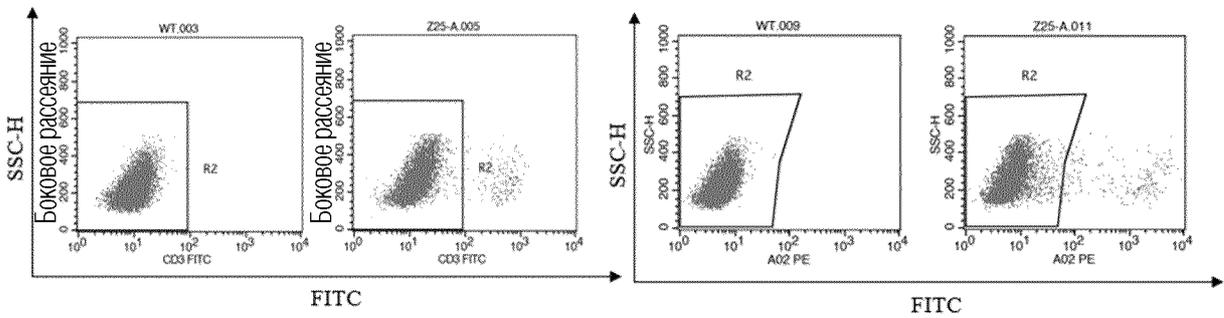
T-клетки памяти, 59,38%



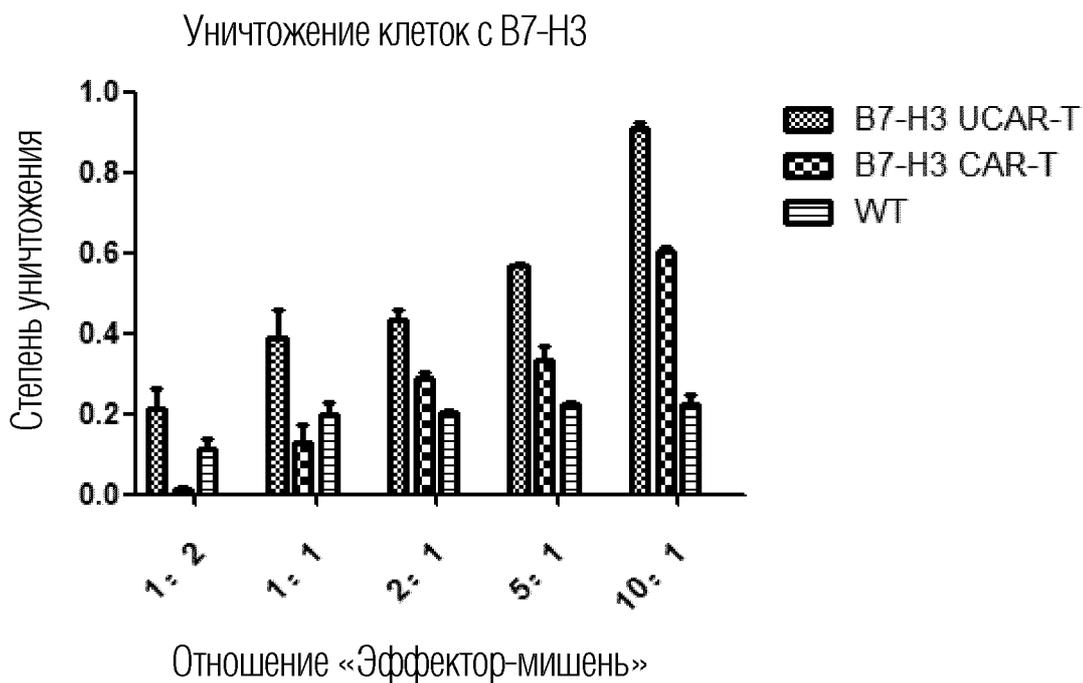
ФИГ. 4В

Эффективность нокаута TRAC, 97,44%

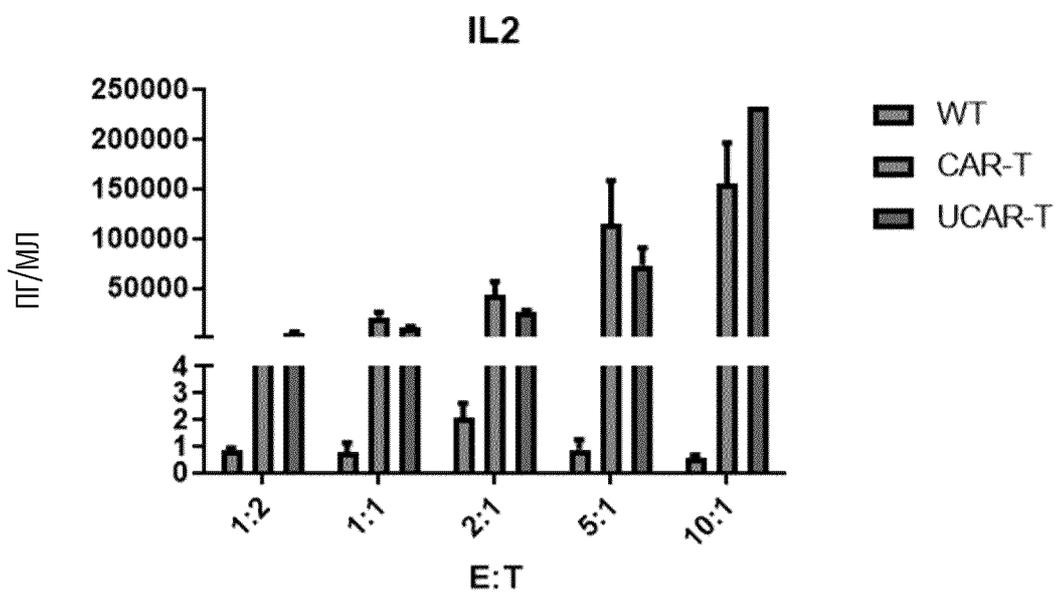
Эффективность нокаута HLA-A02, 96,61%



ФИГ. 4С

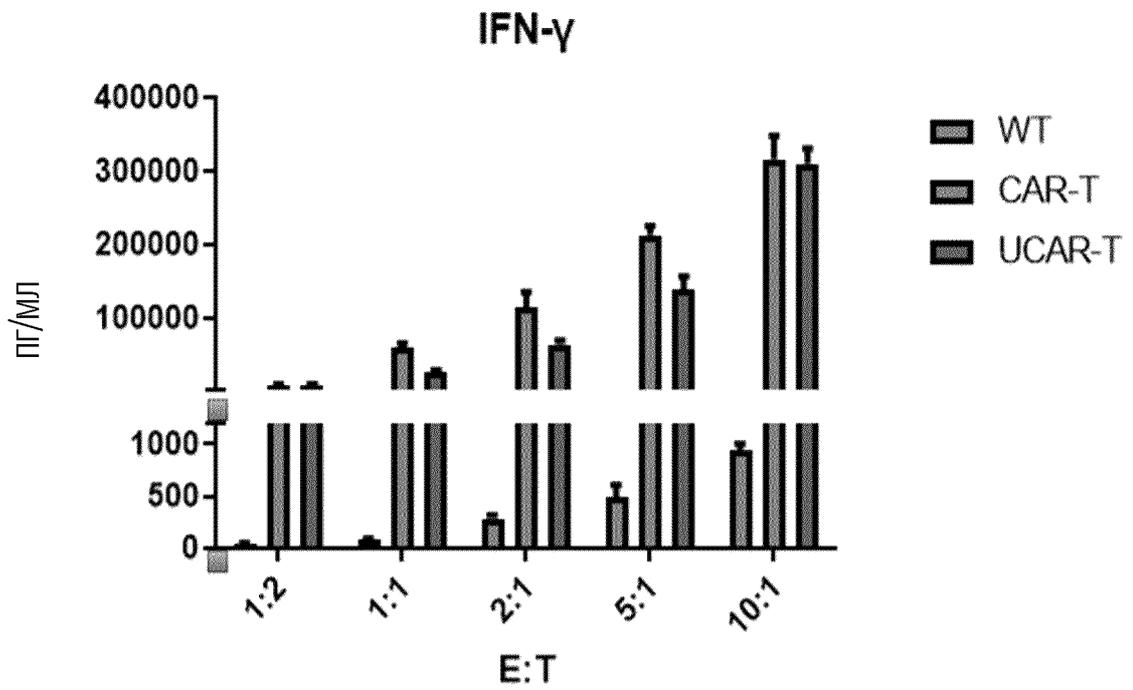


ФИГ. 5

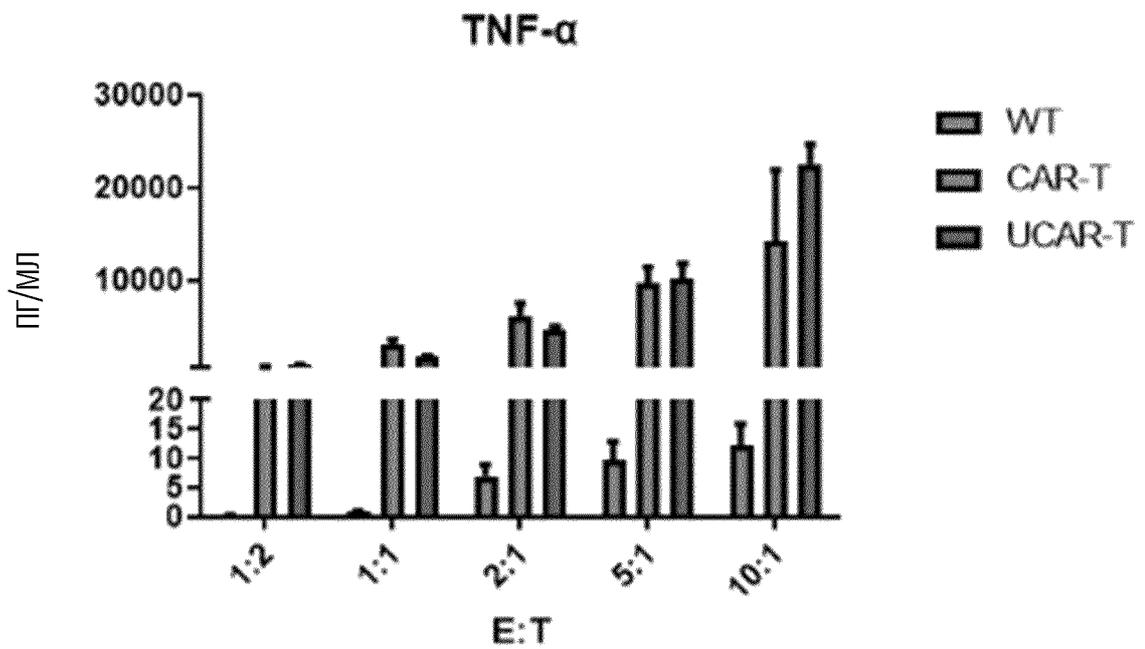


ФИГ. 6А

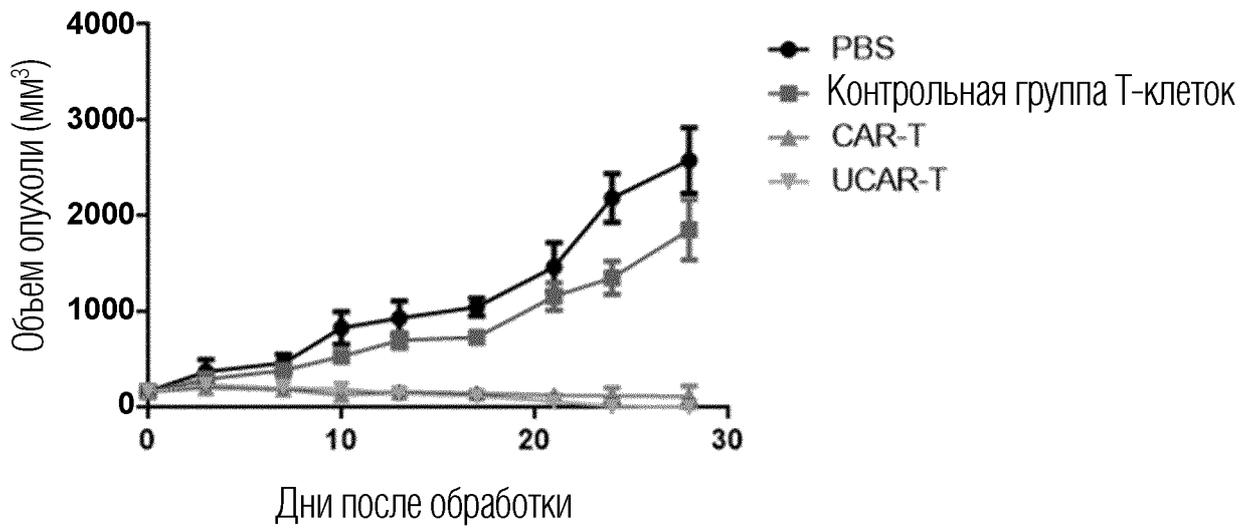
6/24



ΦΙΓ. 6B



ΦΙΓ. 6C



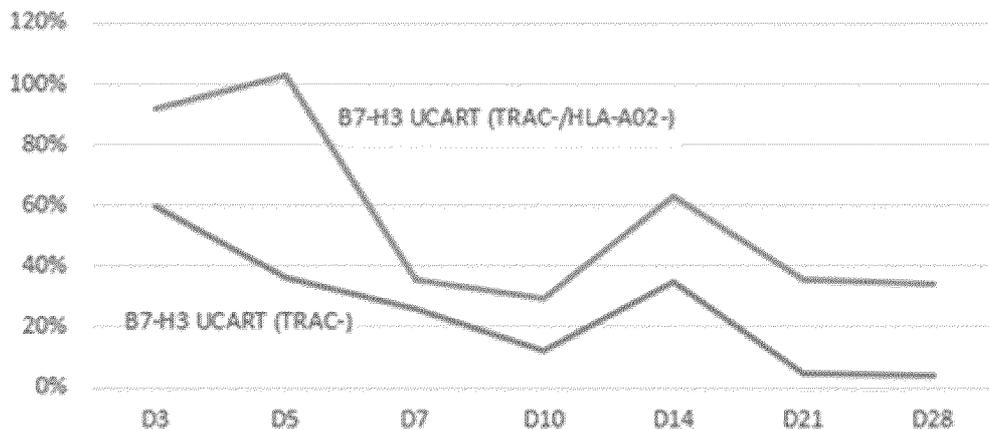
ФИГ. 7

Число копий (копий/100 нг)



ФИГ. 8А

Степень выживания CAR-T-клеток

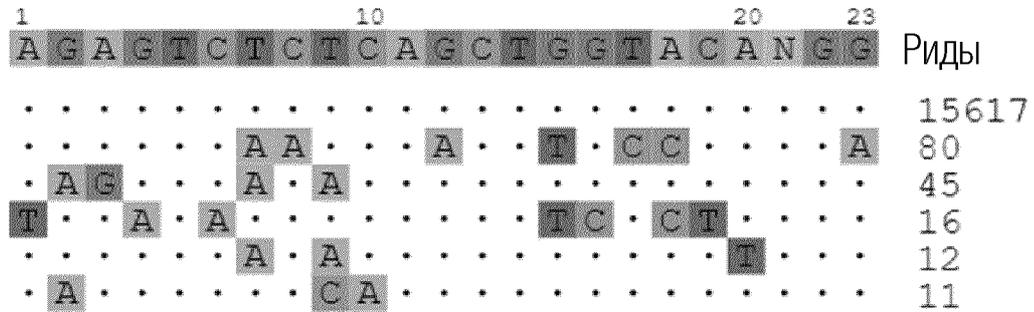


ФИГ. 8В

ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

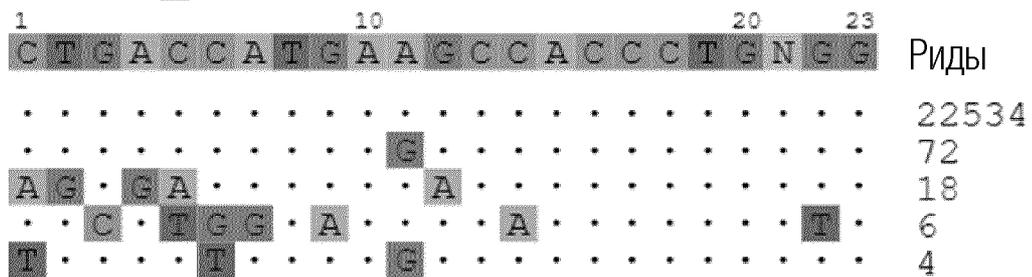
U3-10_1: TRAC

U3-10_1

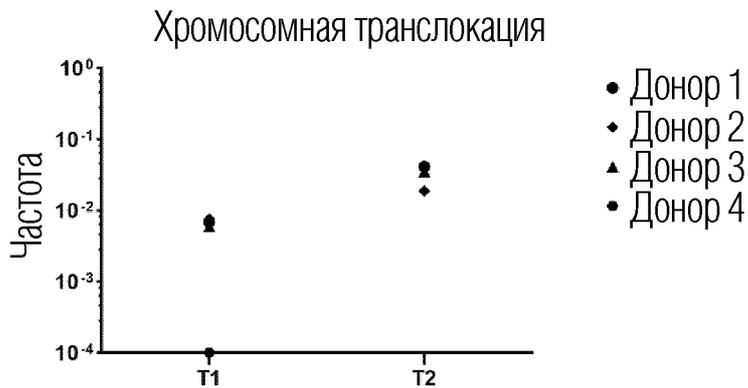


U3-10_2: HLA-A02

U3-10_2



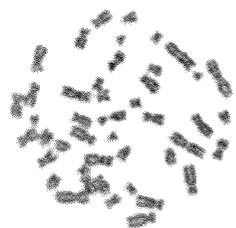
ФИГ. 9



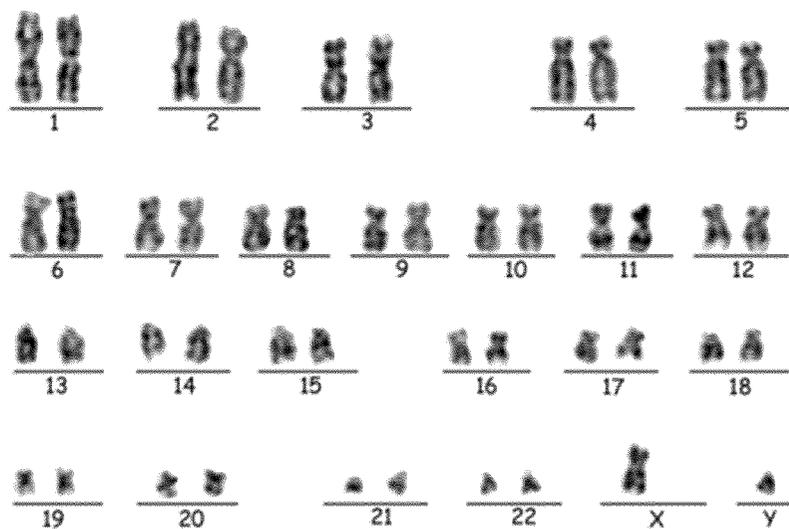
T1: верхняя цепь TRAC: верхняя цепь HLA-A02, связанные вместе
 T2: верхняя цепь TRAC: нижняя цепь HLA-A02, связанные вместе
 10⁻⁴: не детектировали

ФИГ. 10

Номер образца: A21-006-WT



ФИГ. 11

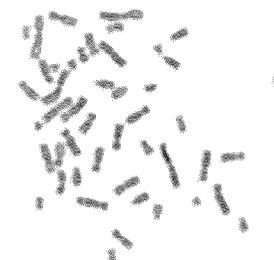


Результат анализа: 46,XY

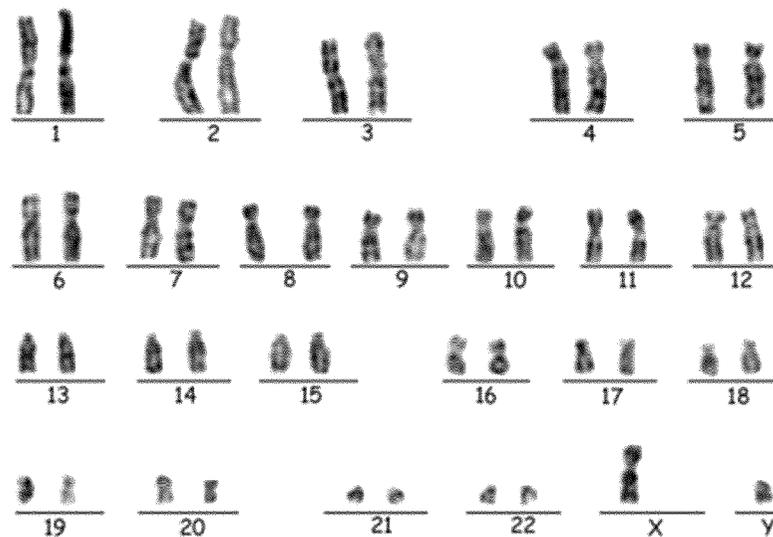
Дата анализа: 2022-04-18

Примечание: Хромосомные аномалии не наблюдались

Номер образца: A21-006-U



9/24

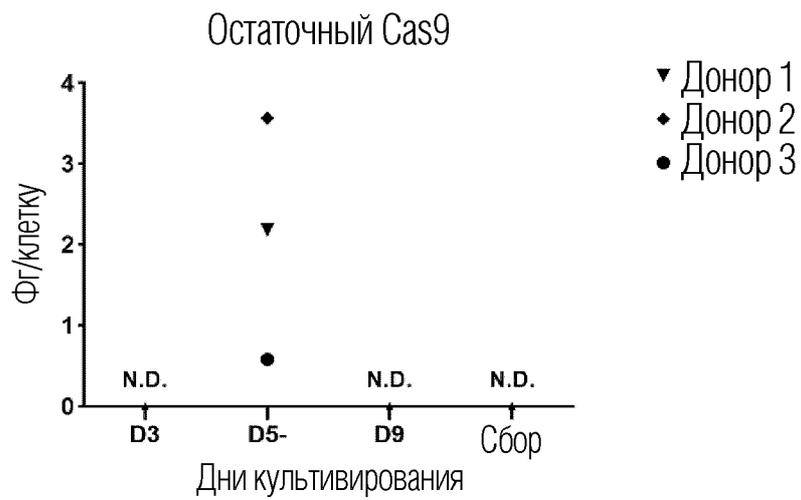


Результат анализа: 46,XY

Дата анализа: 2022-04-18

Примечание: Хромосомные аномалии не наблюдались

10/24

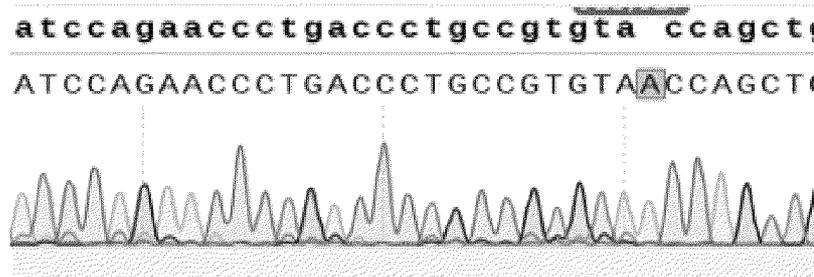


D3: День 3 до электропорации

D5: День 5 до буферного обмена и после электропорации

N.D.: Не детектировали

ФИГ. 12

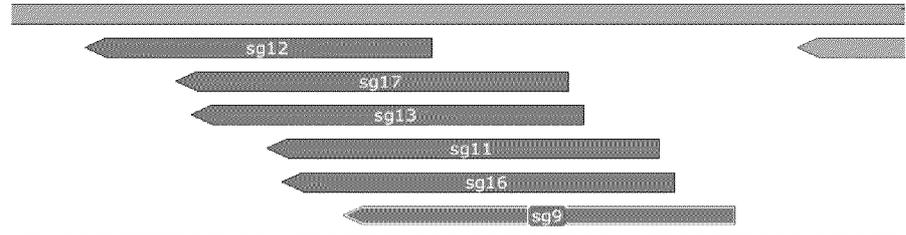


ФИГ. 13

11/24

t ccagaaccctgaccctgccgt gt a ccagctgagagactctaaatccagtga
a ggtcttgggactgggacggca ca t ggtcgactctctgagatttaggtcact

1 5 10 15
le Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asi

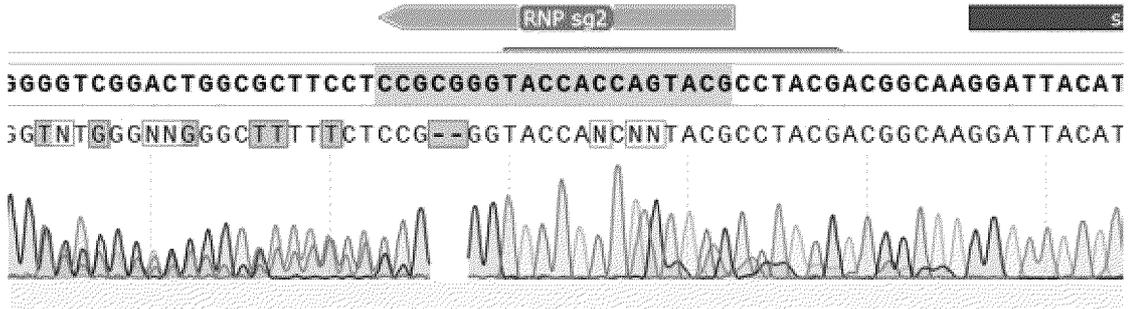


t ccagaaccctgaccctgccgt gt a ccagctgagagactctaaatccagtga
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGTCTA--A CCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGT GT AA~~CCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA~~
T CCAGAACCCTGACCCTG~~GCC~~ CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGT GT AA~~CCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA~~
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGT GTC~~A CTCTCTGACAGACTCTAAATTC~~
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGT GT AA~~CCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA~~
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGT GT ~~CCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA~~
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGT GT AA~~CCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA~~
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGT GT A ~~GCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA~~
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGT GT AA~~CCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA~~
T CCAGAACCCTGACCCTGCCGT GT A ~~AAATCCAGTGA~~
T CCAGAACCCTGACCCTGCC~~AGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA~~

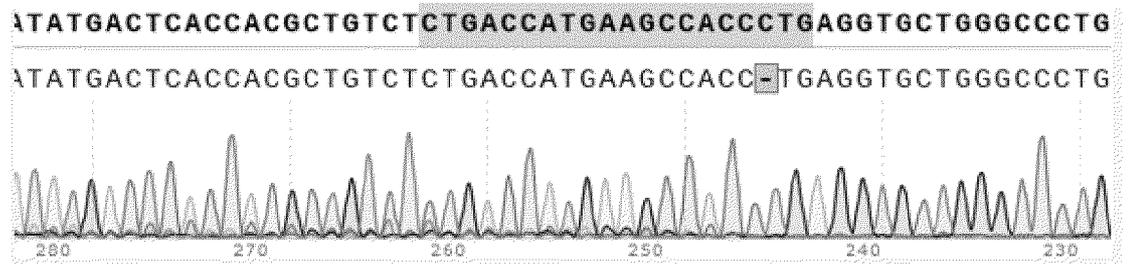
ФИГ. 14



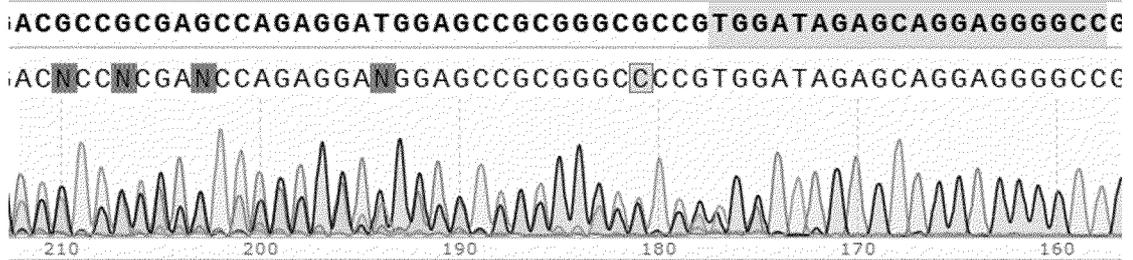
ФИГ. 15



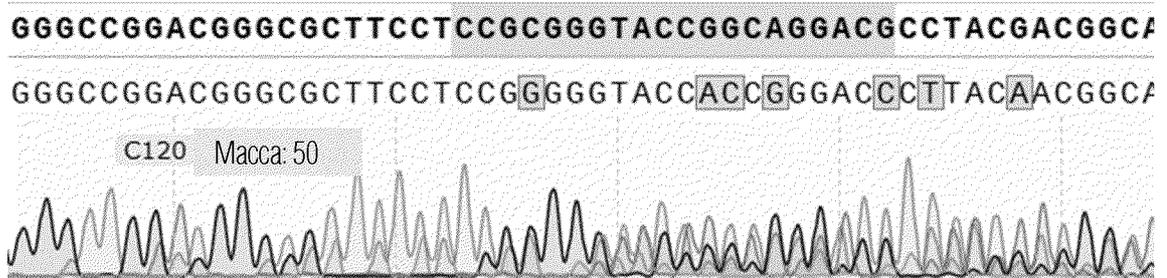
ФИГ. 16



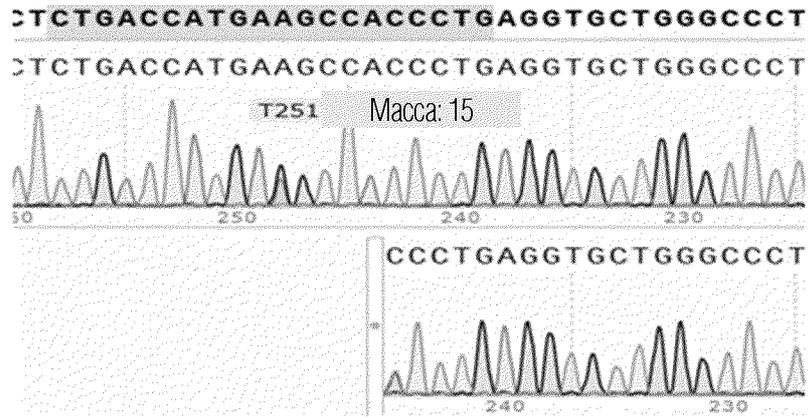
ФИГ. 17



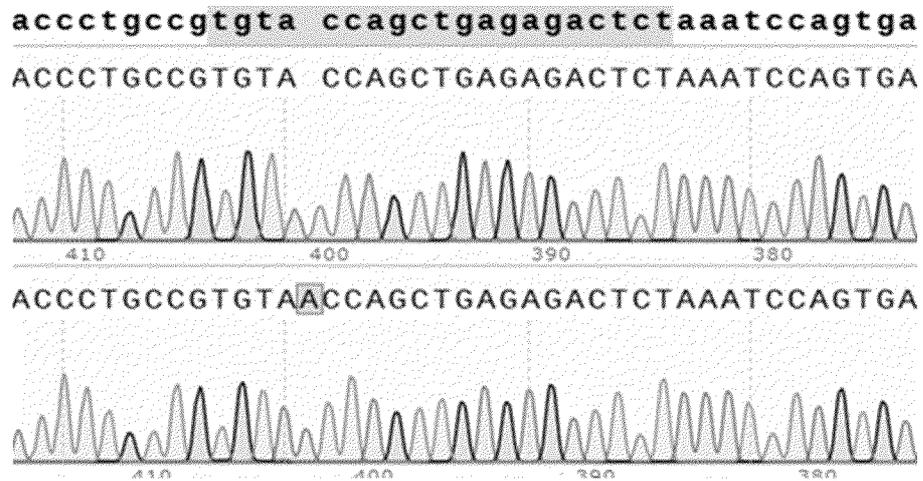
ФИГ. 18



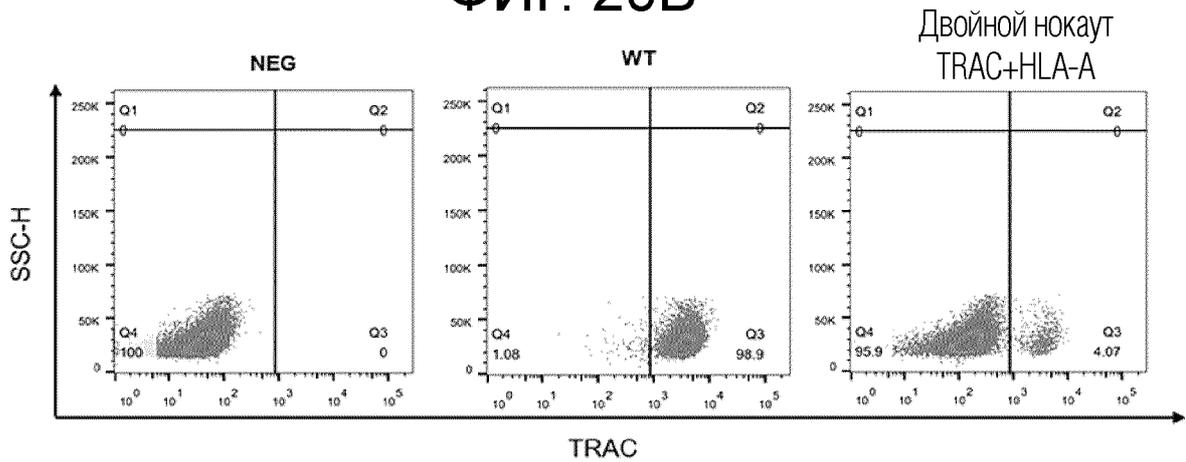
ФИГ. 19



ФИГ. 20А

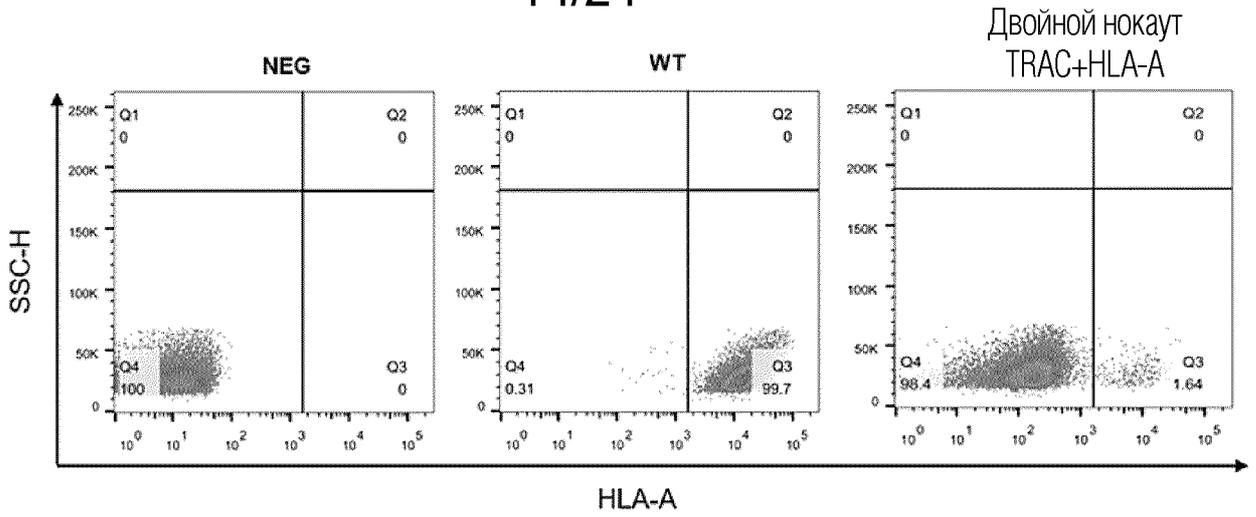


ФИГ. 20В

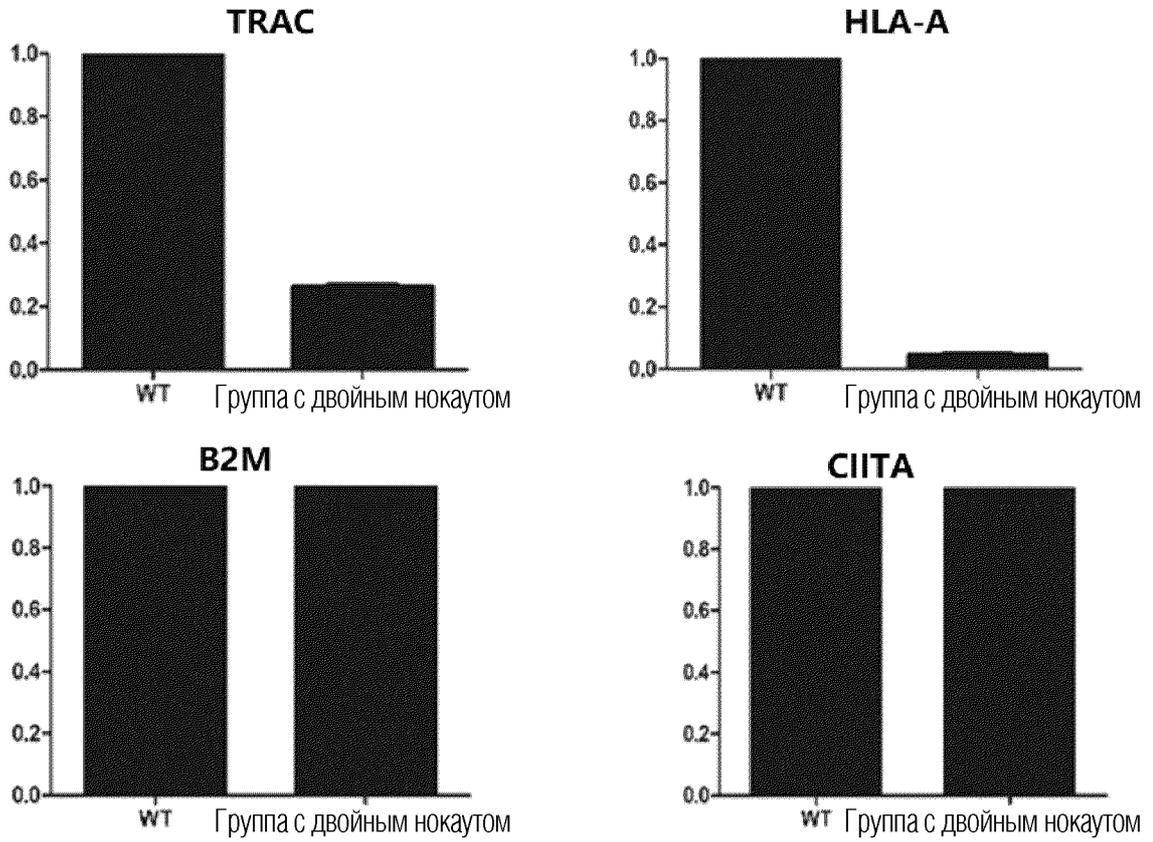


ФИГ. 21А

14/24

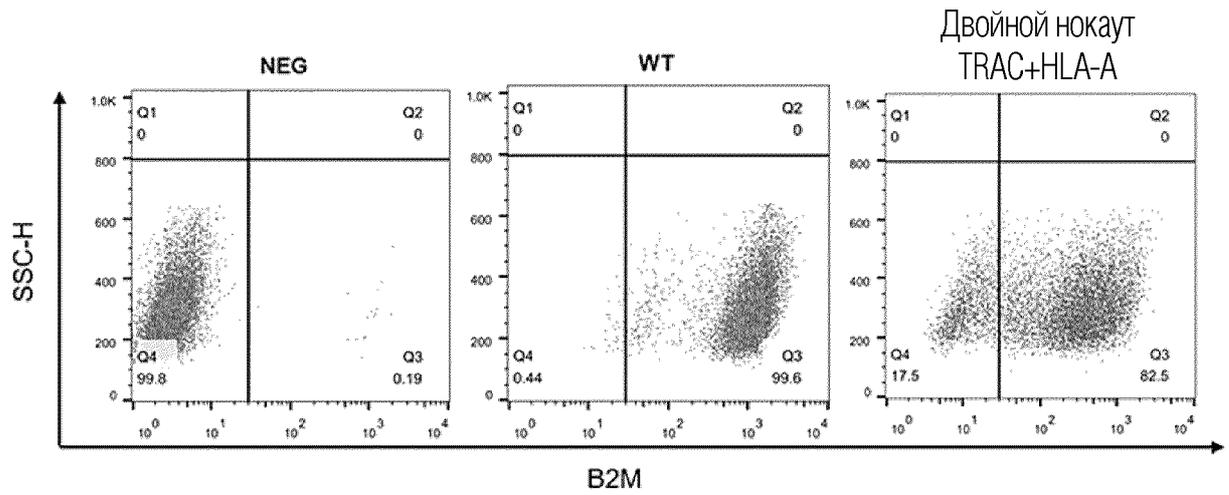


ФИГ. 21В

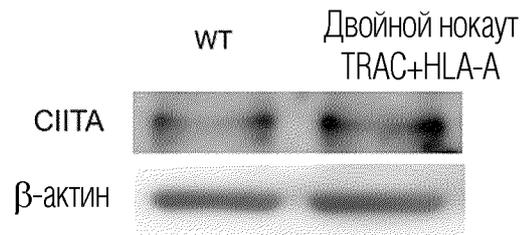


ФИГ. 22

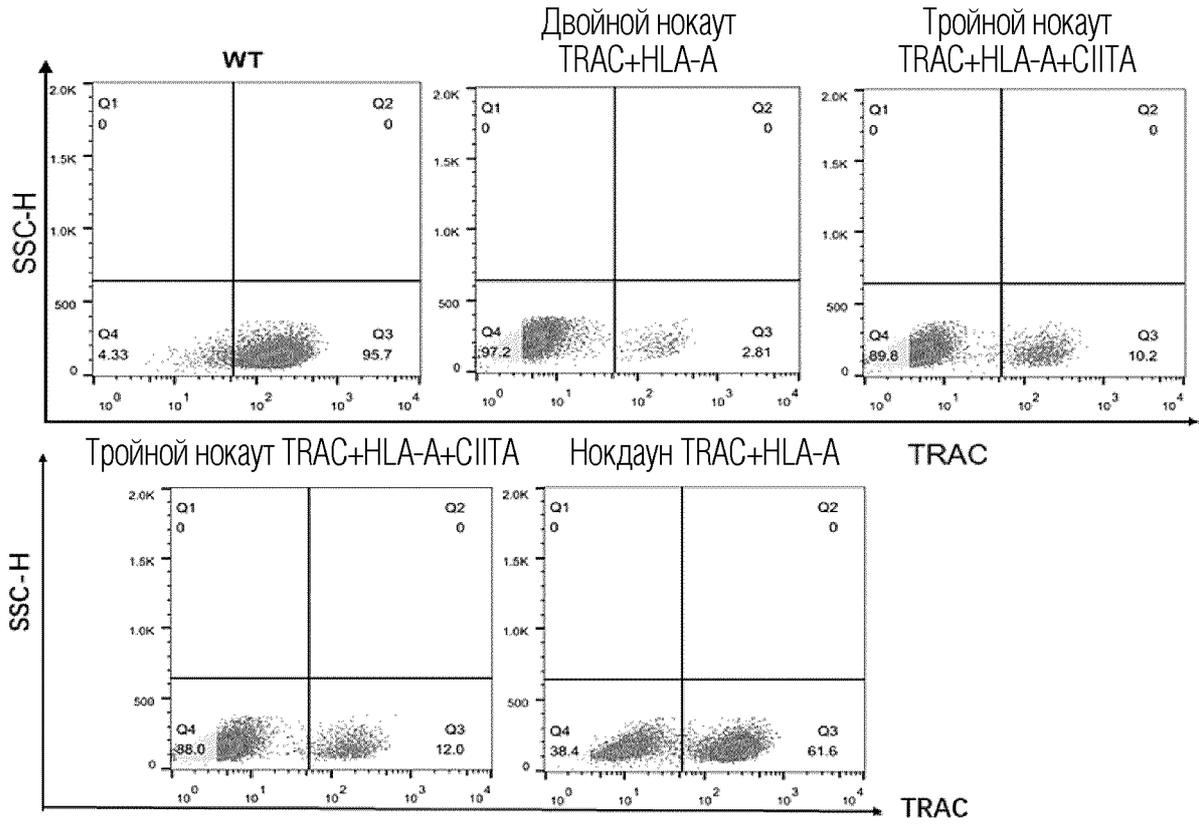
15/24



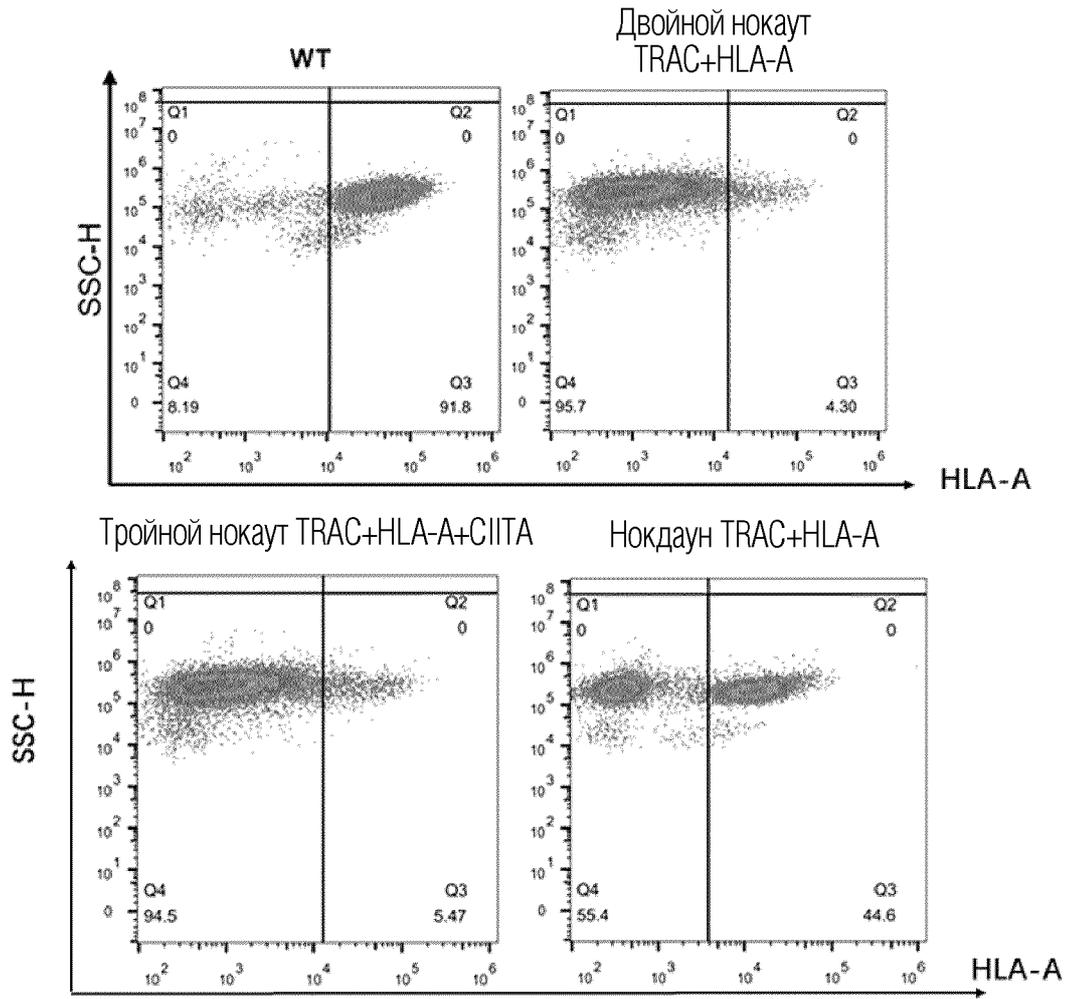
ФИГ. 23А



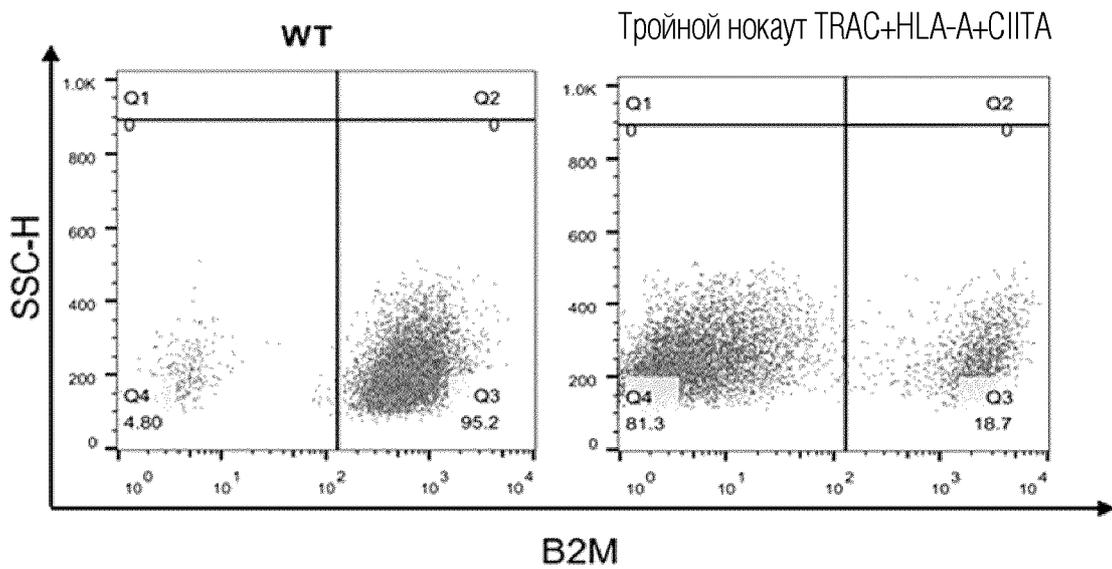
ФИГ. 23В



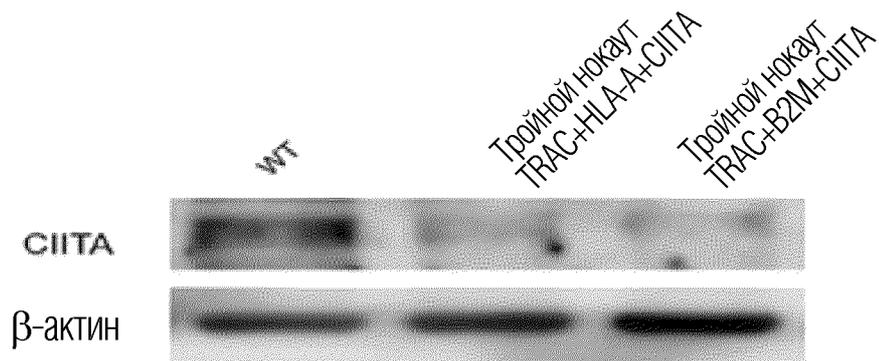
ФИГ. 24А



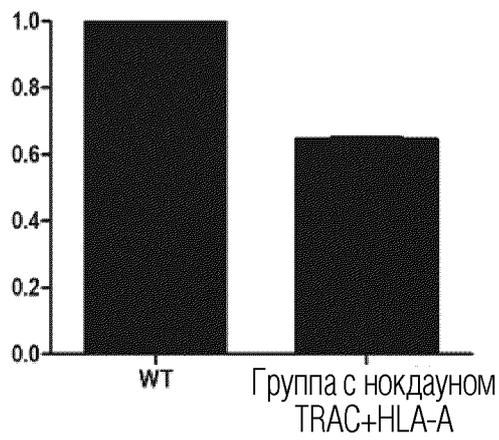
ФИГ. 24В



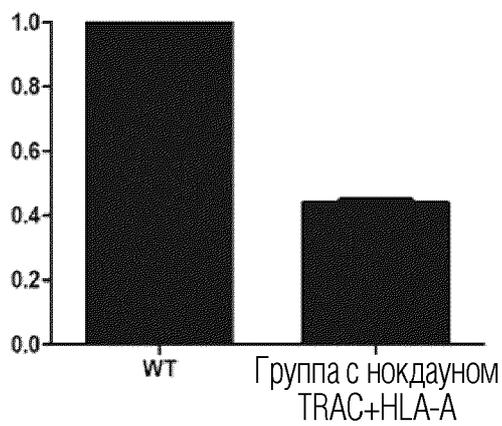
ФИГ. 24С



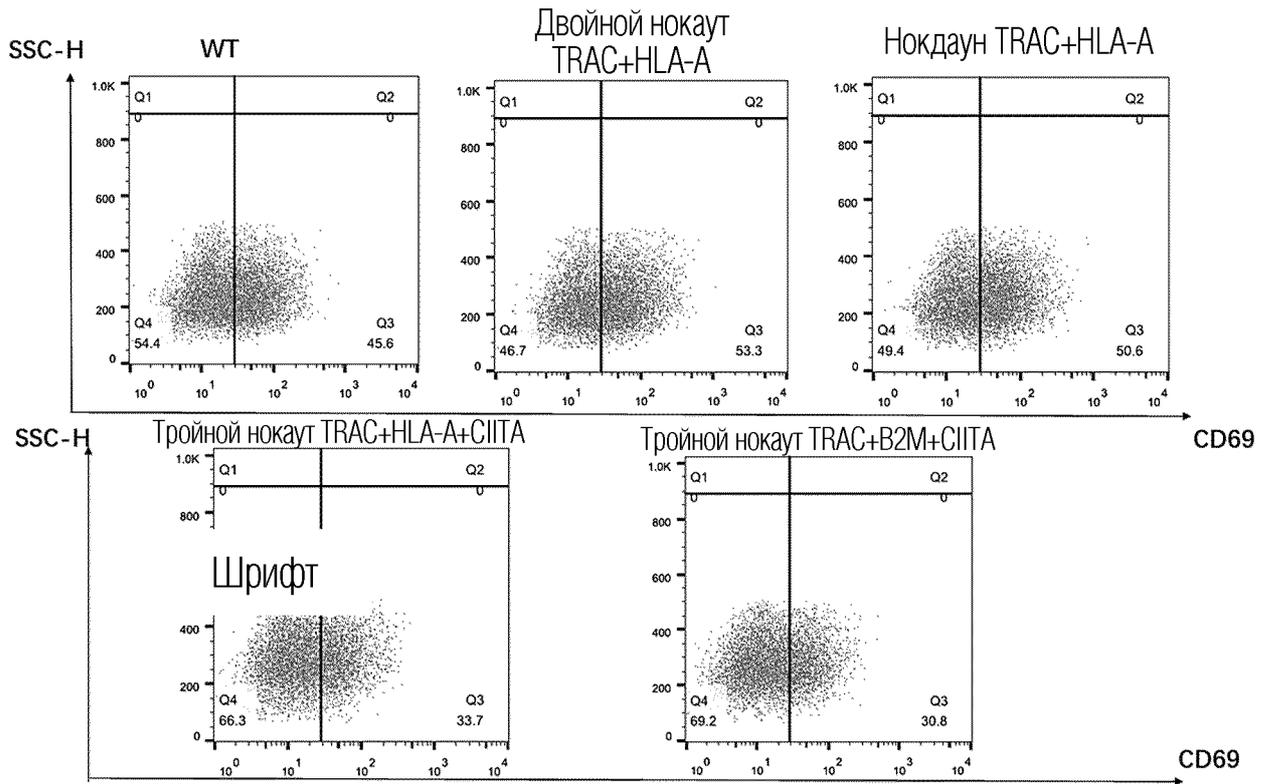
ФИГ. 24D



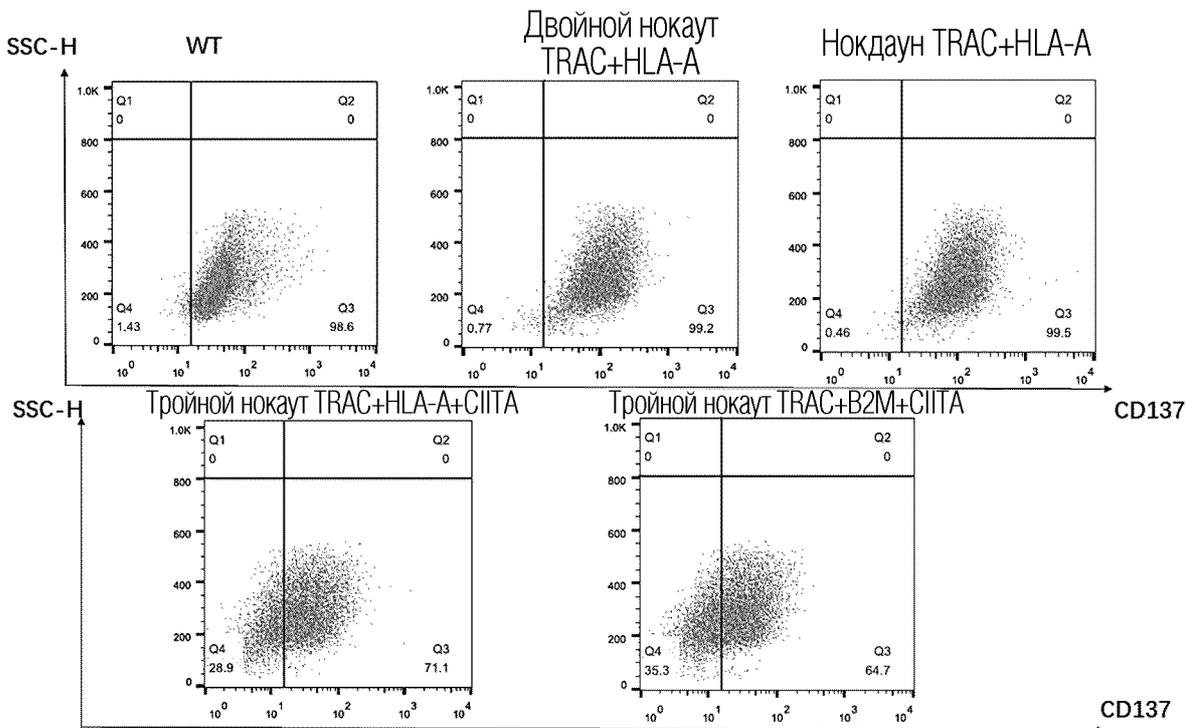
ФИГ. 25A



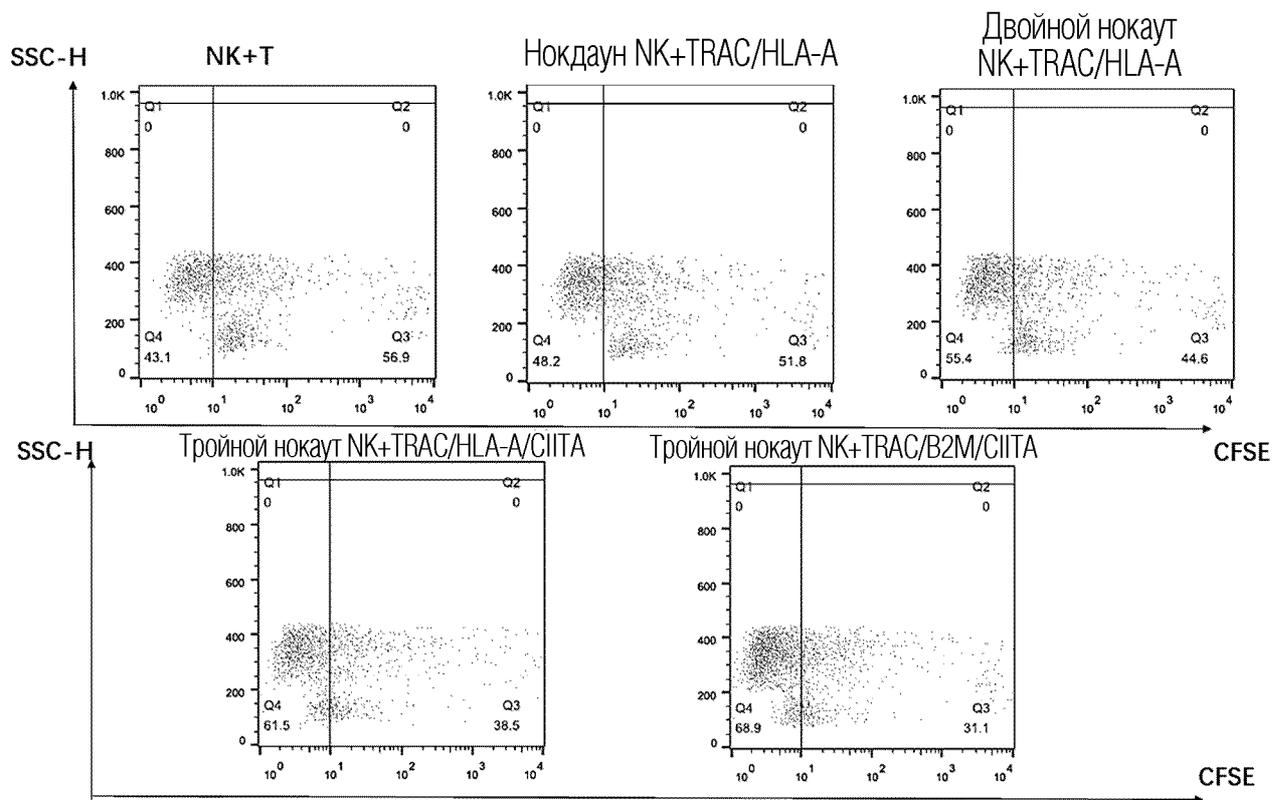
ФИГ. 25B



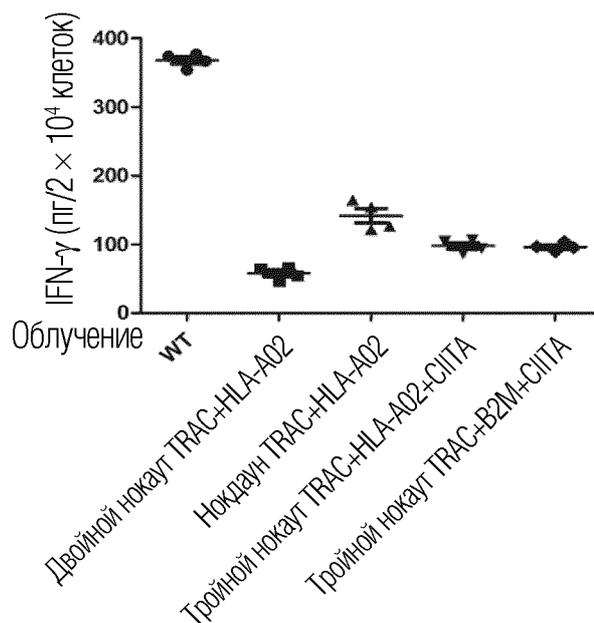
ФИГ. 26А



ФИГ. 26В

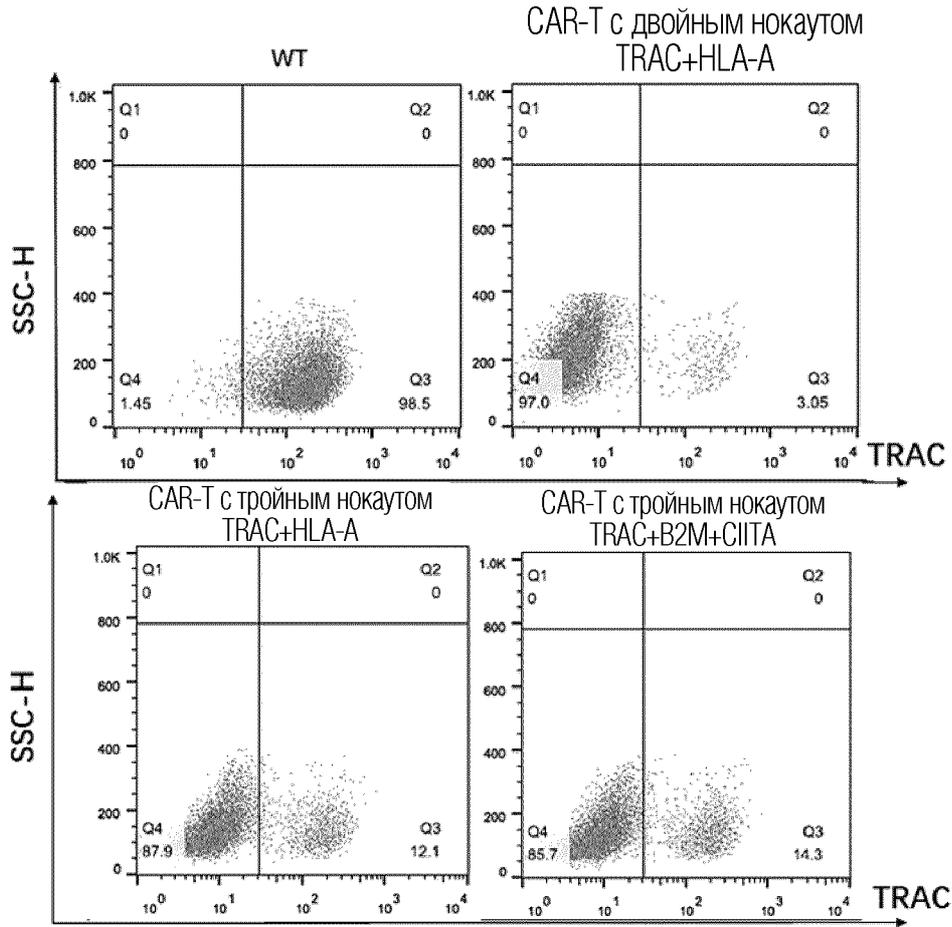


ФИГ. 27

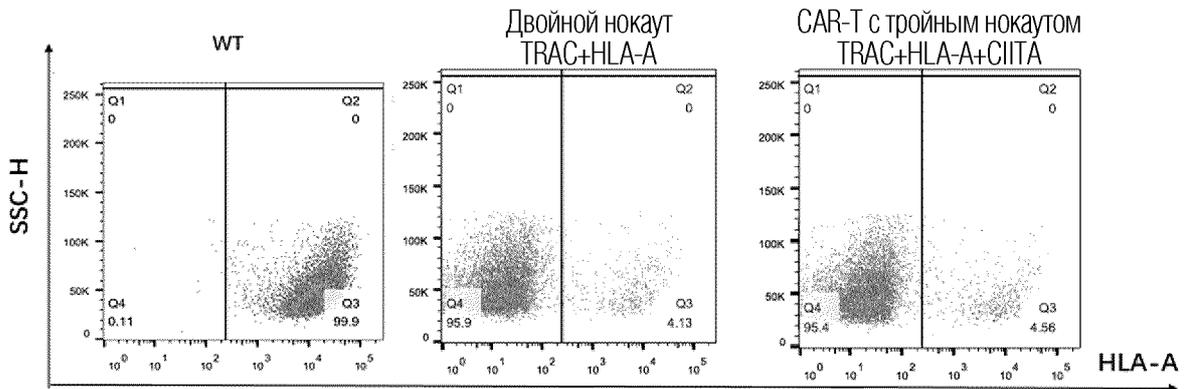


ФИГ. 28

21/24

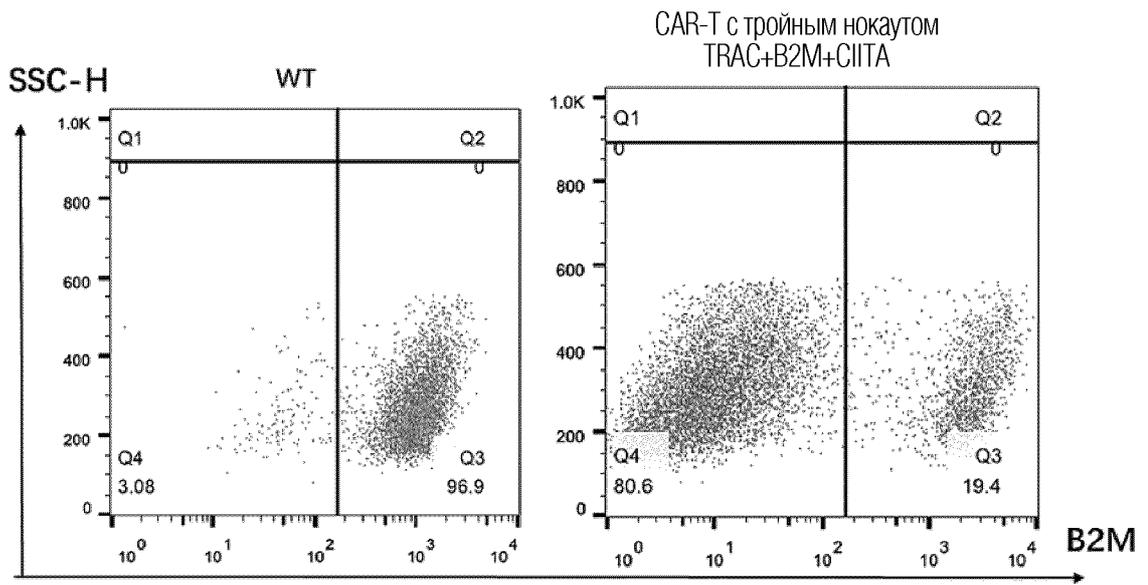


ФИГ. 29А

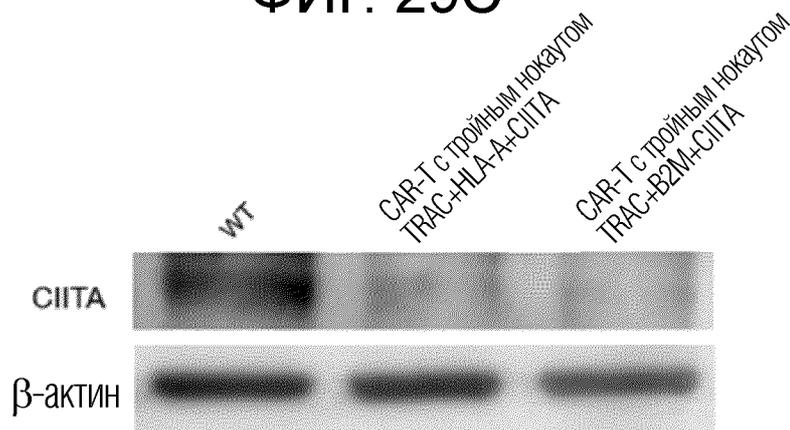


ФИГ. 29В

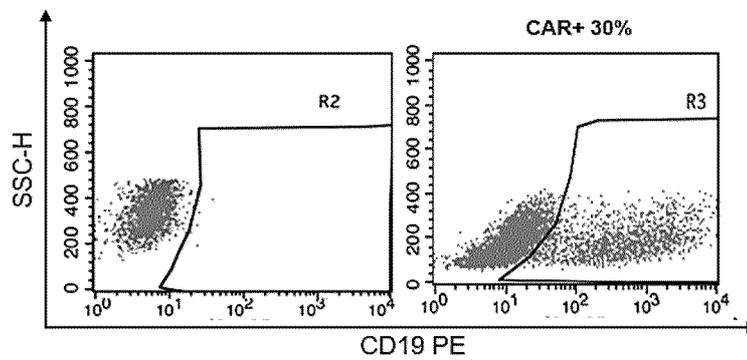
22/24



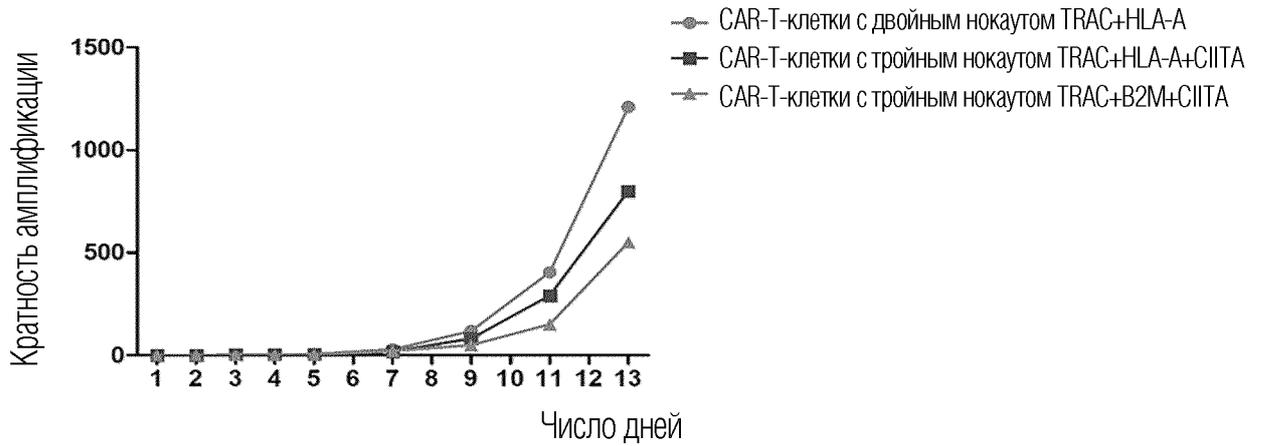
ФИГ. 29С



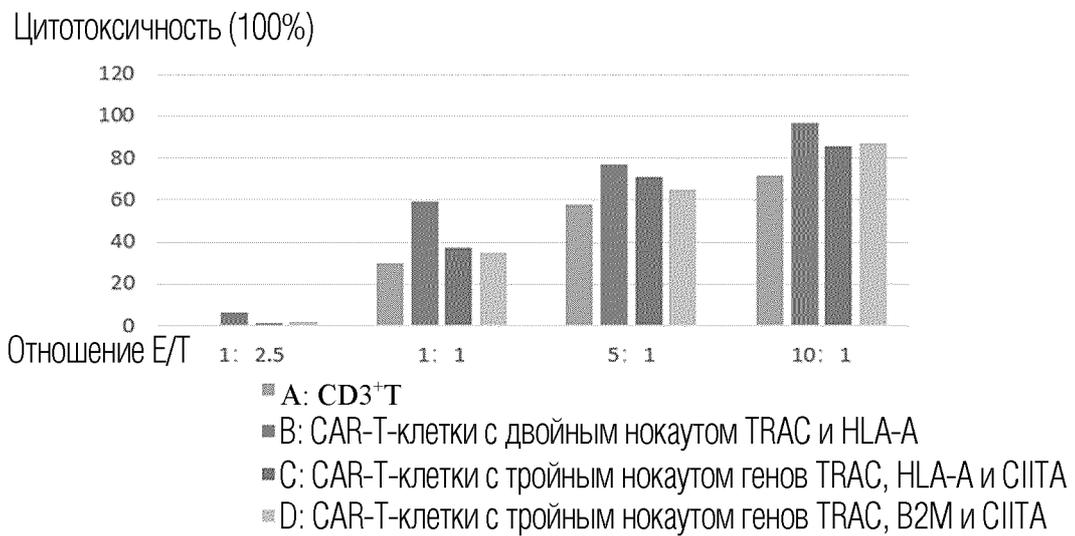
ФИГ. 29D



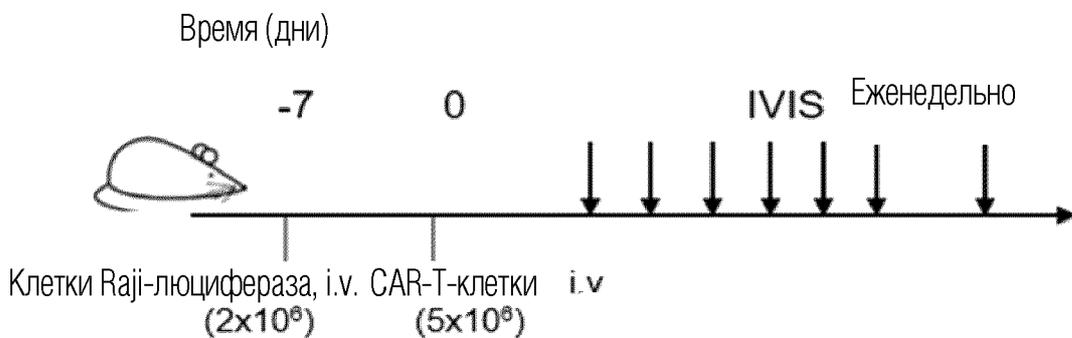
ФИГ. 30



ФИГ. 31

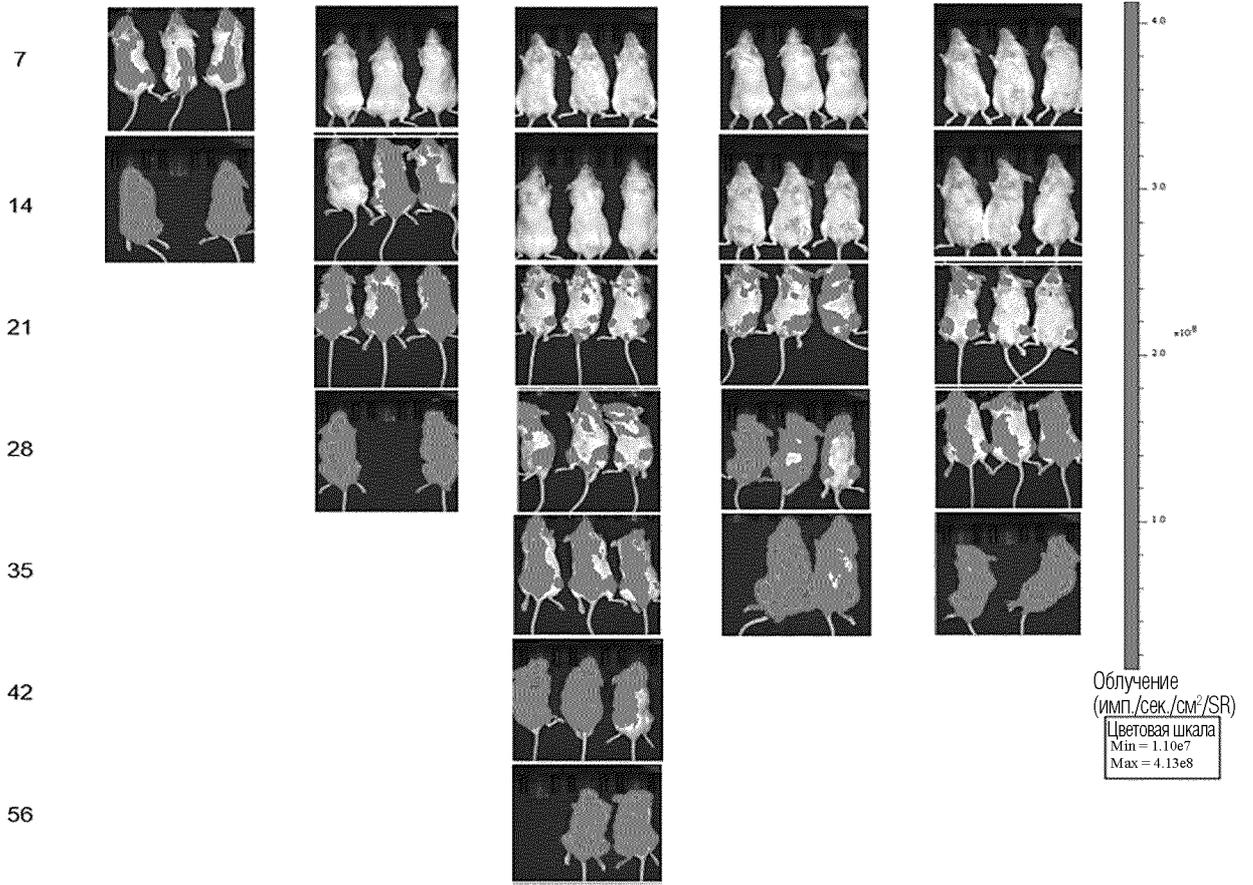


ФИГ. 32



ФИГ. 33

Число дней



ФИГ. 34