

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490513** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.09

(22) Дата подачи заявки
2022.09.08

(51) Int. Cl. *C12N 5/078* (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) АЛЬТЕРНАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ АЛЛОГЕННЫХ Т-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

(31) **63/242,909**

(32) **2021.09.10**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/042869**

(87) **WO 2023/039041 2023.03.16**

(71) Заявитель:
КАЙТ ФАРМА, ИНК. (US)

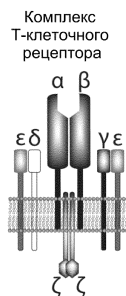
(72) Изобретатель:

**Бедоя Фелипе, Барретт Дэвид,
Педдареддигари Виджай Гопал Редди
(US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены модифицированные иммунные клетки, подвергавшиеся редактированию генов и подходящие для адоптивной Т-клеточной терапии, содержащие нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, SIPA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи; и дополнительно содержащие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (KIR), доминантно-негативный рецептор и/или переключающий рецептор. Кроме того, предложены композиции и способы для получения модифицированной иммунной клетки и способы применения модифицированных иммунных клеток для адоптивной терапии и лечения заболевания или состояния.



A1

202490513

202490513

A1

АЛЬТЕРНАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ АЛЛОГЕННЫХ Т-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/242909, поданной 10 сентября 2021 года, содержание которой специально включено в настоящую заявку посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Адоптивная иммунотерапия включает передачу аутологичных антиген-специфичных Т-клеток, полученных *ex vivo*, обратно в организм пациента; показано, что она является перспективной стратегией лечения рака, инфекций и аутоиммунных заболеваний. Т-клетки, используемые для адоптивной иммунотерапии, представляют собой первичные клетки, сконструированные с целью экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) или рекомбинантного Т-клеточного рецептора (TCR) и размножения *ex vivo* для перенаправления первичных иммунных клеток против патологических клеток, например, раковых клеток. CAR представляют собой синтетические антителоподобные молекулы, состоящие из фрагмента, обеспечивающего адресное воздействие, который связан с одним или более сигнальными доменами в единой гибридной молекуле, и предназначенные для придания антиген-специфичности Т-клеткам. CAR успешно позволяли переориентировать Т-клетки против антигенов, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток различных злокачественных новообразований, включая лимфомы и солидные опухоли. Т-клетки, экспрессирующие CAR, также демонстрируют долгосрочную эффективность в отношении лечения некоторых видов рака.

[0003] Однако в настоящее время адоптивная иммунотерапия основана на переносе аутологичных клеток. При аутологичной иммунотерапии пациент получает персонализированное лечение на основе собственных лимфоцитов пациента, выделенных из организма пациента, генетически модифицированных или селектированных *ex vivo*, культивированных *in vitro* и введенных обратно в организм пациента. Несмотря на признание и общий успех аутологичной адоптивной иммунотерапии, масштабируемость и осуществимость такой терапии представляют собой значительные проблемы. Аутологичная адоптивная иммунотерапия по-прежнему довольно сложна; она требует

специальных знаний и ведения пациента, а также дорогостоящих специализированных средств. Многие пациенты также не могут получать адоптивную иммунотерапию из-за быстрого прогрессирования заболевания во время производства CAR или ослабления иммунной функции пациента перед таким лечением. Таким образом, широкое клиническое применение иммунотерапии рака сдерживают значительные экономические ограничения, обусловленные персонализированным получением аутологичных CAR-T-клеток. Соответственно, существует потребность в стандартизированной адоптивной иммунотерапии, при которой аллогенные терапевтические клетки заранее получают, подробно исследуют и обеспечивают их доступность для немедленного введения широкому кругу пациентов.

[0004] Аллогенная иммунотерапия остается опасной процедурой и характеризуется большим количеством возможных осложнений, например, аллогенных Т-клеточных реакций, клинически проявляющихся в виде реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и/или реакции «хозяин против трансплантата» (РХПТ, отторжения трансплантата). РТПХ вызывается атакой тканей реципиента введенными аллогенными CAR-T-клетками, опосредованной аллореактивным TCR на донорских CAR-клетках. В частности, эндогенные альфа- (TCR α ; TRAC) и бета-цепи Т-клеточного рецептора (TCR β ; TRBC) на введенных Т-клетках могут распознавать главный и минорный антигены гистосовместимости у реципиента, что приводит к РТПХ. И наоборот, введенные аллогенные CAR-T-клетки могут отторгаться Т-лимфоцитами реципиента, что приводит к РХПТ. Таким образом, применимость и универсальность адоптивной иммунотерапии можно улучшить за счет применения аллогенных CAR-T-клеток, при условии нахождения стандартизированного решения, позволяющего контролировать врожденные аллогенные иммунные реакции. Специфическое подавление РТПХ позволит безопасно и эффективно применять аллогенные CAR-T-клетки.

[0005] Соответственно, существует потребность в улучшенных способах работы с CAR-T-клетками, которые не вызывают иммунного ответа хозяина. В частности, существует потребность в новых и альтернативных композициях и способах получения аллогенных Т-клеток с улучшенной пригодностью.

[0006] В настоящем изобретении предложены способы и композиции, позволяющие удовлетворить эти потребности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном аспекте настоящего изобретения предложена модифицированная иммунная клетка, содержащая: (а) инсерцию и/или делецию в одном или более локусах гена, каждый из которых кодирует эндогенный иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). Указанная инсерция и/или делеция способна подавлять экспрессию указанных одного или более эндогенных иммунологических генов. Кроме того, модифицированная иммунная клетка содержит (b) экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), иммуноглобулиноподобный рецептор клетки-киллера (KIR), антигенсвязывающий полипептид, лиганд рецептора клеточной поверхности или опухолевый антиген. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка дополнительно содержит доминантно-негативный рецептор, переключающий рецептор, хемокин, рецептор хемокина, цитокин, рецептор цитокина, ИЛ-7, ИЛ-7R, ИЛ-15, ИЛ-15R, ИЛ-21, ИЛ-18, CCL21, CCL19 или любую их комбинацию.

[0008] В некоторых вариантах реализации указанная инсерция и/или делеция способны подавлять экспрессию генов: (а) субъединицы Т-клеточного рецептора, выбранной из CD3 δ , CD3 ϵ и/или CD3 γ ; (b) молекулы HLA I класса, выбранной из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP и/или NLRC5; и (с) молекулы HLA II класса, выбранной из HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и/или инвариантной цепи (Ii-цепи).

[0009] В некоторых вариантах реализации указанная инсерция и/или делеция способна подавлять (а) экспрессию гена CD3 δ и (b) экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и любой их комбинации.

[0010] В некоторых вариантах реализации указанная инсерция и/или делеция способна подавлять: (а) экспрессию гена CD3 ϵ и (b) экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из

группы, состоящей из В2М, ТАР1, ТАР2, ТАРВР, NLRC5, СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) или любой их комбинации.

[0011] В некоторых вариантах реализации указанная инсерция и/или делеция способна подавлять: (а) экспрессию гена CD3 γ и (б) экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из В2М, ТАР1, ТАР2, ТАРВР, NLRC5, СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) или любой их комбинации.

[0012] В некоторых вариантах реализации указанная инсерция и/или делеция способна подавлять экспрессию генов: (а) CD3 ϵ , В2М и СИТА; (б) CD3 ϵ , В2М и RFX5; (с) CD3 ϵ , В2М и RFXAP; (d) CD3 ϵ , В2М и RFXANK; (е) CD3 ϵ , В2М и HLA-DM; (f) CD3 ϵ , В2М и Ii-цепи; (g) CD3 ϵ , ТАР1 и СИТА; (h) CD3 ϵ , ТАР1 и RFX5; (i) CD3 ϵ , ТАР1 и RFXAP; (j) CD3 ϵ , ТАР1 и RFXANK; (k) CD3 ϵ , ТАР1 и HLA-DM; (l) CD3 ϵ , ТАР1 и Ii-цепи; (m) CD3 ϵ , ТАР2 и СИТА; (n) CD3 ϵ , ТАР2 и RFX5; (o) CD3 ϵ , ТАР2 и RFXAP; (p) CD3 ϵ , ТАР2 и RFXANK; (q) CD3 ϵ , ТАР2 и HLA-DM; (r) CD3 ϵ , ТАР2 и Ii-цепи; (s) CD3 ϵ , NLRC5 и СИТА; (t) CD3 ϵ , NLRC5 и RFX5; (u) CD3 ϵ , NLRC5 и RFXAP; (v) CD3 ϵ , NLRC5 и RFXANK; (w) CD3 ϵ , NLRC5 и HLA-DM; (x) CD3 ϵ , NLRC5 и Ii-цепи; (y) CD3 ϵ , ТАРВР и СИТА; (z) CD3 ϵ , ТАРВР и RFX5; (aa) CD3 ϵ , ТАРВР и RFXAP; (bb) CD3 ϵ , ТАРВР и RFXANK; (cc) CD3 ϵ , ТАРВР и HLA-DM; или (dd) CD3 ϵ , ТАРВР и Ii-цепи.

[0013] В некоторых вариантах реализации указанная инсерция и/или делеция способна подавлять экспрессию генов: (а) CD3 δ , В2М и СИТА; (б) CD3 δ , В2М и RFX5; (с) CD3 δ , В2М и RFXAP; (d) CD3 δ , В2М и RFXANK; (е) CD3 δ , В2М и HLA-DM; (f) CD3 δ , В2М и Ii-цепи; (g) CD3 δ , ТАР1 и СИТА; (h) CD3 δ , ТАР1 и RFX5; (i) CD3 δ , ТАР1 и RFXAP; (j) CD3 δ , ТАР1 и RFXANK; (k) CD3 δ , ТАР1 и HLA-DM; (l) CD3 δ , ТАР1 и Ii-цепи; (m) CD3 δ , ТАР2 и СИТА; (n) CD3 δ , ТАР2 и RFX5; (o) CD3 δ , ТАР2 и RFXAP; CD3 δ , ТАР2 и RFXANK; CD3 δ , ТАР2 и HLA-DM; (r) CD3 δ , ТАР2 и Ii-цепи; (s) CD3 δ , NLRC5 и СИТА; (t) CD3 δ , NLRC5 и RFX5; (u) CD3 δ , NLRC5 и RFXAP; (v) CD3 δ , NLRC5 и RFXANK; (w) CD3 δ , NLRC5 и HLA-DM; (x) CD3 δ , NLRC5 и Ii-цепи; (y) CD3 δ , ТАРВР и СИТА; (z) CD3 δ , ТАРВР и RFX5; (aa) CD3 δ , ТАРВР и RFXAP; (bb) CD3 δ , ТАРВР и RFXANK; (cc) CD3 δ , ТАРВР и HLA-DM; или (dd) CD3 δ , ТАРВР и Ii-цепи.

[0014] В некоторых вариантах реализации указанная инсерция и/или делеция способна подавлять экспрессию генов: (a) CD3 γ , B2M и СИТА; (b) CD3 γ , B2M и RFX5; (c) CD3 γ , B2M и RFXAP; (d) CD3 γ , B2M и RFXANK; (e) CD3 γ , B2M и HLA-DM; (f) CD3 γ , B2M и Ii-цепи; (g) CD3 γ , TAP1 и СИТА; (h) CD3 γ , TAP1 и RFX5; (i) CD3 γ , TAP1 и RFXAP; (j) CD3 γ , TAP1 и RFXANK; (k) CD3 γ , TAP1 и HLA-DM; (l) CD3 γ , TAP1 и Ii-цепи; (m) CD3 γ , TAP2 и СИТА; (n) CD3 γ , TAP2 и RFX5; (o) CD3 γ , TAP2 и RFXAP; (p) CD3 γ , TAP2 и RFXANK; (q) CD3 γ , TAP2 и HLA-DM; (r) CD3 γ , TAP2 и Ii-цепи; (s) CD3 γ , NLRC5 и СИТА; (t) CD3 γ , NLRC5 и RFX5; (u) CD3 γ , NLRC5 и RFXAP; (v) CD3 γ , NLRC5 и RFXANK; (w) CD3 γ , NLRC5 и HLA-DM; (x) CD3 γ , NLRC5 и Ii-цепи; (y) CD3 γ , TAPBP и СИТА; (z) CD3 γ , TAPBP и RFX5; (aa) CD3 γ , TAPBP и RFXAP; (bb) CD3 γ , TAPBP и RFXANK; (cc) CD3 γ , TAPBP и HLA-DM; или (dd) CD3 γ , TAPBP и Ii-цепи.

[0015] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественного киллера (НК-клетки), естественного Т-киллера, лимфоидной клетки-предшественника, гемопоэтической стволовой клетки, стволовой клетки, макрофага, дендритной клетки или любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку или CD8⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка представляет собой аллогенную Т-клетку или аутологичную Т-клетку человека.

[0016] В некоторых вариантах реализации указанная инсерция и/или делеция является результатом редактирования генов, выбранного из группы, состоящей из: (a) эндонуклеазной системы, ассоциированной с CRISPR (Cas) (CRISPR-Cas), и направляющей РНК; (b) системы редактирования генов TALEN, системы редактирования генов на основе нуклеазы с мотивом "цинковый палец" (ZFN), мегануклеазной системы редактирования генов или системы редактирования генов мега-TALEN; и (c) системы сайленсинга генов, выбранной из антисмысловой РНК, антигомерной РНК, РНКи, миРНК или кшРНК. В некоторых вариантах реализации система CRISPR-Cas содержит вектор pAd5/F35-CRISPR. В некоторых вариантах реализации эндонуклеаза Cas содержит Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, Cas9 *S. pyogenes*, Cas9

Staphylococcus aureus, нуклеазу MAD7 (CRISPR-нуклеазу V типа) или любую их комбинацию.

[0017] В некоторых вариантах реализации эндонуклеазная система CRISPR-Cas содержит направляющую РНК. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в пределах одного или более локусов генов, каждый из которых кодирует иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). В некоторых вариантах реализации направляющая РНК комплементарна последовательности в пределах одного или более экзонов CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ . В некоторых вариантах реализации направляющая РНК комплементарна последовательности в пределах экзона 1 CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ .

[0018] В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена CD3 δ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена CD3 ϵ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена CD3 γ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена B2M, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена СИТА, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена TAP1, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена TAP2, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах реализации комплементарная

последовательность направляющей РНК находится в локусе гена TAPBP, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или их комбинацией. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена NLRC5, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена HLA-DM, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена TAP2, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 или их комбинацией. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена RFXANK, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена RFXAP, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах реализации комплементарная последовательность направляющей РНК находится в локусе гена I-цепи, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или любой их комбинацией.

[0019] В одном аспекте настоящего изобретения модифицированная иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызываемым немодифицированной иммунной клеткой, введенной тому же субъекту.

[0020] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызываемым иммунной клеткой, содержащей инсерцию и/или делецию, способную подавлять экспрессию генов TRAC, TRBC, B2M и СИТА. В некоторых вариантах реализации иммунный ответ представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ). В некоторых вариантах реализации ослабление РТПХ за счет модифицированной иммунной клетки сравнивают с действием эквивалентной иммунной клетки, не содержащей делеции и/или инсерции в одном или более локусов

генов, или иммунной клетки, содержащей делецию и/или инсерцию в TRAC, TRBC, B2M и СРТА. В некоторых вариантах реализации происходит индукция ослабленной РТПХ против клетки с несовпадающим HLA-I или против клетки с несовпадающим HLA-II.

[0021] В некоторых вариантах реализации РТПХ ослаблена приблизительно на 10% или более, приблизительно на 20% или более, приблизительно на 30% или более, приблизительно на 40% или более, приблизительно на 50% или более, приблизительно на 60% или более, приблизительно на 70% или более, приблизительно на 80% или более, приблизительно на 90% или более, или приблизительно на 95% или более. В некоторых вариантах реализации РТПХ ослаблена приблизительно в 1 раз или более, приблизительно в 2 раза или более, приблизительно в 3 раза или более, приблизительно в 4 раза или более, приблизительно в 5 раз или более, приблизительно в 6 раз или более, приблизительно в 7 раз или более, приблизительно в 8 раз или более, приблизительно в 9 раз или более, приблизительно в 10 раз или более, приблизительно в 20 раз или более, приблизительно в 30 раз или более, приблизительно в 50 раз или более, приблизительно в 100 раз или более, приблизительно в 150 раз или более или приблизительно в 200 раз или более.

[0022] В одном аспекте настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах реализации CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий домен содержит полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, Fab, F(ab)₂, моноспецифичный Fab₂, биспецифичный Fab₂, триспецифичный Fab₂, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), диатело, триатело, миниантитело, V-Nag или VhH.

[0023] В некоторых вариантах реализации модифицированной иммунной клетки трансмембранный домен выбран из искусственной гидрофобной последовательности, трансмембранного домена трансмембранного белка I типа, альфа-, бета- или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD2, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), ICOS (CD278), CD154, CD357 (GITR), Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7,

TLR8, TLR9 и трансмембранного домена, полученного из иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR).

[0024] В некоторых вариантах реализации модифицированной иммунной клетки костимулирующий домен содержит один или более из костимулирующих доменов белка, выбранного из группы, состоящей из белков суперсемейства TNFR, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS (CD278), NKG2C, B7-H3 (CD276) и внутриклеточного домена, полученного из иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR), или их варианта.

[0025] В некоторых вариантах реализации модифицированной иммунной клетки внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен, выбранный из группы, состоящей из цитоплазматических сигнальных доменов CD2 человека, дзета-цепи CD3 (CD3 ζ), Fc γ RIII, Fc ϵ RI, цитоплазматического фрагмента Fc-рецептора, цитоплазматического рецептора, несущего иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), TCR-дзета, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d или их варианта. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный сигнальный домен содержит дзета-цепь CD3 человека (CD3 ζ).

[0026] В некоторых вариантах реализации модифицированной иммунной клетки мишенью антигенсвязывающего домена является опухолевый антиген, ассоциированный с гематологическим злокачественным заболеванием и/или с солидной опухолью. В некоторых вариантах реализации мишенью указанного антигенсвязывающего домена является опухолевый антиген, выбранный из группы, состоящей из ROR1, мезотелина, c-Met, PSMA, PSCA, альфа-рецептора фолата, бета-рецептора фолата, EGFR, EGFRvIII, GPC2, GPC2, муцина 1 (MUC1), Tn-антигена ((Tn-Ag) или (GalNAca-Ser/Thr)), TnMUC1, альфа-4-рецептора семейства GDNF (GFRa4), белка активации фибробластов (FAP) и альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (ИЛ-13Ra2 или CD213A2).

[0027] В некоторых вариантах реализации CAR содержит (a) антигенсвязывающий домен PSMA, костимулирующий домен CD2 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета; или (b) антигенсвязывающий домен мезотелина, костимулирующий домен 4-1BB и

сигнальный домен CD3-дзета; или (с) антигенсвязывающий домен TnMUC1, костимулирующий домен CD2 и сигнальный домен CD3-дзета.

[0028] В одном аспекте настоящего изобретения модифицированная иммунная клетка дополнительно содержит переключающий рецептор. В некоторых вариантах реализации переключающий рецептор содержит внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным сигналом, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с позитивным сигналом.

[0029] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка дополнительно содержит доминантно-негативный рецептор. В некоторых вариантах реализации указанный доминантно-негативный рецептор содержит (а) укороченный вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом; или (b) вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и по существу не содержащий внутриклеточного сигнального домена; или (с) внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным сигналом, и трансмембранный домен. В некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор представляет собой доминантно-негативный рецептор PD1, VSIG3, VISG8 или TGF β R.

[0030] В некоторых вариантах реализации указанный белок, ассоциированный с негативным сигналом, выбран из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, TGF β RII, BTLA, VSIG3, VSIG8 и TIM-3. В некоторых вариантах реализации указанный белок, ассоциированный с позитивным сигналом, выбран из группы, состоящей из CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS и CD27.

[0031] В некоторых вариантах реализации указанный переключающий рецептор выбран из группы, состоящей из PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1 и TGF β RII-IL12R β 2.

[0032] В некоторых вариантах реализации модифицированной иммунной клетки указанный трансмембранный домен переключающего рецептора выбран из трансмембранного домена белка, выбранного из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, VSIG3, VSIG8, TGF β RII, BTLA, TIM-3, CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS и CD27. В некоторых вариантах реализации указанный трансмембранный домен переключающего рецептора выбран из трансмембранного белка, ассоциированного с негативным сигналом, или трансмембранного домена белка, ассоциированного с негативным сигналом.

[0033] В одном аспекте настоящего изобретения предложена выделенная модифицированная Т-клетка, содержащая по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка, содержащая функционально неполноценный полипептид, демонстрирует по меньшей мере одно из (i) пониженного уровня экспрессии Т-клеточного рецептора по сравнению с немодифицированной Т-клеткой; (ii) пониженного уровня экспрессии указанного неполноценного полипептида; (iii) полного отсутствия поверхностной экспрессии комплекса Т-клеточного рецептора; и/или (iv) пониженного или недостаточного перекрестного связывания Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах реализации указанная Т-клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызываемым немодифицированной Т-клеткой, введенной тому же субъекту.

[0034] В некоторых вариантах реализации указанная Т-клетка содержит два или более функционально неполноценных полипептида, причем второй неполноценный полипептид представляет собой α -цепь Т-клеточного рецептора (TRAC) и/или β -цепь Т-клеточного рецептора (TRBC).

[0035] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка содержит: (a) три или более функционально неполноценных полипептида, выбранных из TRAC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; либо (b) два функционально неполноценных полипептида, выбранных из

CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; либо (с) три функционально неполноценных полипептида, выбранных из CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; либо (d) функционально неполноценный полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 γ , и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; либо (е) функционально неполноценный полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 γ , и функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи.

[0036] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка содержит: (а) функционально неполноценный CD3 δ и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; (b) функционально неполноценный CD3 ϵ и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; или (с) функционально неполноценный CD3 γ и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи.

[0037] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка содержит два или более функционально неполноценных полипептида, выбранных из TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка характеризуется сниженным уровнем экспрессии TRAC, TRBC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, Ii-цепи или любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка не экспрессирует CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, Ii-цепь или любую их комбинацию.

[0038] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка дополнительно содержит функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, TRBC, B2M

и С2ТА. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка характеризуется сниженным уровнем экспрессии TRAC, TRBC, В2М или С2ТА или не экспрессирует TRAC, TRBC, В2М или С2ТА. В некоторых вариантах реализации модификация CD3 δ , CD3 ϵ и/или CD3 γ приводит к нарушению функции комплекса TCR/CD3. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один из CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ модифицируют путем адресного воздействия на один или более экзонов CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ , необязательно экзон 1 CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ .

[0039] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения модифицированной иммунной клетки, включающий: (а) введение в иммунную клетку одной или более нуклеиновых кислот, способных подавлять экспрессию одного или более эндогенных иммунологических генов, кодирующих эндогенный иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , В2М, СИТА, ТАР1, ТАР2, ТАРВР, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи); (b) введение в иммунную клетку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (KIR), антигенсвязывающий полипептид, лиганд рецептора клеточной поверхности или опухолевый антиген; и (с) размножение модифицированной иммунной клетки для получения популяции Т-клеток. В некоторых вариантах реализации способ получения модифицированной иммунной клетки дополнительно включает введение в иммунную клетку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей доминантно-негативный рецептор, переключающий рецептор или их комбинацию.

[0040] В некоторых вариантах реализации указанные одна или более нуклеиновых кислот, введенных в модифицированную иммунную клетку, способны подавлять экспрессию генов: (а) субъединицы Т-клеточного рецептора, выбранной из CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ ; и/или (b) молекулы HLA I класса, выбранной из В2М, ТАР1, ТАР2, ТАРВР или NLRC5; и/или (с) молекулы HLA II класса, выбранной из HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или инвариантной цепи (Ii-цепи).

[0041] В некоторых вариантах реализации указанные одна или более нуклеиновых кислот, введенных в модифицированную иммунную клетку, способны подавлять

экспрессию гена CD3 δ и гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации. В некоторых вариантах реализации указанные одна или более нуклеиновых кислот, введенных в модифицированную иммунную клетку, способны подавлять экспрессию гена CD3 ϵ и молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации. В некоторых вариантах реализации указанные одна или более нуклеиновых кислот, введенных в модифицированную иммунную клетку, способны подавлять экспрессию гена CD3 γ и молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации.

[0042] В некоторых вариантах реализации указанные одна или более нуклеиновых кислот, введенных в модифицированную иммунную клетку, способны подавлять экспрессию генов (a) CD3 ϵ , B2M и СИТА; (b) CD3 ϵ , B2M и RFX5; (c) CD3 ϵ , B2M и RFXAP; (d) CD3 ϵ , B2M и RFXANK; (e) CD3 ϵ , B2M и HLA-DM; (f) CD3 ϵ , B2M и Ii-цепи; (g) CD3 ϵ , TAP1 и СИТА; (h) CD3 ϵ , TAP1 и RFX5; (i) CD3 ϵ , TAP1 и RFXAP; (j) CD3 ϵ , TAP1 и RFXANK; (k) CD3 ϵ , TAP1 и HLA-DM; (l) CD3 ϵ , TAP1 и Ii-цепи; (m) CD3 ϵ , TAP2 и СИТА; (n) CD3 ϵ , TAP2 и RFX5; (o) CD3 ϵ , TAP2 и RFXAP; (p) CD3 ϵ , TAP2 и RFXANK; (q) CD3 ϵ , TAP2 и HLA-DM; (r) CD3 ϵ , TAP2 и Ii-цепи; (s) CD3 ϵ , NLRC5 и СИТА; (t) CD3 ϵ , NLRC5 и RFX5; (u) CD3 ϵ , NLRC5 и RFXAP; (v) CD3 ϵ , NLRC5 и RFXANK; (w) CD3 ϵ , NLRC5 и HLA-DM; (x) CD3 ϵ , NLRC5 и Ii-цепи; (y) CD3 ϵ , TAPBP и СИТА; (z) CD3 ϵ , TAPBP и RFX5; (aa) CD3 ϵ , TAPBP и RFXAP; (bb) CD3 ϵ , TAPBP и RFXANK; (cc) CD3 ϵ , TAPBP и HLA-DM; или (dd) CD3 ϵ , TAPBP и Ii-цепи.

[0043] В некоторых вариантах реализации указанные одна или более нуклеиновых кислот, введенных в модифицированную иммунную клетку, способны подавлять экспрессию генов: (a) CD3 δ , B2M и СИТА; (b) CD3 δ , B2M и RFX5; (c) CD3 δ , B2M и RFXAP; (d) CD3 δ , B2M и RFXANK; (e) CD3 δ , B2M и HLA-DM; (f) CD3 δ , B2M и Ii-цепи; (g) CD3 δ , TAP1 и СИТА; (h) CD3 δ , TAP1 и RFX5; (i) CD3 δ , TAP1 и RFXAP; (j) CD3 δ , TAP1 и RFXANK; (k) CD3 δ , TAP1 и HLA-DM; (l) CD3 δ , TAP1 и Ii-цепи; (m) CD3 δ , TAP2 и СИТА; (n) CD3 δ , TAP2 и RFX5; (o) CD3 δ , TAP2 и RFXAP; (p) CD3 δ , TAP2 и RFXANK; (q) CD3 δ ,

TAP2 и HLA-DM; (r) CD3 δ , TAP2 и Ii-цепи; (s) CD3 δ , NLRC5 и СИТА; (t) CD3 δ , NLRC5 и RFX5; (u) CD3 δ , NLRC5 и RFXAP; (v) CD3 δ , NLRC5 и RFXANK; (w) CD3 δ , NLRC5 и HLA-DM; (x) CD3 δ , NLRC5 и Ii-цепи; (y) CD3 δ , TAPBP и СИТА; (z) CD3 δ , TAPBP и RFX5; (aa) CD3 δ , TAPBP и RFXAP; (bb) CD3 δ , TAPBP и RFXANK; (cc) CD3 δ , TAPBP и HLA-DM; или (dd) CD3 δ , TAPBP и Ii-цепи.

[0044] В некоторых вариантах реализации указанные одна или более нуклеиновых кислот, введенных в модифицированную иммунную клетку, способны подавлять экспрессию генов: (a) CD3 γ , B2M и СИТА; (b) CD3 γ , B2M и RFX5; (c) CD3 γ , B2M и RFXAP; (d) CD3 γ , B2M и RFXANK; (e) CD3 γ , B2M и HLA-DM; (f) CD3 γ , B2M и Ii-цепи; (g) CD3 γ , TAP1 и СИТА; (h) CD3 γ , TAP1 и RFX5; (i) CD3 γ , TAP1 и RFXAP; (j) CD3 γ , TAP1 и RFXANK; (k) CD3 γ , TAP1 и HLA-DM; (l) CD3 γ , TAP1 и Ii-цепи; (m) CD3 γ , TAP2 и СИТА; (n) CD3 γ , TAP2 и RFX5; (o) CD3 γ , TAP2 и RFXAP; (p) CD3 γ , TAP2 и RFXANK; (q) CD3 γ , TAP2 и HLA-DM; (r) CD3 γ , TAP2 и Ii-цепи; (s) CD3 γ , NLRC5 и СИТА; (t) CD3 γ , NLRC5 и RFX5; (u) CD3 γ , NLRC5 и RFXAP; (v) CD3 γ , NLRC5 и RFXANK; (w) CD3 γ , NLRC5 и HLA-DM; (x) CD3 γ , NLRC5 и Ii-цепи; (y) CD3 γ , TAPBP и СИТА; (z) CD3 γ , TAPBP и RFX5; (aa) CD3 γ , TAPBP и RFXAP; (bb) CD3 γ , TAPBP и RFXANK; (cc) CD3 γ , TAPBP и HLA-DM; или (dd) CD3 γ , TAPBP и Ii-цепи.

[0045] В некоторых вариантах реализации модифицируемая иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественного киллера (НК-клетки), естественного Т-киллера, лимфоидной клетки-предшественника, гемопоэтической стволовой клетки, стволовой клетки, макрофага и дендритной клетки. В некоторых вариантах реализации иммунная клетка, подлежащая модификации, представляет собой CD4+ Т-клетку или CD8+ Т-клетку. В некоторых вариантах реализации иммунная клетка, подлежащая модификации, представляет собой аллогенную Т-клетку или аутологичную Т-клетку.

[0046] В некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты вводят в иммунную клетку посредством вирусной трансдукции. В некоторых вариантах реализации вирусная трансдукция включает приведение иммунной клетки в контакт с вирусным вектором, содержащим одну или более нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации указанный вирусный вектор выбран из группы, состоящей из ретровирусного вектора, векторов на основе вируса Сендай, аденовирусных векторов, векторов на основе

аденоассоциированного вируса и лентивирусных векторов.

[0047] В некоторых вариантах реализации каждая из указанных одной или более нуклеиновых кислот, способных подавлять экспрессию одного или более эндогенных иммунологических генов, содержит систему редактирования генов, выбранную из группы, состоящей из: (a) эндонуклеазной системы, ассоциированной с CRISPR (Cas) (CRISPR-CAs), и направляющей РНК; (b) системы редактирования генов TALEN, системы редактирования генов на основе нуклеазы с мотивом "цинковый палец" (ZFN), мегануклеазной системы редактирования генов или системы редактирования генов мега-TALEN; и (c) системы сайленсинга генов, выбранной из антисмысловой РНК, антигомерной РНК, РНКи, миРНК или кшРНК.

[0048] В некоторых вариантах реализации эндонуклеаза Cas содержит Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, Cas9 *S. pyogenes*, Cas9 *Staphylococcus aureus*, нуклеазу MAD7 (CRISPR-нуклеазу V типа) или любую их комбинацию. В некоторых вариантах реализации система CRISPR-Cas содержит вектор pAd5/F35-CRISPR.

[0049] В некоторых вариантах реализации направляющая РНК системы CRISPR-Cas содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в пределах одного или более локусов генов, каждый из которых кодирует иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи).

[0050] В некоторых вариантах реализации направляющая РНК, введенная в модифицированную иммунную клетку, комплементарна последовательности в пределах одного или более экзонов CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ . В некоторых вариантах реализации направляющая РНК комплементарна последовательности в пределах экзона 1 CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ .

[0051] В некоторых вариантах реализации направляющая РНК, введенная в модифицированную иммунную клетку, комплементарна последовательности в локусе гена CD3 δ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК, введенная в

введенная в модифицированную иммунную клетку, комплементарна последовательности в локусе гена RFXANK, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК, введенная в модифицированную иммунную клетку, комплементарна последовательности в локусе гена RFXAP, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК, введенная в модифицированную иммунную клетку, комплементарна последовательности в локусе гена Ii-цепи, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, или любой их комбинацией.

[0052] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка, полученная описанным способом, при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызванным немодифицированной иммунной клеткой, введенной тому же субъекту.

[0053] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка, полученная описанным способом, при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызванным иммунной клеткой, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, способных подавлять экспрессию гена TRAC, TRBC, B2M и СИТА. В некоторых вариантах реализации ослабление РТПХ за счет модифицированной иммунной клеткой, полученной описанным способом, сравнивают с действием эквивалентной иммунной клетки, не содержащей делеции и/или инсерции в одном или более локусов генов, или иммунной клетки, содержащей делецию и/или инсерцию в TRAC, TRBC, B2M и СИТА.

[0054] В некоторых вариантах реализации иммунный ответ представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ). В некоторых вариантах реализации происходит индукция ослабленной РТПХ против клетки с несовпадающим HLA-I или против клетки с несовпадающим HLA-II. В некоторых вариантах реализации РТПХ, вызванная модифицированной иммунной клеткой, полученной описанным способом, ослаблена приблизительно на 10% или более, приблизительно на 20% или более, приблизительно на 30% или более, приблизительно на 40% или более, приблизительно на 50% или более, приблизительно на 60% или более, приблизительно на 70% или более,

приблизительно на 80% или более, приблизительно на 90% или более, или приблизительно на 95% или более. В некоторых вариантах реализации РТПХ, вызванная модифицированной иммунной клеткой, полученной описанным способом, ослаблена приблизительно в 1 раз или более, приблизительно в 2 раза или более, приблизительно в 3 раза или более, приблизительно в 4 раза или более, приблизительно в 5 раз или более, приблизительно в 6 раз или более, приблизительно в 7 раз или более, приблизительно в 8 раз или более, приблизительно в 9 раз или более, приблизительно в 10 раз или более, приблизительно в 20 раз или более, приблизительно в 30 раз или более, приблизительно в 50 раз или более, приблизительно в 100 раз или более, приблизительно в 150 раз или более или приблизительно в 200 раз или более.

[0055] В некоторых вариантах реализации экзогенная нуклеиновая кислота, введенная в иммунную клетку, кодирует химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах реализации CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

[0056] В некоторых вариантах реализации мишенью антигенсвязывающего домена является опухолевый антиген, ассоциированный с гематологическим злокачественным заболеванием и/или с солидной опухолью. В некоторых вариантах реализации мишенью указанного антигенсвязывающего домена является опухолевый антиген, выбранный из группы, состоящей из ROR1, мезотелина, c-Met, PSMA, PSCA, альфа-рецептора фолата, бета-рецептора фолата, EGFR, EGFRvIII, GPC2, GPC2, муцина 1(MUC1), Tn-антигена ((Tn-Ag) или (GalNAca-Ser/Thr)), TnMUC1, альфа-4-рецептора семейства GDNF (GFRa4), белка активации фибробластов (FAP) и альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (ИЛ-13Ra2 или CD213A2).

[0057] В некоторых вариантах реализации CAR, введенный в модифицированную иммунную клетку, содержит: (a) антигенсвязывающий домен PSMA (например, SEQ ID NO: 73 или 74), костимулирующий домен CD2 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета; или (b) антигенсвязывающий домен мезотелина (например, SEQ ID NO: 75), костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета; или (c) антигенсвязывающий домен TnMUC1, костимулирующий домен CD2 и сигнальный домен

CD3-дзета. В некоторых вариантах реализации TnMUC1 CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, а мезотелиновый CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах реализации TnMUC1 CAR кодирует нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 69.

[0058] В одном аспекте настоящего изобретения переключающий рецептор, введенный в модифицированную иммунную клетку, содержит: (а) внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным сигналом, выбранного из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, VISG3, VSIG8, TGF β RII, BTLA и TIM-3, (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с позитивным сигналом, выбранного из группы, состоящей из CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS и CD27.

[0059] В некоторых вариантах реализации указанный переключающий рецептор выбран из группы, состоящей из PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1 и TGF β RII-IL12R β 2.

[0060] В некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор, введенный в модифицированную иммунную клетку, содержит: (а) укороченный вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом, или (b) вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и по существу не содержащий внутриклеточного сигнального домена; или (с) внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным сигналом, и трансмембранный домен. В некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор представляет собой доминантно-негативный рецептор PD1, VSIG3, VSIG8 или TGF β R.

[0061] В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен переключающего рецептора выбран из трансмембранного домена белка, выбранного из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, BTLA, TGF β RII, BTLA, TIM-3, CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2,

ICOS и CD27. В некоторых вариантах реализации указанный трансмембранный домен переключающего рецептора выбран из трансмембранного белка, ассоциированного с негативным сигналом, или трансмембранного домена белка, ассоциированного с негативным сигналом.

[0062] В одном аспекте настоящего изобретения предложено размножение модифицированной иммунной клетки. В некоторых вариантах реализации размножение модифицированной иммунной клетки включает культивирование Т-клетки с фактором, выбранным из группы, состоящей из flt3-L, ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21, ТФР-бета, ИЛ-10 и лиганда c-kit. В одном аспекте настоящего изобретения предложено дополнительное введение полипептида и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей Klf4, Oct3/4 и Sox2, в иммунную клетку для индукции плюрипотентности указанной иммунной клетки.

[0063] В некоторых вариантах реализации иммунную клетку получают из образца крови, образца цельной крови, образца мононуклеара периферической крови (МПК) или образца для афереза. В некоторых вариантах реализации образец для афереза представляет собой криоконсервированный образец. В некоторых вариантах реализации образец для афереза представляет собой свежий образец. В некоторых вариантах реализации иммунную клетку получают из организма субъекта-человека.

[0064] В одном аспекте настоящего изобретения предложена популяция модифицированных иммунных клеток, полученных способом согласно любому из предшествующих вариантов реализации. В некоторых вариантах реализации композиция содержит модифицированную иммунную клетку согласно любому из предшествующих вариантов реализации. В некоторых вариантах реализации композиция содержит популяцию модифицированных иммунных клеток, полученных способами, описанными в любом из предшествующих вариантов реализации, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0065] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания или состояния, ассоциированного с повышенным иммунитетом у субъекта, включающий введение эффективного количества композиции, описанной в любом из предшествующих вариантов реализации, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых

вариантах реализации указанное состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах реализации рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака кожи, рака поджелудочной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака почки, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака легких и любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное заболевание. В некоторых вариантах реализации способ лечения рака включает введение субъекту модифицированных иммунных клеток согласно любому из предшествующих вариантов реализации, популяции модифицированных Т-клеток согласно любому из предшествующих вариантов реализации или композиции согласно любому из предшествующих вариантов реализации.

[0066] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа по отношению к клетке-мишени или ткани-мишени у субъекта, причем указанному субъекту вводят эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей модифицированную иммунную клетку согласно любому из предшествующих вариантов реализации, популяцию модифицированных иммунных клеток согласно любому из предшествующих вариантов реализации или композицию согласно любому из предшествующих вариантов реализации.

[0067] В одном аспекте настоящего изобретения предложен набор, содержащий модифицированные иммунные клетки согласно любому из предшествующих вариантов реализации, популяцию модифицированных Т-клеток согласно любому из предшествующих вариантов реализации или композицию согласно любому из предшествующих вариантов реализации, необязательно содержащий инструкцию по применению.

[0068] Приведенное выше краткое описание изобретения, а также нижеследующее описание чертежей и подробное описание изобретения являются примерными и пояснительными. Они предназначены для предоставления дополнительной информации о настоящем изобретении, но не должны рассматриваться как ограничивающие. Другие цели, преимущества и новые признаки должны быть очевидны для специалистов в данной области техники из следующего подробного описания настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0069] На **фиг. 1** показано схематическое изображение комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) – CD3 человека, содержащего переменную цепь TCR-альфа (TCR- α , TRAC) и цепь TCR-бета (TCR- β , TRBC), связанную с тремя димерными модулями CD3 δ /CD3 ϵ , CD3 γ /CD3 ϵ и CD3 ζ /CD3 ζ . Модули CD3 δ /CD3 ϵ и CD3 γ /CD3 ϵ являются предметом настоящего изобретения.

[0070] На **фиг. 2А-2С** показаны гистограммы, иллюстрирующие эффективность повреждения цепей TCR- α и TCR- β на Т-клетках человека, измеренную с помощью проточной цитометрии после адресного повреждения генов CD3 δ (**фиг. 2А**), CD3 ϵ (**фиг. 2В**) и CD3 γ (**фиг. 2С**) с использованием системы CRISPR/Cas.

[0071] На **фиг. 3** показан график, иллюстрирующий размножение аллогенных CAR-Т-клеток, полученных с использованием стратегии, изображенной на **фиг. 1**, и демонстрирующий количество удвоений популяции за десятидневный период. Тестируемые аллогенные CAR-Т-клетки представляют собой рекомбинантные Т-клетки с нокаутом TRAC (TRAC KO), нокаутом CD3 δ (D1 KO), нокаутом CD3 γ (G4 KO) и нокаутом CD3 ϵ (E4 KO).

[0072] На **фиг. 4А и 4В** показаны результаты проточной цитометрии, позволяющие сравнить CRISPR-опосредованное подавление нокаута цепи TCR- α (TRAC), нокаута CD3 δ (D1 KO), нокаута CD3 γ (G4 KO) и нокаута CD3 ϵ (E4 KO). На **фиг. 4А** показано, что нокаут CD3 ϵ (E4 KO) является лучшей мишенью для нокаута Т-клеточного рецептора, согласно измерениям поверхностной экспрессии цепи TCR- α/β . На **фиг. 4В** показано, что аллогенные CAR-Т-клетки с нокаутом CD3 ϵ (E4 KO), характеризовались более высокой эффективностью трансдукции и улучшенной функциональностью по сравнению с, например, CAR-Т-клетками с нокаутом CD3 γ или CD3 δ ; проиллюстрирован вариант реализации PSMA-CAR-Т-клеток.

[0073] На **фиг. 5** показан график, демонстрирующий способность аллогенных PSMA-CAR-Т-клеток с нокаутом цепи TCR- α (TRAC), нокаутом CD3 δ (D1), нокаутом CD3 ϵ (E4) и нокаутом CD3 γ (G4) уничтожать опухоли; график иллюстрирует, что аллогенные PSMA-CAR-Т-клетки E4 характеризуются наилучшими цитотоксическими свойствами. Клетки-

мишени представляли собой клетки РСЗ.

[0074] На **фиг. 6А-6D** показана активность CRISPR-Cas, проиллюстрированная анализом обнаружения несоответствия эндонуклеазы T7 (T7E1). На **фиг. 6А** показано типичное изображение гель-электрофореза продуктов ПЦР, обработанных T7E1, амплифицированных с сайтов трех разных вариантов редактирования гена C2TA (СПТА) посредством CRISPR-Cas с использованием трех разных нРНК. На **фиг. 6В-6D** показаны электрофореграммы, полученные с помощью электрофореграммы анализа эндонуклеазы T7E1 на Agilent Bioanalyzer и демонстрирующие эффективность редактирования CRISPR-Cas.

[0075] На **фиг. 7А-D** показаны электрофореграммы, полученные на Agilent Bioanalyzer, и гель-электрофорез контрольных образцов и продуктов ПЦР, обработанных T7E1, иллюстрирующие эффективность CRISPR-редактирования C2TA (СПТА). В частности, на **фиг. 7А** показаны общие результаты для образца C2TA-1-ПЦР, на **фиг. 7В** показаны общие результаты для образца C2TA-1-T7E1, на **фиг. 7С** показаны общие результаты для образца C2TA-2-ПЦР, а на **фиг. 7D** показаны общие результаты для образца C2TA-2-T7E1.

[0076] На **фиг. 8** показан график, иллюстрирующий результат анализа реакции лимфоцитов в смешанной культуре (MLR) и демонстрирующий жизнеспособность контрольных Т-клеток (2-й донор), аллогенных PSMA CAR-Т-клеток по отдельности или в смешанной культуре; а также иллюстрирующий, что Т-клетки 2-го (постороннего) донора не пролиферируют в ответ на аллогенные PSMA CAR-Т-клетки в совместной культуре, несмотря на несоответствие HLA. Аллогенные CAR-Т-клетки содержат PSMA CAR и нРНК TRAC/B2M/C2TA, отредактированные с помощью CRISPR.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. ОБЗОР

[0077] Комплекс Т-клеточного рецептора (TCR) представляет собой крупный мультисубъединичный комплекс, состоящий из по меньшей мере восьми полипептидных субъединиц (TCR $\alpha\beta$, CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ и CD3 $\zeta\zeta$). Гетеродимер TCR $\alpha\beta$ представляет собой лиганд-связывающую субъединицу, ответственную за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости I и II класса. CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ и

CD3 ζ организованы в виде димеров с образованием трех димерных модулей CD3 δ /CD3 ϵ , CD3 γ /CD3 ϵ и CD3 ζ /CD3 ζ , передающих сигнал, генерируемый гетеродимером TCR $\alpha\beta$. На сегодняшний день стратегия предотвращения РТПХ и/или РХПТ представляет собой получение аллогенных Т-клеток, включающее подавление экспрессии цепи TCR α посредством адресного повреждения локуса гена *TRAC*. До настоящего изобретения модулирующая роль CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ и CD3 ζ в стимуляции РТПХ и РХПТ не изучалась, поскольку считалось, что повреждение CD3 α/β имеет решающее значение для успешного получения аллогенных Т-клеток. В настоящем изобретении подробно описано неожиданное открытие того, что адресное повреждение локусов CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ и CD3 ζ позволяло получить аллогенные CAR-Т-клетки, которые были столь же и/или более эффективными, чем CAR-Т-клетки с адресным повреждением локуса *TRAC*. В настоящем изобретении предпочтительным является повреждение по меньшей мере одного из генов CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ .

[0078] Настоящее изобретение включает способы и композиции для получения модифицированной Т-клетки посредством нокдауна экспрессии одного или более эндогенных генов комплекса Т-клеточного рецептора и экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), рекомбинантного Т-клеточного рецептора (TCR), иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR), антигенсвязывающего полипептида, лиганда рецептора клеточной поверхности, опухолевого антигена, доминантно-негативного рецептора, переключающего рецептора, хемокина, рецептора хемокина, цитокина или рецептора цитокина.

[0079] Таким образом, настоящее изобретение основано на наблюдении того, что модифицированные иммунные клетки, содержащие по меньшей мере один из подвергнутых редактированию гена CD3 δ , гена CD3 ϵ , гена CD3 ζ и/или гена CD3 γ комплекса Т-клеточного рецептора в комбинации с химерным антигенным рецептором (CAR) и/или переключающим рецептором и/или иммуностимулирующим фактором, представляют собой улучшенные аллогенные Т-клетки, обладающие повышенной пригодностью и демонстрирующие мощную цитозольную активность по отношению к различным линиям раковых клеток *in vitro*, а также достоверное уничтожение опухоли *in vivo* по сравнению со стандартными аллогенными Т-клетками, известными в данной области техники.

[0080] Адоптивная иммунотерапия открывает захватывающие перспективы для пациентов с онкологическими заболеваниями. Однако в настоящее время существует несколько проблем, связанных с производством CAR-T- и TCR-клеток. Эти проблемы влияют на потенциальный успех адоптивной иммунотерапии.

[0081] Несмотря на одобрение и общий успех аутологичной адоптивной иммунотерапии, масштабируемость и реализуемость таких способов лечения весьма проблематичны. В частности, широкое клиническое применение адоптивной иммунотерапии сдерживают значительные экономические ограничения, налагаемые персонализированным получением аутологичных CAR-T-клеток. Тем не менее, стандартизированная адоптивная иммунотерапия, при которой аллогенные терапевтические клетки заранее получают, подробно исследуют и обеспечивают их доступность для немедленного введения широкому кругу пациентов, остается опасной процедурой, влекущей большое количество возможных осложнений, например, аллогенных Т-клеточных реакций. Аллогенная Т-клеточная реакция клинически проявляется в виде реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и/или реакции «хозяин против трансплантата» (РХПТ, отторжение трансплантата). РТПХ вызывается атакой тканей реципиента введенными аллогенными CAR-T-клетками, опосредованной аллореактивным TCR на донорских CAR-клетках. В частности, эндогенные альфа- (TCR α ; TRAC) и бета-цепи Т-клеточного рецептора (TCR β ; TRBC) на введенных Т-клетках распознают главный и минорный антигены гистосовместимости у реципиента, что приводит к (РТПХ). И наоборот, введенные аллогенные CAR-T-клетки могут отторгаться Т-лимфоцитами реципиента, что приводит к РХПТ.

[0082] До настоящего изобретения одним из подходов к решению проблемы аллогенной Т-клеточной реакции было конструирование аллогенных Т-клеток с использованием редактирования генома для устранения экспрессии TCR α , TCR β и/или одного или более из компонентов главного комплекса гистосовместимости (МНС) I (МНС I) и/или II класса в аллогенных донорских Т-клетках. Поскольку гетеродимер TCR $\alpha\beta$ необходим для сборки и активности всего комплекса TCR, нокаут экспрессии α - или β -цепи TCR предотвращает распознавание донорскими CAR-T-клетками аллоантигенов хозяина и, таким образом, РТПХ. Кроме того, с другой стороны, редактирование МНС I в донорских Т-клетках предотвращает распознавание этих аллогенных Т-клеток Т-клетками реципиента и, таким

образом, отторжение трансплантата. На сегодняшний день делеция α -цепи путем адресного повреждения локуса *TRAC* используется в качестве стратегии предотвращения РТПХ в первую очередь потому, что β -цепь кодируют два гена *TRBC* (*TRBC1* и *TRBC2*). Таким образом, нокаут гена *TRBC* потенциально более сложен.

[0083] Оптимальный протокол для эффективного введения Cas9/онРНК в Т-клетки при минимальной токсичности еще предстоит разработать. Кроме того, современные методики не приводят к нокауту TCR в 100% CAR-Т-клеток. Это важно, так как для успешного получения аллогенных клеток, пригодных для CAR-Т-терапии, желателен 100% нокаут TCR.

[0084] Для решения этой проблемы в настоящем изобретении подробно описано повреждение гена *CD3 ϵ* , гена *CD3 γ* и/или гена *CD3 δ* (см. **фиг. 1**) как по отдельности, так и в комбинации по меньшей мере с одним нокаутом другого гена, как подробно описано ниже в таблице 1. (Можно также внести повреждения в ген *CD3 ζ* .) Настоящее изобретение также охватывает конструкции, в которых поврежден по меньшей мере один из генов *CD3 ϵ* , *CD3 γ* и/или *CD3 δ* (и, необязательно, ген *CD3 ζ*), и их применение. Повреждение по меньшей мере одного из *CD3 ϵ* , *CD3 γ* и/или *CD3 δ* (и, необязательно, гена *CD3 ζ*) также можно комбинировать с повреждением одного или более из *CD3 α* и *CD3 β* (например, нокаут гена *CD3 ϵ* и гена *CD3 γ* ; нокаут гена *CD3 ϵ* и гена *CD3 α* ; нокаут гена *CD3 γ* и гена *CD3 δ* и т.д.). См., например, пример 2 и таблицу 1, в которых показана новая аллогенная CAR-Т стратегия согласно настоящему изобретению, включающая нокаут (КО) альтернативных субъединиц Т-клеточного рецептора (*CD3 δ* , *CD3 γ* и *CD3 ϵ*) и дополнительных важнейших генов путей процессирования и презентации антигенов.

		Т-клеточный рецептор				HLA-I					HLA-II					
		TRAC	CD36	CD3ε	CD3γ	B2M	TAP1	TAP2	TAPBP	NLRC5	C2TA	HLA-DM	RFX5	RFXANK	RFXAP	ii-цепь
Т-клеточный рецептор	TRAC	■				1					1					
	CD36		■													
	CD3ε			■												
	CD3γ				■											
HLA-I	B2M	1				■					1					
	TAP1						■									
	TAP2							■								
	TAPBP								■							
	NLRC5									■						
HLA-II	C2TA	1				1					■					
	HLA-DM											■				
	RFX5												■			
	RFXANK													■		
	RFXAP														■	
	ii-цепь															■

Таблица 1

[0085] Неожиданно было обнаружено, что два или три (или более) повреждения препятствуют экспрессии Т-клеточного рецептора и успешно приводят к подавлению экспрессии TCR при минимальной токсичности.

[0086] Кроме того, показано, что TRAC-отрицательные Т-клетки дольше сохраняются в опухолях (Stadtmauer et. al., *Science*, 367(6481): eaba7365 (2020)), поэтому то, что повреждение гена CD3ε, гена CD3γ, гена CD3ζ и/или гена CD3δ также приводило к получению Т-клеток, эффективных при адоптивной иммунотерапии, явилось неожиданным (хотя, как отмечалось выше, настоящее изобретение также включает повреждение одного

или более из генов CD3ε, CD3γ, CD3ζ и/или CD3δ в комбинации с повреждением генов CD3α и/или CD3β).

[0087] В настоящем изобретении предложены новые и альтернативные подходы для модуляции функциональных свойств Т-клеток путем альтернативной настройки и модуляции сигнального пути TCR, ассоциированного с аллогенными Т-клеточными реакциями. В частности, настоящее изобретение демонстрирует, что подавление экспрессии по меньшей мере одного из гена CD3ε, гена CD3γ, гена CD3ζ и/или гена CD3δ по отдельности либо в комбинации с одним или более дополнительными компонентами комплекса TCR значительно снижает аллогенные Т-клеточные реакции при сохранении полезных противоопухолевых свойств CAR-Т-клеток, тем самым позволяя получить безопасные и эффективные CAR-Т-клетки. Преимущества этих новых и альтернативных подходов более подробно описаны ниже.

II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

[0088] Процент эффективности повреждения цепей TCR-α и TCR-β на Т-клетках человека измеряли с помощью проточной цитометрии после адресного повреждения генов CD3δ (**фиг. 2А**), CD3ε (**фиг. 2В**) и CD3γ (**фиг. 2С**) с использованием системы CRISPR/Cas (см. также пример 3 ниже). На **фиг. 2А** показаны результаты, полученные после повреждения CD3δ с использованием четырех различных направляющих РНК: нРНК1, нРНК2, нРНК3 и нРНК4. Адресное повреждение CD3δ с использованием направляющих РНК нРНК1 и нРНК3 в системе CRISPR/Cas приводило к 100% эффективности КО TCR α/β, в то время как использование нРНК2 и нРНК4 в системе CRISPR/Cas приводило к более чем приблизительно 90% эффективности КО TCR α/β. Таким образом, использование нРНК1 и нРНК3 в системе CRISPR/Cas является предпочтительным для повреждения CD3δ.

[0089] На **фиг. 2В** показаны результаты, полученные после адресного повреждения CD3ε с использованием пяти различных направляющих РНК: нРНК1, нРНК2, нРНК3, нРНК4 и нРНК5. Повреждение CD3ε с использованием направляющих РНК нРНК4 и нРНК5 в системе CRISPR/Cas приводило к 100% эффективности КО TCR α/β, в то время как использование нРНК1 приводило лишь к приблизительно 50% эффективности КО TCR α/β, и, наконец, использование направляющих нРНК2 и нРНК3 в системе CRISPR/Cas

приводило к более чем приблизительно 90% эффективности КО TCR α/β . Таким образом, применение направляющих РНК нРНК4 и нРНК5 в системе CRISPR/Cas является предпочтительным для повреждения CD3 ϵ .

[0090] На **фиг. 2С** показаны результаты, полученные после адресного повреждения CD3 γ с использованием пяти различных направляющих РНК: нРНК1, нРНК2, нРНК3, нРНК4 и нРНК5. Повреждение CD3 ϵ с использованием нРНК4 и направляющих РНК в системе CRISPR/Cas приводило к 100% эффективности КО TCR α/β , в то время как использование нРНК5 приводило к более чем приблизительно 95% эффективности КО TCR α/β , и, наконец, использование нРНК1, нРНК2 и нРНК3 направляющих РНК в системе CRISPR/Cas приводило к меньшей эффективности КО TCR α/β . Таким образом, использование направляющей РНК нРНК4 в системе CRISPR/Cas является предпочтительным для повреждения CD3 γ .

[0091] В еще одном эксперименте, подробная информация о котором представлена ниже в примере 4, оценивали размножение различных конструкций аллогенных CAR-T-клеток в течение 10 суток. Эти данные имеют важное значение, так как если модифицированные иммунные клетки не будут размножаться, то достаточное для успешной терапии количество клеток не будет получено. Различные протестированные конструкции включали аллогенные CAR-T-клетки с: (1) нокаутом TRAC (ALLO (TRAC KO) на **фиг. 3**) (например, нокаут, использовавшийся до настоящего изобретения), (2) нокаут CD3 δ (ALLO (D1 KO) на **фиг. 3**), (3) нокаут CD3 γ (ALLO (G4 KO) на **фиг. 3**) и (4) нокаут CD3 ϵ (ALLO (E4 KO) на **фиг. 3**). Процент удвоения популяции клеток показан на оси Y, а время в сутках показано на оси X. Результаты, подробно представленные на **фиг. 3**, показывают, что все модифицированные клетки продуцировали приблизительно 4-кратное или более частое удвоение в течение 9 суток, тем самым демонстрируя, что модифицированные клетки продуцировали пригодное для применения количество материала, пригодного для иммунотерапии.

[0092] В примере 5 оценивали несколько различных конструкций с нокаутом для оценки поверхностной экспрессии TCR- α/β -цепи. В частности, на **фиг. 4А и 4В** показаны результаты проточной цитометрии, позволяющие сравнить CRISPR-опосредованное подавление нокаута цепи TCR- α (TRAC) (например, конструкт, использовавшийся до

настоящего изобретения), нокаута CD3 δ (D1 KO), нокаута CD3 γ (G4 KO) и нокаута CD3 ϵ (E4 KO). На **фиг. 4А** показано, что нокаут CD3 ϵ (E4 KO) являлся лучшей мишенью для нокаута Т-клеточного рецептора, согласно измерениям поверхностной экспрессии цепи TCR- α/β . На **фиг. 4В** показано, что аллогенные CAR-Т-клетки с нокаутом CD3 ϵ (E4 KO), характеризовались более высокой эффективностью трансдукции и улучшенной функциональностью по сравнению с, например, CAR-Т-клетками с нокаутом CD3 γ или CD3 δ ; проиллюстрирован вариант реализации PSMA-CAR-Т-клеток. Кроме того, на **фиг. 4В** показано, что большинство CAR-Т-клеток являлись аллогенными (CD3- и TCR-отрицательными), что означает, что пациентам, получающим CAR-Т-клетки согласно настоящему изобретению, можно вливать большее количество аллогенных CAR-Т-клеток.

[0093] В дополнительном эксперименте, подробно описанном ниже в примере 6, оценивали способность различных конструкторов PSMA CAR-Т-клеток уничтожать опухоль, как показано на **фиг. 5**. В частности, на **фиг. 5** показан график, демонстрирующий способность аллогенных PSMA CAR-Т-клеток с нокаутом цепи TCR- α (TRAC) (например, конструктора, использовавшегося до настоящего изобретения), нокаутом CD3 δ (D1), нокаутом CD3 ϵ (E4) и нокаутом CD3 γ (G4) к уничтожению опухоли. Результаты показывают, что аллогенные PSMA E4 CAR-Т-клетки обладали наилучшими цитотоксическими свойствами. Клетки-мишени представляли собой клетки PC3, которые представляют собой линию клеток рака предстательной железы человека. Неожиданно было обнаружено, что нокаут E4 был более эффективен, чем D1 и G4. Аллогенные CAR-Т-клетки, полученные путем адресного воздействия на молекулу CD3 ϵ , были более эффективными (например, уничтожали опухолевые клетки намного быстрее) по сравнению с другими аллогенными CAR-Т-клетками, подвергнутыми оценке. Более высокая активность CAR-Т-клеток с нокаутом CD3 ϵ (E4) означает, что опухолевые клетки, являющиеся мишенью этих CAR-Т-клеток, будут уничтожаться намного быстрее по сравнению с CAR-Т-клетками с нокаутом цепи TCR- α (TRAC), CAR-Т-клетками с нокаутом CD3 δ (D1) и/или CAR-Т-клетками с нокаутом CD3 γ (G4). Время имеет важное значение для успешности нашей аллогенной стратегии у пациентов.

[0094] В примере 7 описана оценка эффективности методики CRISPR-Cas при осуществлении нокаута гена-мишени. В частности, на **фиг. 6А-6D** показана активность

CRISPR-Cas, проиллюстрированная анализом обнаружения несоответствия эндонуклеазы T7 (T7E1). На **фиг. 6А** показано типичное изображение гель-электрофореза продуктов ПЦР, обработанных T7E1, амплифицированных с сайтов трех разных вариантов редактирования гена C2TA (СПТА) посредством CRISPR-Cas с использованием трех разных нРНК. На **фиг. 6В-6Д** показаны электрофореграммы, полученные с помощью электрофореграммы анализа эндонуклеазы T7E1 на Agilent Bioanalyzer и демонстрирующие эффективность редактирования CRISPR-Cas.

[0095] Кроме того, на **фиг. 7А-Д** показаны электрофореграммы, полученные на Agilent Bioanalyzer, и гель-электрофорез контрольных образцов и продуктов ПЦР, обработанных T7E1, иллюстрирующие эффективность CRISPR-редактирования C2TA (СПТА). На **фиг. 7А** показаны общие результаты для образца C2TA-1-ПЦР, на **фиг. 7В** показаны общие результаты для образца C2TA-1-T7E1, на **фиг. 7С** показаны общие результаты для образца C2TA-2-ПЦР, а на **фиг. 7Д** показаны общие результаты для образца C2TA-2-T7E1.

[0096] Наконец, выполнили анализ реакции лимфоцитов в смешанной культуре (MLA). На **фиг. 8** показан график, иллюстрирующий результат анализа реакции лимфоцитов в смешанной культуре (MLR) только с аллогенными клетками, только с Т-клетками (2-й донор; Т-клетки от другого донора), только с аллогенными клетками в смешанной культуре и с Т-клетками (2-й донор) в смешанной культуре. В частности, Т-клетки реципиента (Т-клетки от другого донора) совместно культивировали с аллогенными CAR-Т-клетками в течение 14 суток и анализировали пролиферацию Т-клеток. Результаты демонстрируют жизнеспособность контрольных Т-клеток (2-го донора), аллогенных PSMA CAR-Т-клеток отдельно или в смешанной культуре, и показывают, что Т-клетки «реципиента» не реагировали (отсутствие пролиферации) на присутствие аллогенных клеток. Таким образом, на **фиг. 8** показано, что Т-клетки 2-го (постороннего) донора не пролиферировали в ответ на аллогенные PSMA CAR-Т-клетки в совместной культуре, несмотря на несоответствие HLA. Аллогенный CAR-Т включает PSMA CAR-Т и нРНК TRAC/B2M/C2TA, отредактированных с помощью CRISPR. Соответственно, у аллогенных CAR-Т-клеток согласно настоящему изобретению будет возможность уничтожения опухолевых клеток без обнаружения иммунной системой (т.е. Т-клетками) реципиента.

III. АЛЛОГЕННЫЕ Т-КЛЕТКИ

А. Подавление экспрессии эндогенных иммунологических белков

[0097] В одном аспекте настоящего изобретения предложена модифицированная иммунная клетка, содержащая (1) инсерцию и/или делецию в одном или более локусах генов, кодирующих эндогенный иммунологический белок; (2) экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (KIR), антигенсвязывающий полипептид, лиганд рецептора клеточной поверхности или опухолевый антиген. Соответственно, модифицированную клетку согласно настоящему изобретению подвергают редактированию генов с целью нарушения экспрессии любого из эндогенных генов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации модифицированную клетку, содержащую систему экспрессии рекомбинантного TCR или CAR согласно настоящему изобретению, подвергают редактированию генов с целью нарушения экспрессии одного или более эндогенных генов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации при повреждении одного или более из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи) получают аллогенную Т-клетку (т.е. универсальную иммунную клетку). В настоящем документе термин «универсальная иммунная клетка» или «универсальная Т-клетка» относится к аллогенной иммунной клетке или Т-клетке, заранее модифицированной/заранее полученной с целью введения любому пациенту. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка согласно настоящему изобретению представляет собой аллогенный Т-клеточный продукт со сниженной или подавленной аллогенной Т-клеточной реакцией. В некоторых вариантах реализации подавление экспрессии одного или более локусов генов эндогенных иммунологических белков снижает и/или устраняет РТПХ и/или РХПТ.

[0098] В некоторых вариантах реализации указанная иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызываемым немодифицированной иммунной клеткой, введенной тому же субъекту. В некоторых вариантах реализации иммунная клетка согласно настоящему изобретению при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызываемым иммунной клеткой, содержащей инсерцию и/или делецию, способную подавлять экспрессию генов

TRAC, TRBC, B2M и СИТА. В некоторых вариантах реализации иммунный ответ представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ) или "хозяин против трансплантата" (РХПТ; отторжение трансплантата). В некоторых вариантах реализации происходит индукция ослабленной РТПХ против клетки с несовпадающим HLA-I или против клетки с несовпадающим HLA-II. В некоторых вариантах реализации РТПХ ослаблена приблизительно на 10% или более, приблизительно на 20% или более, приблизительно на 30% или более, приблизительно на 40% или более, приблизительно на 50% или более, приблизительно на 60% или более, приблизительно на 70% или более, приблизительно на 80% или более, приблизительно на 90% или более, или приблизительно на 95% или более. В некоторых вариантах реализации РТПХ ослаблена приблизительно в 1 раз или более, приблизительно в 2 раза или более, приблизительно в 3 раза или более, приблизительно в 4 раза или более, приблизительно в 5 раз или более, приблизительно в 6 раз или более, приблизительно в 7 раз или более, приблизительно в 8 раз или более, приблизительно в 9 раз или более, приблизительно в 10 раз или более, приблизительно в 20 раз или более, приблизительно в 30 раз или более, приблизительно в 50 раз или более, приблизительно в 100 раз или более, приблизительно в 150 раз или более или приблизительно в 200 раз или более. В некоторых вариантах реализации ослабление РТПХ за счет модифицированной иммунной клетки сравнивают с действием эквивалентной иммунной клетки, не содержащей делеции и/или инсерции в одном или более локусов генов, или иммунной клетки, содержащей делецию и/или инсерцию в TRAC, TCR β , B2M и СИТА.

[0099] В некоторых вариантах реализации указанная инсерция и/или делеция в одном или более локусах генов способна подавлять экспрессию генов одного или более локусов эндогенных иммунологических белков. В некоторых вариантах реализации эндогенный иммунологический белок представляет собой один из компонентов комплекса TCR. В некоторых вариантах реализации эндогенный иммунологический белок представляет собой один или более из CD3 ϵ CD3 γ , CD3 δ и CD3 ζ , организованные в виде гетеродимеров с образованием трех димерных модулей CD3 δ /CD3 ϵ , CD3 γ /CD3 ϵ и CD3 ζ /CD3 ζ , передающих сигнал, генерируемый связыванием лиганда с гетеродимером TCR $\alpha\beta$. В некоторых вариантах реализации указанный лиганд представляет собой антиген, связанный с молекулами главного комплекса гистосовместимости I и II класса (MHC-I; MHC-II) и

распознаваемый гетеродимером TCR $\alpha\beta$.

[0100] В некоторых вариантах реализации эндогенный иммунологический белок представляет собой молекулу МНС I класса (МНС-I) и/или МНС II класса (МНС-II). В некоторых вариантах реализации эндогенный иммунологический белок представляет собой В2М (бета-2-микроглобулин), СИТА (трансактиватор II класса), TAP1 (переносчик ABC 1, ассоциированный с процессированием антигена; переносчик 1, член подсемейства В белков, содержащих домен АТФ-связывающей кассеты), TAP2 (переносчик ABC 2, ассоциированный с процессированием антигена; переносчик 2, член подсемейства В белков, содержащих домен АТФ-связывающей кассеты), TAPBP (белок, связывающий TAP; тапазин; белок, ассоциированный с TAP), NLRC5 (белок 5, содержащий домен CARD, семейства NLR), HLA-DM, RFX5 (регуляторный фактор X5), RFXANK (белок, содержащий анкирин, ассоциированный с регуляторным фактором X), RFXAP (белок, ассоциированный с регуляторным фактором X) и инвариантную цепь (Ii-цепь).

[0101] Как и TCR, МНС-I и МНС-II играют важную роль в активации адаптивных иммунных реакций посредством презентации антигенов Т-лимфоцитам. У человека есть три основных локуса МНС-I (HLA-A, HLA-B и HLA-C), которые имеют жизненно важное значение для обнаружения и устранения вирусов, раковых клеток и трансплантированных клеток. Кроме того, существует три неклассических молекулы МНС-I (HLA-E, HLA-F и HLA-G), которые обладают иммунорегуляторными функциями. Молекулы МНС-II человека также включают три локуса (HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR). Каждый из МНС I и II классов также содержит несколько регуляторных белков. Модулирующие белки МНС-I включают бета-2-микроглобулин (В2М), антиген-процессирующие молекулы, например, TAP1, TAP2, TAPBP, и регулятор транскрипции, например, NLRC5. Tap1, Tap2 и TAPBP входят в состав комплекса переносчика TAP, который необходим для загрузки пептидных антигенов в комплексы HLA I класса. Подавление экспрессии любого из В2М, NLRC5, Tap1, Tap2 и TAPBP приводит к снижению экспрессии белка МНС I класса на клеточной поверхности и нарушению иммунных реакций. В некоторых вариантах реализации эндогенный иммунологический белок, рассматриваемый в настоящем изобретении, представляет собой ген МНС-I, выбранный из группы, состоящей из В2М, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5 и их комбинации.

[0102] Регуляторные белки МНС-II включают регуляторы транскрипции СИТА, RFX5, RFXANK, RFXAP; и белки-шапероны, участвующие в образовании и транспортировке пептида МНС II класса, инвариантной цепи (Ii-цепи) и лейкоцитарного антигена человека DM (HLA-DM; HLA-DMA), HLA-DOA и HLA-DOB. RFX5, RFXANK, RFXAP представляют собой субъединицы тримерного ДНК-связывающего комплекса RFX, специфично связывающегося с промоторами всех генов МНС II класса и регулирующего их транскрипцию. Инвариантная цепь (Ii) функционирует как шаперон МНС II класса, который предотвращает загрузку ER пептидами, стимулирует выход из ER и модулирует загрузку антигенных пептидов. Подобно TAPBP, HLA-DM (например, HLA-DMA) способствует загрузке молекул МНС-II пептидами во время их внутриклеточного переноса. HLA-DM устраняет/предотвращает экспонирование слабо связывающихся пептидов на белках МНС-II, направляя ответ Т-клеток на «иммунодоминантные» области антигенов. В некоторых вариантах реализации HLA-DM (например, HLA-DMA) способствует устранению потенциально аутореактивных Т-клеток при процессировании собственных белков. В некоторых вариантах реализации эндогенный иммунологический белок, рассматриваемый в настоящем изобретении, представляет собой ген МНС-II, выбранный из группы, состоящей из СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации.

[0103] Следовательно, эффективное удаление барьера HLA для снижения РХПТ или РТПХ может быть достигнуто путем подавления одного или более из следующего: (1) адресного воздействия на полиморфные гены МНС-I (HLA-A, -B, -C) и/или гены МНС-II (HLA-DP, -DQ, -DR); (2) адресного воздействия на молекулы, модулирующие перенос всех молекул МНС-I на поверхность клетки, например, В2М или антиген-процессирующие молекулы МНС-I, например, TAP1, TAP2 или TAPBP; (3) адресного воздействия на молекулы, модулирующие перенос молекул МНС-II, например, инвариантную цепь (Ii; или CD74) или HLA-DM; и/или (4) адресного воздействия на регуляторы транскрипции МНС-I (NLRC5) или экспрессии МНС-II (СИТА, RFX-5, RFXANK, RFX-AP).

[0104] В некоторых вариантах реализации эндогенный иммунологический белок, экспрессию гена которого подавляют за счет инсерции и/или делеции, выбран из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , В2М, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи; CD74) или любой их комбинации.

В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка (т.е. Т-клетка) со сниженной экспрессией гена эндогенного иммунологического белка, выбранного из CD3δ, CD3ε, CD3γ, B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи; CD74), и их комбинации обладает сниженной иммуногенностью в аллогенном окружении. В некоторых вариантах реализации подавление экспрессии генов CD3δ, CD3ε, CD3γ, B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи; CD74) или любой их комбинации устраняет поверхностную презентацию аллоантигенов на Т-клетке, которая может вызывать РХПТ и/или РТПХ, и/или предотвращает мембранную экспрессию Т-клеточного рецептора.

[0105] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка, используемая для получения аллогенного Т-клеточного продукта, характеризуется тройным нокаутом, включающим подавление экспрессии одной субъединицы Т-клеточного рецептора, одной молекулы HLA I класса; и одной молекулы HLA II класса. В некоторых вариантах реализации субъединица Т-клеточного рецептора выбрана из CD3δ, CD3ε или CD3γ; молекула HLA I класса выбрана из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP или NLRC5; а молекула HLA II класса выбрана из HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или инвариантной цепи (Ii-цепи). В некоторых вариантах реализации аллогенный Т-клеточный продукт характеризуется более чем тремя нокаутами эндогенных иммунологических белков. В таком варианте реализации субъединица Т-клеточного рецептора выбрана из CD3δ, CD3ε и/или CD3γ; молекула HLA I класса выбрана из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP и/или NLRC5; а молекула HLA II класса выбрана из HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и/или инвариантной цепи (Ii-цепи). В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка для получения аллогенного Т-клеточного продукта характеризуется одним или более нокаутами эндогенного иммунологического белка, включая подавление экспрессии по меньшей мере двух субъединиц Т-клеточного рецептора, по меньшей мере двух молекул HLA I класса; и по меньшей мере двух молекул HLA II класса. В некоторых вариантах реализации субъединица Т-клеточного рецептора выбрана из по меньшей мере двух из CD3δ, CD3ε и CD3γ; молекула HLA I класса выбрана из по меньшей мере двух из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP и NLRC5; а молекула HLA II класса выбрана из по меньшей мере двух HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи).

[0106] В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка содержит инсерцию и/или делецию, подавляющую экспрессию гена CD3δ и экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации. В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка содержит инсерцию и/или делецию, подавляющую экспрессию гена CD3ε и экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации. В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка содержит инсерцию и/или делецию, подавляющую экспрессию гена CD3γ и экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации.

[0107] В некоторых вариантах реализации при подавлении экспрессии гена CD3δ, CD3ε и/или CD3γ поверхностная экспрессия альфа- и бета-цепей Т-клеточного рецептора снижена на по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 99% или по меньшей мере приблизительно 100%. В некоторых вариантах реализации подавление экспрессии CD3ε обеспечивает более высокую эффективность нокаута Т-клеточного рецептора по сравнению с подавлением экспрессии CD3γ и/или CD3δ. В некоторых вариантах реализации эффективность нокаута Т-клеточного рецептора, вызванного подавлением экспрессии CD3ε, выше или равна эффективности при подавлении экспрессии TRAC.

[0108] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка, используемая для получения аллогенного Т-клеточного продукта, характеризуется тройным нокаутом. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка характеризуется снижением или устранением экспрессии гена (1) CD3ε, B2M и СИТА; (2) CD3ε, B2M и RFX5; (3) CD3ε, B2M и RFXAP; (4) CD3ε, B2M и RFXANK; (5) CD3ε, B2M и HLA-DM; (6) CD3ε, B2M и Ii-цепи; (7) CD3ε, TAP1 и СИТА; (8) CD3ε, TAP1

и RFX5; (9) CD3ε, TAP1 и RFXAP; (10) CD3ε, TAP1 и RFXANK; (11) CD3ε, TAP1 и HLA-DM; (12) CD3ε, TAP1 и Ii-цепи; (13) CD3ε, TAP2 и СИТА; (14) CD3ε, TAP2 и RFX5; (15) CD3ε, TAP2 и RFXAP; (16) CD3ε, TAP2 и RFXANK; (17) CD3ε, TAP2 и HLA-DM; (18) CD3ε, TAP2 и Ii-цепи; (19) CD3ε, NLRC5 и СИТА; (20) CD3ε, NLRC5 и RFX5; (21) CD3ε, NLRC5 и RFXAP; (22) CD3ε, NLRC5 и RFXANK; (23) CD3ε, NLRC5 и HLA-DM; (24) CD3ε, NLRC5 и Ii-цепи; (25) CD3ε, TAPBP и СИТА; (26) CD3ε, TAPBP и RFX5; (27) CD3ε, TAPBP и RFXAP; (28) CD3ε, TAPBP и RFXANK; (29) CD3ε, TAPBP и HLA-DM; или (30) CD3ε, TAPBP и Ii-цепи.

[0109] В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка характеризуется снижением или устранением экспрессии генов: (1) CD3δ, B2M и СИТА; (2) CD3δ, B2M и RFX5; (3) CD3δ, B2M и RFXAP; (4) CD3δ, B2M и RFXANK; (5) CD3δ, B2M и HLA-DM; (6) CD3δ, B2M и Ii-цепи; (7) CD3δ, TAP1 и СИТА; (8) CD3δ, TAP1 и RFX5; (9) CD3δ, TAP1 и RFXAP; (10) CD3δ, TAP1 и RFXANK; (11) CD3δ, TAP1 и HLA-DM; (12) CD3δ, TAP1 и Ii-цепи; (13) CD3δ, TAP2 и СИТА; (14) CD3δ, TAP2 и RFX5; (15) CD3δ, TAP2 и RFXAP; (16) CD3δ, TAP2 и RFXANK; (17) CD3δ, TAP2 и HLA-DM; (18) CD3δ, TAP2 и Ii-цепи; (19) CD3δ, NLRC5 и СИТА; (20) CD3δ, NLRC5 и RFX5; (21) CD3δ, NLRC5 и RFXAP; (22) CD3δ, NLRC5 и RFXANK; (23) CD3δ, NLRC5 и HLA-DM; (24) CD3δ, NLRC5 и Ii-цепи; (25) CD3δ, TAPBP и СИТА; (26) CD3δ, TAPBP и RFX5; (27) CD3δ, TAPBP и RFXAP; (28) CD3δ, TAPBP и RFXANK; (29) CD3δ, TAPBP и HLA-DM; или (30) CD3δ, TAPBP и Ii-цепи.

[0110] В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка характеризуется снижением или устранением экспрессии генов: (1) CD3γ, B2M и СИТА; (2) CD3γ, B2M и RFX5; (3) CD3γ, B2M и RFXAP; (4) CD3γ, B2M и RFXANK; (5) CD3γ, B2M и HLA-DM; (6) CD3γ, B2M и Ii-цепи; (7) CD3γ, TAP1 и СИТА; (8) CD3γ, TAP1 и RFX5; (9) CD3γ, TAP1 и RFXAP; (10) CD3γ, TAP1 и RFXANK; (11) CD3γ, TAP1 и HLA-DM; (12) CD3γ, TAP1 и Ii-цепи; (13) CD3γ, TAP2 и СИТА; (14) CD3γ, TAP2 и RFX5; (15) CD3γ, TAP2 и RFXAP; (16) CD3γ, TAP2 и RFXANK; (17) CD3γ, TAP2 и HLA-DM; (18) CD3γ, TAP2 и Ii-цепи; (19) CD3γ, NLRC5 и СИТА; (20) CD3γ, NLRC5 и RFX5; (21) CD3γ, NLRC5 и RFXAP; (22) CD3γ, NLRC5 и RFXANK; (23) CD3γ, NLRC5 и HLA-DM; (24) CD3γ, NLRC5 и Ii-цепи; (25) CD3γ, TAPBP и СИТА; (26) CD3γ, TAPBP и RFX5; (27) CD3γ, TAPBP

и RFXAP; (28) CD3 γ , TAPBP и RFXANK; (29) CD3 γ , TAPBP и HLA-DM; или (30) CD3 γ , TAPBP и Ii-цепи

[0111] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка согласно настоящему изобретению представляет собой Т-клетку, естественный киллер (НК-клетку), естественный Т-киллер (НКТ), лимфоидную клетку-предшественника, гематопозитическую стволовую клетку, стволовую клетку, макрофаг или дендритную клетку. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка представляет собой модифицированную нестимулированную иммунную клетку или ее клетку-предшественника. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка представляет собой модифицированную нестимулированную Т-клетку, модифицированную нестимулированную НК-клетку или модифицированную нестимулированную НКТ-клетку. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка представляет собой CD4+ Т-клетку или CD8+ Т-клетку. В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка представляет собой аллогенную Т-клетку или аутологичную Т-клетку человека. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка представляет собой клетку человека или клетку млекопитающего.

В. Модифицированные иммунные клетки

[0112] В одном аспекте настоящего изобретения предложена выделенная модифицированная Т-клетка, содержащая по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). В настоящем документе термин «функционально неполноценный полипептид» означает, что указанный полипептид мутирован (например, содержит делецию, инсерцию или представляет собой укороченный вариант), так что он не может легко связываться с другими компонентами комплекса TCR или встраиваться в комплекс TCR. В некоторых вариантах реализации функционально неполноценный полипептид приводит к получению функционально неполноценного TCR или подавляет экспрессию функционального TCR на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации неполноценный полипептид может представлять собой доминантно-негативный

полипептид, по существу ингибирующий активность комплекса TCR. Модифицированная Т-клетка, содержащая указанный функционально неполноценный полипептид, представляет собой Т-клетку с дефектом TCR, не продуцирующую функционального TCR или экспрессирующую очень небольшое количество функционального TCR на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации неполноценный полипептид представляет собой компонент сигнального комплекса TCR. В некоторых вариантах реализации неполноценный полипептид модулирует образование функционального TCR. В некоторых вариантах реализации неполноценный полипептид содержит мутацию, которая влияет на функцию или экспрессию функционального белка. В некоторых вариантах реализации указанная мутация представляет собой делецию, инсерцию, замену или их комбинацию. В некоторых вариантах реализации неполноценный полипептид является результатом экспрессии продукта дефектного гена или отсутствия экспрессии желательного гена или продукта гена.

[0113] Правильное функционирование TCR требует надлежащего стехиометрического соотношения белков, составляющих комплекс TCR. Как показано на **фиг. 1**, комплекс TCR содержит вариабельную цепь TCR-альфа (TCR- α , TRAC) и цепь TCR-бета (TCR- β , TRBC), которые связаны с тремя димерными модулями CD3 δ /CD3 ϵ , CD3 γ /CD3 ϵ и CD3 ζ /CD3 ζ . Указанные три димерных модуля являются неотъемлемой частью сигнального пути TCR. Каждый рецептор CD3 содержит сигнальные мотивы, которые распространяют и усиливают активацию рецептора TCR при связывании гетеродимера TCR- α/β с лигандом МНС-пептид. При связывании лиганда с TCR $\alpha\beta$ субъединицы CD3 претерпевают конформационные изменения, и сигнальные мотивы (например, ITAM) в цитоплазматических хвостах CD3 фосфорилируются внутриклеточными протеинтирозинкиназами. Затем внутриклеточные сигнальные и адаптерные молекулы, содержащие SH2-домен, рекрутируются на плазматическую мембрану, где они усиливают сигнал активации TCR, непосредственно взаимодействуя с сигнальными мотивами CD3. Следовательно, в то время как гетеродимер TCR $\alpha\beta$ отвечает за связывание антигена, субъединицы CD3 служат элементами, передающими сигнал. Таким образом, если один из необходимых рецепторов CD3 отсутствует или является неполноценным, комплекс TCR функционально дестабилизирован или, по меньшей мере, сигнальная функция TCR ослаблена. Безотносительно к теоретическим представлениям, для поверхностной

экспрессии и/или функционирования комплекса TCR требуется скоординированная экспрессия всех шести белков.

[0114] Каждый компонент комплекса TCR необходим для сборки комплекса TCR на поверхности клетки. Потеря одного компонента комплекса TCR может привести к потере экспрессии TCR на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации потеря одного компонента может не препятствовать поверхностной экспрессии комплекса TCR. В таких вариантах реализации, несмотря на возможную частичную или даже полную сохранность экспрессии TCR, именно функция рецептора TCR определяет, индуцирует ли рецептор TCR иммунный ответ. В настоящем изобретении рассматривается функциональный дефект, а не отсутствие полного комплекса TCR на поверхности клетки. Безотносительно к теоретическим представлениям, чем ниже экспрессия TCR, тем менее вероятность перекрестного связывания с TCR, достаточного для активации Т-клеток через комплекс TCR.

[0115] В некоторых вариантах реализации выделенная модифицированная Т-клетка содержит два или более функционально неполноценных полипептида. В таких вариантах реализации один неполноценный полипептид может представлять собой α -цепь Т-клеточного рецептора (TRAC). В отсутствие TRAC комплекс TCR остается внутри клетки и не транслоцируется в плазматическую мембрану. Более того, рецептор TCR без TRAC нестабилен и может быстро распадаться. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка содержит три или более функционально неполноценных полипептидов, выбранных из TRAC, TRBC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или инвариантной (Ii) цепи. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка содержит два функционально неполноценных полипептида, выбранных из CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка содержит три функционально неполноценных полипептида, выбранных из CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка содержит функционально неполноценный полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 γ , и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC,

TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи. В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная Т-клетка содержит по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 γ , и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи.

[0116] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка содержит (a) по меньшей мере один из функционально неполноценных CD3 δ , CD3 ϵ и/или CD3 γ и (b) по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка содержит два или более функционально неполноценных полипептида, выбранных из TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи.

[0117] В некоторых вариантах реализации указанный функционально неполноценный полипептид снижает экспрессию белка. В таком варианте реализации модифицированная Т-клетка характеризуется сниженной экспрессией TRAC, TRBC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, Ii-цепи или любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации функционально неполноценный полипептид представляет собой отсутствие экспрессии кодирующего гена. В таком варианте реализации модифицированная Т-клетка не экспрессирует CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, Ii цепь или любую их комбинацию.

[0118] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка, характеризующаяся сниженной экспрессией и/или отсутствием экспрессии полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, Ii-цепи, дополнительно содержит функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, TRBC, B2M и C2TA. В таком варианте реализации модифицированная Т-клетка характеризуется сниженной экспрессией TRAC, TRBC, B2M или C2TA и/или не экспрессирует TRAC, TRBC, B2M или C2TA.

[0119] В некоторых вариантах реализации модификация CD3 δ , CD3 ϵ и/или CD3 γ приводит к нарушению функции рецепторного комплекса TCR/CD3. В некоторых вариантах реализации функционально неполноценный полипептид, рассматриваемый в настоящем изобретении, получают с использованием технологии редактирования генов. В некоторых вариантах реализации указанное редактирование генов выбрано из группы, состоящей из эндонуклеазной системы, ассоциированной с CRISPR (CRISPR-Cas), системы редактирования генов TALEN, системы редактирования генов на основе нуклеаз с мотивом "цинковый палец" (ZFN), мегануклеазной системы редактирования генов или системы редактирования генов мега-TALEN, антисмысловой РНК, антигомерной РНК, РНКи, миРНК и кшРНК. В некоторых вариантах реализации CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ модифицируют путем адресного воздействия на один или более экзонов CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ , необязательно экзон 1 CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ .

[0120] Определить, экспрессирует ли Т-клетка функциональный TCR, можно с использованием известных способов анализа, например, известных в данной области техники или описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации экспрессию TCR $\alpha\beta$ и CD3 можно оценить посредством проточной цитометрии и количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР-РВ). Экспрессию мРНК TCR- α , TCR- β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ и CD3- ζ можно проанализировать с помощью кПЦР-РВ с использованием прибора ABI7300 для ПЦР в реальном времени и ген-специфичных праймеров TAQMAN® с использованием способов, аналогичных используемым в статье Sentman et al., *J. Immunol.* 173:6760-6766 (2004). Изменения экспрессии на клеточной поверхности можно определить с использованием антител, специфичных по отношению к TCR- α , TCR- β , CD3 ϵ , CD8, CD4, CD5 и CD45. Для проверки экспрессии TCR/CD3 с помощью проточной цитометрии используют меченные флуорохромом антитела против конкретных субъединиц комплекса TCR. В некоторых вариантах реализации живые клетки окрашивают, например, антителами против CD5, CD8 и CD4 в комбинации с антителом против CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ . При использовании экспрессии генов CD3 или TCR экспрессия как белков TCR, так и белков CD3 должна быть сильно снижена в модифицированной Т-клетке по сравнению с немодифицированной Т-клеткой или Т-клеткой, экспрессирующей контрольный вектор. Для контроля фоновой флуоресценции используют изотипические контрольные антитела.

[0121] Для определения достаточности экспрессии функционально неполноценного полипептида в модифицированной Т-клетке для изменения функции TCR и/или функции модифицированной Т-клетки, указанную модифицированную Т-клетку тестируют на предмет: (1) выживаемости клеток *in vitro*; (2) пролиферации в присутствии аллогенных МПК, обработанных митомицином С; и/или (3) продукции цитокинов в ответ на аллогенные МПК, мАт против CD3 или мАт против TCR.

[0122] Для проверки функционального дефекта комплекса TCR можно использовать отсутствие продукции ключевых эффекторных цитокинов, которые стимулируют размножение Т-клеток. Например, эффект стимуляции модифицированных Т-клеток антителом против CD3 можно применять для определения продукции интерлейкина-2 (ИЛ-2) и/или интерферона-гамма (ИФН).

[0123] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка, содержащая функционально неполноценный полипептид, демонстрирует сниженную экспрессию Т-клеточного рецептора по сравнению с немодифицированной Т-клеткой. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка, содержащая функционально неполноценный полипептид, демонстрирует сниженную экспрессию указанного неполноценного полипептида. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка, содержащая функционально неполноценный полипептид, демонстрирует полное отсутствие поверхностной экспрессии комплекса Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка, содержащая функционально неполноценный полипептид, демонстрирует сниженное или недостаточное перекрестное связывание Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка экспрессирует некоторые или все субъединицы TCR, которые могут находиться на поверхности клетки. Без наличия функционального TCR на поверхности полноценная активация модифицированной Т-клетки невозможна. Таким образом, модифицированная Т-клетка, рассматриваемая в настоящем изобретении, не может вызвать нежелательной реакции при введении в организм-хозяина. В результате модифицированная Т-клетка не может вызывать РТПХ или РХПТ, поскольку указанная модифицированная Т-клетка не может передавать сигнал от молекул МНС хозяина.

[0124] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка при ее введении

субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызываемым немодифицированной Т-клеткой, введенной тому же субъекту. Модифицированную Т-клетку согласно настоящему изобретению можно применять во всех вариантах применения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах реализации модифицированную Т-клетку применяют в любых способах или композициях, где желательна Т-клеточная терапия. В некоторых вариантах реализации модифицированную Т-клетку согласно настоящему изобретению можно применять для ослабления, облегчения, профилактики или лечения рака, РТПХ, отторжения трансплантата, инфекции, одного или более аутоиммунных расстройств, лучевой болезни или других заболеваний или состояний.

IV. СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ

A. CRISPR

[0125] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка согласно настоящему изобретению представляет собой модифицированную иммунную клетку, подвергавшуюся редактированию генов. В некоторых вариантах реализации инсерция и/или делеция в одном или более локусов генов, каждый из которых кодирует эндогенный иммунологический белок согласно настоящему изобретению, является результатом редактирования генов. В конкретных вариантах реализации ген, кодирующий CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, B2M, CИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепь, модифицируют с помощью системы редактирования генов. В некоторых случаях система редактирования генов содержит РНК-управляемую нуклеазу, например, система на основе нуклеиновой кислоты с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами (CRISPR)-Cas. Система CRISPR (также называемая в настоящем документе системой CRISPR-Cas, системой Cas или системой CRISPR/Cas) содержит эндонуклеазу Cas и направляющую нуклеотидную последовательность, специфичную по отношению к гену-мишени, которая после введения в клетку образует комплекс, позволяющий эндонуклеазе Cas вводить разрыв (например, двуцепочечный разрыв) в ген-мишень. В некоторых вариантах реализации модифицированную иммунную клетку редактируют с использованием CRISPR/Cas9 с целью повреждения одного или более эндогенных иммунологических белков.

[0126] В некоторых вариантах реализации систему CRISPR-Cas применяют для повреждения одного или более из эндогенных CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи, что приводит к подавлению экспрессии гена CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи. В некоторых вариантах реализации инсерция и/или делеция, способная подавлять экспрессию одного или более эндогенных иммунологических белков, подавляет экспрессию одного или более эндогенных белков, выбранных из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи. В некоторых вариантах реализации каждая из инсерций и/или делеций, способных подавлять экспрессию генов, содержит систему, связанную с CRISPR. В некоторых вариантах реализации система, относящаяся к CRISPR, представляет собой CRISPR-ассоциированную эндонуклеазу Cas и направляющую РНК.

[0127] В некоторых вариантах реализации эндонуклеаза Cas включает эндонуклеазу Cas9. В некоторых случаях эндонуклеаза Cas9 получена из или основана на, например, молекуле Cas9 *S. pyogenes* (например, SpCas9), *S. thermophiles*, *Staphylococcus aureus* (например, SaCas9) или *Neisseria meningitidis*. В некоторых случаях эндонуклеаза Cas9 получена из или основана на, например, молекуле Cas9 *Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces sp.*, *cycliphilus denitrificans*, *Aminomonas paucivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides sp.*, *Blastopirellula marina*, *Bradyrhizobium sp.*, *Brevibacillus latensporus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lad*, *Candidatus Puniceispirillum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium matruchotii*, *Dinoroseobacter sliibae*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium dolichum*, *gamma proteobacterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Ilyobacter polytropus*, *Kingella kingae*, *Lactobacillus crispatus*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, бактерия семейства *Listeriaceae*, *Methylocystis sp.*, *Methylosinus trichosporium*, *Mobiluncus mulieris*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria sp.*, *Neisseria wadsworthii*, *Nitrosomonas sp.*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Pasteurella multocida*,

Phascolarctobacterium succinatutens, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum* sp., *Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas* sp., *Sporolactobacillus vineae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus* sp., *Subdoligranulum* sp., *Tisrella mobilis*, *Treponema* sp. или *Verminephrobacter eiseniae*.

[0128] В некоторых вариантах реализации эндонуклеаза Cas9 получена из молекулы Cas9: *S. pyogenes* (например, штамма SF370, MGAs 10270, MGAs 10750, MGAS2096, MGAS315, MGAS5005, MGAS6180, MGAS9429, NZ131 и SSI-1), *S. thermophilus* (например, штамма LMD-9), *S. pseudoporcinus* (например, штамма SPIN 20026), *S. mutans* (например, штамма UA 159, NN2025), *S. macacae* (например, штамма NCTC1 1558), *S. gallolyticus* (например, штамма UCN34, ATCC BAA-2069), *S. equines* (например, штамма ATCC 9812, MGCS 124), *S. dysdalactiae* (например, штамма GGS 124), *S. bovis* (например, штамма ATCC 700338), *S. cmginosus* (например, штамма F021 1), *S. agalactia* (например, штамма NEM316, A909), *Listeria monocytogenes* (например, штамма F6854), *Listeria innocua* (*L. innocua*, например, штамма Clp 11262), *Enterococcus italicus* (например, штамма DSM 15952) или *Enterococcus faecium* (например, штамма 1,23,408).

[0129] В некоторых случаях эндонуклеаза включает Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, Cas9 *S. pyogenes*, Cas9 *Staphylococcus aureus*, нуклеазу MAD7 (CRISPR-нуклеазу V типа) или любую их комбинацию.

В. Направляющие РНК

[0130] В некоторых вариантах реализации направляющая нуклеиновая кислота представляет собой молекулу направляющей РНК (нРНК), направляющую комплекс Cas-РНК к последовательности-мишени. В некоторых случаях указанное направление осуществляют путем гибридизации фрагмента нРНК с ДНК (например, посредством домена нРНК, обеспечивающего адресное воздействие) и путем связывания фрагмента молекулы нРНК с РНК-управляемой нуклеазой или другой эффекторной молекулой (например, посредством по меньшей мере *trans*-нРНК). В некоторых вариантах реализации молекула нРНК состоит из одной непрерывной полинуклеотидной молекулы, называемой в настоящем документе «одиночной направляющей РНК» («онРНК»). В других вариантах

реализации молекула нРНК состоит из множества, обычно двух, полинуклеотидных молекул, которые сами способны ассоциировать, как правило, посредством гибридизации, и такая молекула в настоящем документе называется «двойной направляющей РНК» («днРНК»).

[0131] В некоторых случаях молекула нРНК содержит crРНК и tracr, которые необязательно могут находиться на одном полинуклеотиде или на отдельных полинуклеотидах. В некоторых случаях crРНК содержит домен, обеспечивающий адресное воздействие, и область, взаимодействующую с tracr с образованием флагштоковой области. tracr содержит фрагмент молекулы нРНК, связывающийся с нуклеазой или другой эффекторной молекулой. В некоторых вариантах реализации tracr содержит нуклеотидную последовательность, специфично связывающуюся с эндонуклеазой Cas (например, Cas9). В некоторых вариантах реализации tracr содержит нуклеотидную последовательность, образующую часть флагштока. В некоторых вариантах реализации домен, обеспечивающий адресное воздействие, представляет фрагмент часть молекулы нРНК, который распознает, например, является комплементарным последовательности протоспейсера в ДНК-мишени.

[0132] Мотив, примыкающий к протоспейсеру (PAM), представляет собой последовательность ДНК из 2-6 пар оснований, расположенную рядом с 3'-концом протоспейсера и распознаваемую эндонуклеазой Cas. В некоторых случаях каждая эндонуклеаза Cas распознает конкретную последовательность PAM. Типичные последовательности PAM включают последовательность NGG, распознаваемую эндонуклеазой Cas9 *S. pyogenes*; или последовательность NGGNG или NNAGAAW, распознаваемую эндонуклеазой Cas9 *S. thermophilus*, где N представляет собой любой нуклеотид. Специалисты в данной области техники должны понимать, как сконструировать молекулу нРНК на основе специфической эндонуклеазы Cas, используемой вместе с последовательностью PAM, которую распознает эндонуклеаза Cas.

[0133] В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, в достаточной степени комплементарную последовательности-мишени локуса эндогенного иммунологического белка, выбранного из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C1ТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). В некоторых вариантах реализации

направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в пределах одного или более локусов генов, каждый из которых кодирует иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). В некоторых вариантах реализации направляющая РНК комплементарна последовательности в пределах одного или более экзонов CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ . В некоторых вариантах реализации направляющая РНК комплементарна последовательности в пределах экзона 1 CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ . В некоторых вариантах реализации нуклеотидная последовательность нРНК CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или инвариантной цепи (Ii-цепи) содержит нуклеотидную последовательность, описанную в таблице 4.

[0134] В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена CD3 δ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена CD3 ϵ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена CD3 γ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена B2M, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена CИТА (C2TA), и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена TAP1, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в

локусе гена TAP2, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена TAPBP, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена NLRC5, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена HLA-DM, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена RFX5, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 или их комбинации. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена RFXANK, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена RFXAP, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах реализации направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в локусе гена Ii-цепи, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или любой их комбинации.

[0135] В некоторых вариантах реализации одну или более, две или более, три или более или четыре или более направляющих нуклеиновых кислоты (например, молекулы направляющей РНК) трансфицируют в иммунную клетку с эндонуклеазой Cas. В некоторых случаях приблизительно одну, две или три направляющие нуклеиновые кислоты (например, молекулы направляющей РНК) трансфицируют в иммунную клетку с эндонуклеазой Cas. В некоторых случаях приблизительно три направляющие нуклеиновые

кислоты (например, молекулы направляющей РНК) трансфицируют в иммунную клетку с эндонуклеазой Cas. В некоторых случаях приблизительно две направляющие нуклеиновые кислоты (например, молекулы направляющей РНК) трансфицируют в иммунную клетку с эндонуклеазой Cas. В некоторых случаях приблизительно одну направляющую нуклеиновую кислоту (например, молекулу направляющей РНК) трансфицируют в иммунную клетку с эндонуклеазой Cas.

[0136] В некоторых вариантах реализации вектор управляет экспрессией системы CRISPR. Данная область техники изобилует подходящими векторами, которые можно применять в настоящем изобретении. Используемые векторы подходят для репликации и, необязательно, встраивания в эукариотические клетки. Типичные векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии желательной нуклеотидной последовательности. Векторы согласно настоящему изобретению также можно применять для стандартных протоколов доставки генов и нуклеиновых кислот. Способы доставки генов известны в данной области техники. Кроме того, вектор может быть представлен в виде вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al., 4th Edition, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2012; и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно применять в качестве векторов, включают ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, вирус Синдбис, гамма-ретровирус и лентивирусы, но не ограничиваются ими. Безотносительно к теоретическим представлениям, подходящий вектор содержит сайт инициации репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, подходящие сайты эндонуклеаз рестрикции и один или более маркеров селекции. В некоторых вариантах реализации система CRISPR/Cas содержит экспрессирующий вектор. В некоторых вариантах реализации система CRISPR/Cas содержит вектор pAd5/F35-CRISPR.

C. TALEN

[0137] В некоторых вариантах реализации система редактирования генов представляет собой систему редактирования генов TALEN. TALEN получают искусственно путем

соединения эффекторного ДНК-связывающего домена TAL с доменом расщепления ДНК. Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), можно конструировать таким образом, чтобы они связывались с ДНК-мишенью. Посредством объединения сконструированного TALE с доменом расщепления ДНК можно получить фермент рестрикции, специфичный по отношению к любой последовательности-мишени ДНК.

[0138] TALE представляют собой белки, секретируемые бактериями *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен содержит повторяющуюся высококонсервативную последовательность из 33-34 аминокислот, за исключением 12-й и 13-й аминокислот. Эти два положения являются сильно изменчивыми, демонстрируют выраженную корреляцию со специфичным распознаванием нуклеотидов, и, таким образом, их можно конструировать с целью связывания с последовательностью-мишенью ДНК.

[0139] Для получения TALEN белок TALE объединяют с нуклеазой (N), включая, например, эндонуклеазу FokI дикого типа или мутированную эндонуклеазу FokI. Домен FokI функционирует как димер, требующий двух конструкторов с уникальными ДНК-связывающими доменами для действия на сайты, расположенные с надлежащей ориентацией и расстоянием в геноме-мишени. Специфичность и нецелевой эффект можно модулировать путем изменения количества аминокислотных остатков между ДНК-связывающим доменом TALE и доменом расщепления FokI и количества оснований между двумя отдельными сайтами связывания TALEN.

D. Нуклеаза с мотивом "цинковый палец"

[0140] В некоторых вариантах реализации система редактирования генов представляет собой систему редактирования генов на основе нуклеазы с мотивом "цинковый палец" (ZFN). Нуклеаза с мотивом "цинковый палец" представляет собой искусственную нуклеазу, которую можно применять для модификации одного или более сайтов нуклеотидной последовательности-мишени. Подобно системе редактирования TALEN, ZFN содержит домен нуклеазы FokI (или его производное), присоединенный к ДНК-связывающему домену. В случае ZFN ДНК-связывающий домен содержит один или более мотивов "цинковый палец". "Цинковый палец" представляет собой небольшой структурный белковый мотив, стабилизированный одним или более ионами цинка. "Цинковый палец" может содержать, например, Cys2His2 и может распознавать последовательность из

приблизительно 3 п.о. Различные мотивы "цинковый палец" с известной специфичностью можно объединять, получая полипептиды с несколькими мотивами-"пальцами", распознающие последовательности из приблизительно 6, 9, 12, 15 или 18 п.о.

[0141] ZFN распознает непалиндромные сайты ДНК. Для расщепления сайта-мишени пара ZFN димеризуется и собирается в комплекс с противоположными цепями сайта-мишени. Доступны различные методики отбора и модульной сборки для получения мотивов "цинковый палец" (и их комбинаций), распознающих конкретные последовательности, включая фаговый дисплей, дрожжевые одногибридные системы, бактериальные одногибридные и двухгибридные системы и клетки млекопитающих.

Е. Мегануклеаза

[0142] В некоторых вариантах реализации система редактирования генов представляет собой мегануклеазную систему редактирования генов. Мегануклеаза представляет собой искусственную нуклеазу, распознающую сайты расщепления из 15-40 пар оснований. В некоторых случаях мегануклеазы группируют в семейства на основе их структурных мотивов, влияющих на нуклеазную активность и/или распознавание ДНК. Члены семейства LAGLIDADG характеризуются наличием одной или двух копий консервативного мотива LAGLIDADG. В некоторых случаях мегануклеазы LAGLIDADG с одной копией мотива LAGLIDADG образуют гомодимеры, тогда как члены с двумя копиями мотива LAGLIDADG встречаются в виде мономеров. Члены семейства GIY-YIG содержат модуль GP-YIG длиной 70-100 остатков, содержащий четыре или пять мотивов - консервативных последовательностей с четырьмя инвариантными остатками, два из которых необходимы для активности. Мегануклеазы с боксом His-Cys характеризуются высококонсервативной серией остатков гистидина и цистеина в области, охватывающей несколько сотен аминокислотных остатков. В семействе NHN члены определяются мотивами, содержащими две пары консервативных остатков гистидина, окруженные остатками аспарагина. Стратегии конструирования мегануклеаз с измененной специфичностью связывания ДНК (например, для связывания с заданной последовательностью нуклеиновой кислоты) известны в данной области техники.

[0143] В некоторых случаях мегануклеаза представляет собой гибридную нуклеазу, называемую megaTAL и содержащую домен TALE, присоединенный к N-концу

мегануклеазы. В некоторых случаях мегануклеаза является членом семейства LAGLIDADG.

[0144] В некоторых вариантах реализации система редактирования генов представляет собой систему сайленсинга генов. Типичная система сайленсинга генов содержит систему сайленсинга генов, опосредованного РНКи, миРНК или кшРНК.

V. ЭКЗОГЕННЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

[0145] В настоящем изобретении предложены модифицированные иммунные клетки или их клетки-предшественники, содержащие инсерцию и/или делецию в одном или более локусах генов, кодирующих эндогенный иммунологический белок, способную подавлять экспрессию указанного гена эндогенного иммунологического белка, и экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации экзогенная нуклеиновая кислота кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (KIR), антигенсвязывающий полипептид, лиганд рецептора клеточной поверхности или опухолевый антиген. В некоторых вариантах реализации описана модифицированная иммунная клетка, экспрессирующая экзогенный полипептид. В некоторых случаях экзогенная нуклеиновая кислота кодирует химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых случаях экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антигенсвязывающий полипептид. В некоторых случаях экзогенная нуклеиновая кислота кодирует иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (KIR). В дополнительных случаях экзогенная нуклеиновая кислота кодирует лиганд рецептора клеточной поверхности или опухолевый антиген.

А. Химерные антигенные рецепторы

[0146] Настоящее изобретение также включает модифицированную Т-клетку со сниженной экспрессией гена, описанного в настоящем документе, и с химерным антигенным рецептором (CAR). В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение охватывает модифицированную Т-клетку, содержащую CAR или нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, причем указанный CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и внутриклеточный сигнальный домен. Специалист в данной области техники может получить представление о любой модифицированной клетке, содержащей CAR, содержащий любой антигенсвязывающий домен, любой шарнир, любой трансмембранный домен, любой костимулирующий домен и любой внутриклеточный сигнальный домен, описанной в настоящем документе, и изготовить ее с учетом описания в настоящем документе.

[0147] Антигенсвязывающий домен может быть функционально связан с другим доменом CAR, например, трансмембранным доменом или внутриклеточным доменом, оба из которых описаны в настоящем документе, для экспрессии в иммунной клетке. В одном варианте реализации первая нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенсвязывающий домен, функционально связана со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей трансмембранный домен, и дополнительно функционально связана с третьей нуклеотидной последовательностью, кодирующей внутриклеточный домен.

[0148] Антигенсвязывающие домены, описанные в настоящем документе, можно объединять с любым из трансмембранных доменов, описанных в настоящем документе, любым из внутриклеточных доменов или цитоплазматических доменов, описанных в настоящем документе, или любым из других доменов, описанных в настоящем документе, которые могут входить в состав CAR согласно настоящему изобретению. Рассматриваемый CAR согласно настоящему изобретению также может содержать спейсерный домен, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации каждый из антигенсвязывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного домена отделен линкером.

1. Антигенсвязывающий домен

[0149] Антигенсвязывающий домен CAR представляет собой внеклеточную область CAR для связывания со специфичным антигеном-мишенью, включая белки, углеводы и гликолипиды. В некоторых вариантах реализации CAR обладает сродством к антигену-мишени (например, опухоль-ассоциированному антигену) на клетке-мишени (например, раковой клетке). Антиген-мишень может включать белок любого типа или его эпитоп, ассоциированный с клеткой-мишенью. Например, CAR может обладать сродством к антигену-мишени на клетке-мишени, который указывает на определенный статус клетки-мишени.

[0150] В настоящем изобретении CAR согласно настоящему изобретению, обладающий сродством к специфичному антигену-мишени на клетке-мишени, может содержать мишень-специфичный связывающий домен. В некоторых вариантах реализации указанный мишень-специфичный связывающий домен представляет собой мишень-специфичный связывающий домен мыши, например, мишень-специфичный связывающий домен мышиноного происхождения. В некоторых вариантах реализации указанный мишень-специфичный связывающий домен представляет собой мишень-специфичный связывающий домен человека, например, мишень-специфичный связывающий домен человеческого происхождения.

[0151] Антигенсвязывающий домен может включать любой домен, связывающийся с антигеном, и может включать моноклональное антитело, поликлональное антитело, синтетическое антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, антитело животного, не являющегося человеком, и любой их фрагмент, но не ограничивается ими. Таким образом, в одном варианте реализации фрагмент антигенсвязывающего домена содержит антитело млекопитающего или его фрагмент. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий домен содержит полноразмерное антитело. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий фрагмент (Fab), например, Fab, Fab', F(ab')₂, моноспецифичный Fab₂, биспецифичный Fab₂, триспецифичный Fab₂, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), dAb, тандемный scFv, V_HH, V-Nar, антитело верблюдовых, диатело, миниантитело, триатело или тетратело.

[0152] В некоторых вариантах реализации CAR согласно настоящему изобретению может обладать сродством к одному или более антигенам-мишеням на одной или более

клетках-мишенях. В некоторых вариантах реализации CAR может обладать сродством к одному или более антигенам-мишеням на одной клетке-мишени. Согласно таким вариантам реализации CAR представляет собой биспецифичный CAR или мультиспецифичный CAR. В некоторых вариантах реализации CAR содержит один или более мишень-специфичных связывающих доменов, придающих ему сродство к одному или более антигенам-мишеням. В некоторых вариантах реализации CAR содержит один или более мишень-специфичных связывающих доменов, придающих ему сродство к одному и тому же антигену-мишени. Например, CAR, содержащий один или более мишень-специфичных связывающих доменов, обладающих сродством к одному и тому же антигену-мишени, может связывать различные эпитопы указанного антигена-мишени. Если в CAR присутствует множество мишень-специфичных связывающих доменов, указанные связывающие домены могут быть расположены в тандеме и могут быть разделены линкерными пептидами. Например, в CAR, содержащем два мишень-специфичных связывающих домена, указанные связывающие домены ковалентно связаны друг с другом на одной полипептидной цепи, связаны через полипептидный линкер, шарнирную область Fc или мембранную шарнирную область.

[0153] В настоящем документе термин «одноцепочечный вариабельный фрагмент» или «scFv» представляет собой гибридный белок, состоящий из вариабельных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулина (например, мыши или человека), ковалентно связанных с образованием гетеродимера VH:VL. Тяжелая (VH) и легкая (VL) цепи соединены непосредственно, либо соединены посредством линкера или спейсера, кодирующих пептид, соединяющий N-конец VH с C-концом VL или C-конец VH с N-концом VL. Термины «линкер» и «спейсер» в настоящем документе используются взаимозаменяемо. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий домен (например, Tn-MUC1-связывающий домен, PSMA-связывающий домен или мезотелин-связывающий домен) содержит scFv, конфигурация которого от N-конца до C-конца представляет собой VH - линкер - VL. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий домен (например, Tn-MUC1-связывающий домен, PSMA-связывающий домен или мезотелин-связывающий домен) содержит scFv, конфигурация которого от N-конца до C-конца представляет собой VL - линкер - VH. Специалисты в данной области техники могут выбрать подходящую конфигурацию для применения в настоящем изобретении.

[0154] Линкер, как правило, богат глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости. Линкер может связывать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров описаны в источниках Shen et al., *Anal. Chem.* 80(6):1910-1917 (2008) и WO 2014/087010. В данной области техники известны различные линкерные последовательности, включая, без ограничения, глицин-сериновые (GS) линкеры, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 47), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 48) и (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 49), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1. Типичные линкерные последовательности могут содержать аминокислотные последовательности, включая, без ограничения, GSGG (SEQ ID NO: 29), GSGGG (SEQ ID NO: 30), GSGSG (SEQ ID NO: 31), GSGGG (SEQ ID NO: 32), GGGSG (SEQ ID NO: 33), GSSSG (SEQ ID NO: 34), GGGGS (SEQ ID NO: 49) или GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 50) и т.п. Специалисты в данной области техники могут выбрать подходящую линкерную последовательность для применения в настоящем изобретении. В одном варианте реализации антигенсвязывающий домен (например, Tn-MUC1-связывающий домен, PSMA-связывающий домен или мезотелин-связывающий домен) согласно настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем VH и VL разделены линкерной последовательностью, обладающей аминокислотной последовательностью GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 50). В некоторых вариантах реализации нуклеотидная последовательность линкера содержит нуклеотидную последовательность GGTGGCGGTGGCTCGGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCT (SEQ ID NO: 51).

[0155] Несмотря на удаление константных областей и внедрение линкера, белки scFv сохраняют специфичность исходного иммуноглобулина. Одноцепочечные антитела на основе полипептида Fv могут экспрессироваться с нуклеиновой кислоты, содержащей последовательности, кодирующие VH и VL, описанные в статье Huston, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988). Описаны антагонистические scFv, обладающие ингибирующей активностью. См., например, Zhao et al., *Hybridoma (Larchmt)*, 27(6):455-51 (2008). Описаны агонистические scFv, обладающие стимулирующей активностью. См., например, Peter et al., *J. Biol. Chem.*, 25278(38):36740-7 (2003).

[0156] В настоящем документе термин «Fab» относится к фрагменту структуры

антитела, связывающемся с антигеном, но являющемся одновалентным и не содержащему Fc-фрагмента; например, антитело, расщепленное ферментом папаином, дает два Fab-фрагмента и Fc-фрагмент (например, константную область тяжелой (H) цепи; Fc-область, не связывающуюся с антигеном).

[0157] В некоторых случаях антигенсвязывающий домен можно получить из того же вида животных, в котором в конечном итоге будет использоваться CAR. Например, для применения у человека антигенсвязывающий домен CAR может содержать антитело человека, описанное в другом месте настоящего документа, или его фрагмент.

[0158] Соответственно, можно сконструировать иммунную клетку, например, полученную способом, описанным в настоящем документе, для экспрессии CAR, мишенью которого является один из следующих антигенов, ассоциированных с раком (опухолевых антигенов): CD19; CD20; CD22 (Siglec 2); CD37; CD 123; CD22; CD30; CD 171; CS-1 (также называемого подмножеством 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы-1 типа C (CLL-1 или CLECL1); CD33; CD133; рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII); рецептора эпидермального фактора роста человека (HER1); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1 -4) bDGlcp (1- 1)Cer); члена семейства рецепторов ФНО, антигена созревания В-клеток (BCMA); Тn-антигена ((Тn Ag) или (GalNAca-Ser/Thr)); простата-специфичного мембранного антигена (PSMA); орфанного рецептора 1, подобного рецепторной тирозинкиназе (ROR1); Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); V7H3 (CD276); KIT (CD117); альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (ИЛ-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; альфа-рецептора интерлейкина-11 (ИЛ-11Ra); антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA); сериновой протеазы-21 (тестизина или PRSS21); рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2); антигена Льюиса(Y); CD24; бета-рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR-бета); стадия-специфичного эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); альфа-рецептора фолатов; рецепторной тирозинпротеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, ассоциированного с клеточной поверхностью (MUC 1); GalNAca1-O-Ser/Thr (Тn) MUC 1 (ТnMUC1); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простазы; кислой фосфатазы предстательной железы

(PAP); мутированного фактора 2 элонгации (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы протеасомы 9 (мультикаталитической протеазы просомы) бета-типа (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); онкогенного гибридного белка, состоящего из кластерной области точечных разрывов (BCR) и гомолога 1 онкогена вируса лейкоза мышей Абельсона (Abl) (bcg-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа A (EphA2); фукозил-GM1; сиалированной молекулы адгезии Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4) bDGlc (1-1)Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); ганглиозида о-ацетил-GD2 (OAcGD2); бета-рецептора фолатов; опухолевого эндотелиального маркера 1 (TEM1/CD248); опухолевого эндотелиального маркера 7 (TEM7R); клаудина 6 (CLDN6); рецептора тиреотропина (TSHR); члена D группы 5 класса C рецепторов, связанных с G-белком (GPRC5D); продукта открытой рамки считывания 61 X хромосомы (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; плацента-специфического белка 1 (PLAC1); гексасахаридного фрагмента гликоцерамида globoH (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); тирозинпротеинкиназы Met (c-Met); клеточного рецептора 1 вируса гепатита A (HAVCR1); бета-адренорецептора 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); рецептора 20, связанного с G-белком (GPR20); локуса K 9 комплекса лимфоцитарного антигена 6 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка-продукта альтернативной рамки считывания TCR-гамма (TARP); опухолевого белка Вильмса (WT1); ракового антигена/антигена яичек 1 (NY-ESO-1); ракового антигена/антигена яичек 2 (LAGE-la); меланома-ассоциированного антигена 1 (MAGE-A1); транслокационного варианта 6 гена ETS, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-AML); белка 17 сперматозоидов (SPA17); члена 1A семейства X-антигенов (XAGE1); ангиопозтин-связывающего рецептора клеточной поверхности 2 (Tie 2); антигена меланомы / яичек-1 (MAD-CT-1); антигена меланомы / яичек-2 (MAD-CT-2); антигена 1, родственного Fos; опухолевого белка p53 (p53); мутантного p53; простеина; белка, ассоциированного с выживанием; теломеразы; опухолевого антигена-1 карциномы предстательной железы (PSTA-1 или галектина 8), антигена меланомы 1, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутантного белка саркомы крысы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); белка,

связанного с точечными разрывами при транслокации, ассоциированной с саркомой; ингибитора апоптоза при меланоме (ML-IAP); ERG (гибридного гена сериновой трансмембранной протеазы 2 (TMPRSS2) и ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белок Pax-3, содержащего домен "парный бокс" (PAX3); рецептора андрогенов; циклина B 1; гомолога онкогена вирусного миелоцитоматоза птиц v-myc, полученного из нейробластомы (MYCN); члена C семейства гомологов Ras (RhoC); белка 2, родственного тирозиназе (Tgr-2); цитохрома P450 1B 1 (CYP1B 1); белка, подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с мотивом "цинковый палец") (BORIS или "брата регулятора сайтов импринтинга"), антигена плоскоклеточной карциномы 3, распознаваемого T-клетками (SART3); белка с доменом "парный бокс" Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TES 1); лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK); киназного якорного белка 4 (AKAP-4); белка точечных разрывов X 2 при синовиальной саркоме (SSX2); рецептора конечных продуктов расширенного гликирования (RAGE-1); белка 1, широко распространенного в почках (RU1); белка 2, широко распространенного в почках (RU2); легумаина; E6 вируса папилломы человека (E6 ВПЧ); E7 вируса папилломы человека (E7 ВПЧ); кишечной карбоксиэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; иммуноглобулиноподобного рецептора 1, ассоциированного с лейкоцитами (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подсемейства A лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LILRA2); члена f семейства белков, подобных молекуле CD300 (CD300LF); члена A семейства 12 белков, содержащих лектиновый домен типа C (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2, подобного рецепторам гормонов и муцину, содержащего EGF-подобный модуль (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-2 (GPC2); глипикана-3 (GPC3); NKG2D; KRAS; альфа-4 рецептора семейства GDNF (GFRA4); IL13Ra2; белка 5, подобного рецептору Fc (FCRL5); и полипептида 1, подобного иммуноглобулину лямбда (IGLL1).

[0159] В некоторых вариантах реализации иммунная клетка сконструирована для экспрессии CAR, мишенью которого являются CD19, CD20, CD22, BCMA, CD37, мезотелин, PSMA, PSCA, Tn-MUC1, EGFR, EGFRvIII, c-Met, HER1, HER2, CD33, CD133, GD2, GPC2, GPC3, NKG2D, KRAS или WT1.

2. Трансмембранный домен

[0160] В отношении трансмембранного домена CAR можно сконструировать таким образом, чтобы он содержал трансмембранный домен, соединяющий антигенсвязывающий домен CAR с внутриклеточным доменом. Трансмембранный домен рассматриваемого CAR представляет собой область, способную перекрывать плазматическую мембрану клетки (например, иммунной клетки или ее предшественника). Трансмембранный домен предназначен для встраивания в клеточную мембрану, например, мембрану эукариотической клетки. В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен расположен между антигенсвязывающим доменом и внутриклеточным доменом CAR.

[0161] В одном варианте реализации трансмембранный домен естественным образом ассоциирован с одним или более доменами в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем аминокислотной замены с целью избегания связывания таких доменов с трансмембранными доменами одного и того же или других поверхностных мембранных белков для минимизации взаимодействия с другими компонентами рецепторного комплекса.

[0162] В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен может иметь природное или синтетическое происхождение. Если его источник является естественным, указанный домен можно получить из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка, например, трансмембранного белка I типа. Если его источник является синтетическим, трансмембранный домен может представлять собой любую искусственную последовательность, облегчающую встраивание CAR в клеточную мембрану, например, искусственную гидрофобную последовательность. В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен, в особенности пригодный для применения в настоящем изобретении, включает, без ограничения, трансмембранный домен, полученный из (альфа, бета или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD2, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 и иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR). В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен содержит по меньшей мере трансмембранную область белка, выбранного из группы,

состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD2, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 и иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR). В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен может быть синтетическим. В некоторых вариантах реализации синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, например, лейцин и валин. В некоторых типичных вариантах реализации на каждом конце синтетического трансмембранного домена находится триплет фенилаланина, триптофана и валина.

[0163] Трансмембранные домены, описанные в настоящем документе, можно комбинировать с любым из антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе, любым из костимулирующих сигнальных доменов, описанных в настоящем документе, любым из внутриклеточных сигнальных доменов, описанных в настоящем документе, или любым из других доменов, описанных в настоящем документе, которые могут быть включены в рассматриваемый CAR.

[0164] В одном варианте реализации трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD8 α . В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD8 α , содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

[0165] В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD28. В некоторых вариантах реализации CAR содержит трансмембранный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен CD28 содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28.

[0166] Специалистам в данной области техники известны допустимые изменения трансмембранного и/или шарнирного домена при сохранении его заданной функции. В

некоторых вариантах реализации трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 81%, по меньшей мере приблизительно на 82%, по меньшей мере приблизительно на 83%, по меньшей мере приблизительно на 84%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 86%, по меньшей мере приблизительно на 87%, по меньшей мере приблизительно на 88%, по меньшей мере приблизительно на 89%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичную любой из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 23 и/или 27. В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 81%, по меньшей мере приблизительно 82%, по меньшей мере приблизительно 83%, по меньшей мере приблизительно 84%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 86%, по меньшей мере приблизительно 87%, по меньшей мере приблизительно 88%, по меньшей мере приблизительно 89%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности по отношению к любой из нуклеотидных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 24 и/или 28. Трансмембранный домен можно комбинировать с любым шарнирным доменом, и/или он может содержать один или более трансмембранных доменов, описанных в настоящем документе.

[0167] В некоторых вариантах реализации CAR содержит: любой антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранного

домена альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD2, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 и иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR); любые костимулирующие сигнальные домены и любые внутриклеточные домены или цитоплазматические домены, описанные в настоящем документе, или любые другие домены, описанные в настоящем документе, которые могут сходиться в состав CAR, и, необязательно, шарнирный домен.

[0168] В некоторых вариантах реализации CAR дополнительно содержит спейсерный домен между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом CAR или между внутриклеточным доменом и трансмембранным доменом CAR. В настоящем документе термин «спейсерный домен» обычно означает любой олиго- или полипептид, функция которого состоит в связывании трансмембранного домена с внеклеточным доменом либо с внутриклеточным доменом в полипептидной цепи. Спейсерный домен может содержать до приблизительно 300 аминокислот, например, от приблизительно 10 до приблизительно 100 аминокислот или от приблизительно 25 до приблизительно 50 аминокислот. В некоторых вариантах реализации спейсерный домен может представлять собой короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от приблизительно 2 до приблизительно 10 аминокислот. Например, дублет глицин-серин является особенно подходящим линкером между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом рассматриваемого CAR.

[0169] Соответственно, CAR согласно настоящему изобретению может содержать любой из трансмембранных доменов, шарнирных доменов или спейсерных доменов, описанных в настоящем документе.

3. Шарнирный домен

[0170] В некоторых вариантах реализации рассматриваемый CAR согласно настоящему изобретению содержит шарнирную область. Шарнирная область CAR представляет собой гидрофильную область, расположенную между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах реализации шарнирный домен облегчает надлежащий фолдинг белка CAR. В некоторых вариантах реализации

шарнирный домен является необязательным компонентом CAR. В некоторых вариантах реализации шарнирный домен содержит домен, выбранный из Fc-фрагментов антител, шарнирных областей антител, CH2-областей антител, CH3-областей антител, искусственных шарнирных последовательностей или их комбинаций. В некоторых вариантах реализации шарнирный домен выбран из шарнира CD8 α , искусственных шарниров, изготовленных из полипептидов, размер которых может составлять всего три остатка глицина (Gly), но не ограничивается ими. В некоторых вариантах реализации шарнирная область представляет собой полипептид шарнирной области, полученный из рецептора. В некоторых вариантах реализации шарнирная область представляет собой шарнирную область, полученную из CD8). В одном варианте реализации шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, полученную из CD8 человека, или ее вариант. В некоторых вариантах реализации рассматриваемый CAR содержит шарнирный домен CD8 α и трансмембранный домен CD8 α . В некоторых вариантах реализации шарнирный домен CD8 α содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах реализации шарнирный домен CD8 α содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

[0171] В некоторых вариантах реализации шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 81%, по меньшей мере приблизительно на 82%, по меньшей мере приблизительно на 83%, по меньшей мере приблизительно на 84%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 86%, по меньшей мере приблизительно на 87%, по меньшей мере приблизительно на 88%, по меньшей мере приблизительно на 89%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичную любой из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах реализации шарнирный домен кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно

80%, по меньшей мере приблизительно 81%, по меньшей мере приблизительно 82%, по меньшей мере приблизительно 83%, по меньшей мере приблизительно 84%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 86%, по меньшей мере приблизительно 87%, по меньшей мере приблизительно 88%, по меньшей мере приблизительно 89%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности по отношению к любой из нуклеотидных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 26.

[0172] В некоторых вариантах реализации шарнирный домен соединяет антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом, который соединен с внутриклеточным доменом. В типичных вариантах реализации шарнирная область способна поддерживать распознавание и связывание антигенсвязывающего домена с антигеном-мишенью на клетках-мишенях. См., например, Hudecek et al., *Cancer Immunol. Res.*, 3(2): 125-135 (2015). В некоторых вариантах реализации шарнирная область представляет собой гибкий домен, что позволяет антигенсвязывающему домену обладать структурой для оптимального распознавания конкретной структуры и плотности антигенов-мишеней на клетке, например, опухолевой клетке. Гибкость шарнирной области позволяет шарнирной области принимать множество различных conformаций.

[0173] В некоторых вариантах реализации выбрана длина шарнирного домена от приблизительно 4 до приблизительно 50, от приблизительно 4 до приблизительно 10, от приблизительно 10 до приблизительно 15, от приблизительно 15 до приблизительно 20, от приблизительно 20 до приблизительно 25, от приблизительно 25 до приблизительно 30, от приблизительно 30 до приблизительно 40 или от приблизительно 40 до приблизительно 50 аминокислот.

[0174] Подходящие шарнирные области легко отобрать, их длина может находиться в любом подходящем диапазоне, например, от приблизительно 1 аминокислоты (например, глицина (Gly)) до приблизительно 20 аминокислот, от приблизительно 2 до приблизительно

15, от приблизительно 3 до приблизительно 12 аминокислот, включая от приблизительно 4 до приблизительно 10, от приблизительно 5 до приблизительно 9, от приблизительно 6 до приблизительно 8 или от приблизительно 7 до приблизительно 8 аминокислот, и может составлять приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6 или приблизительно 7 аминокислот.

[0175] В некоторых вариантах реализации аминокислота представляет собой глицин (Gly). Можно применять полимеры глицина и глицина-серина; как Gly, так и Ser являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить в качестве нейтральной связки между компонентами. Можно использовать полимеры глицина; глицин имеет доступ к значительно большему пространству phi-psi, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см., например, Scheraga, *Rev. Computational. Chem.* (1992) 2: 73-142). В некоторых вариантах реализации шарнирные области содержат полимеры глицина (G)_n, полимеры глицина-серина. В некоторых вариантах реализации шарнирная область содержит полимеры глицина-серина, выбранные из группы, состоящей из (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 47) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 48), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице). В некоторых вариантах реализации шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, включающую GGSG (SEQ ID NO: 29), GGSGG (SEQ ID NO: 30), GSGSG (SEQ ID NO: 31), GSGGG (SEQ ID NO: 32), GGGSG (SEQ ID NO: 33), GSSSG (SEQ ID NO: 34), но не ограничивающуюся ими. В некоторых вариантах реализации шарнирная область содержит полимеры глицина-аланина, полимеры аланина-серина или другие гибкие линкеры, известные в данной области техники.

[0176] В некоторых вариантах реализации шарнирная область представляет собой шарнирную область тяжелой цепи иммуноглобулина. Аминокислотные последовательности шарнирной области иммуноглобулина известны в данной области техники. В некоторых вариантах реализации шарнирный домен иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из DKTHT (SEQ ID NO: 35); CPPC (SEQ ID NO: 36); CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO: 37) (см., например, Glaser et al., *J. Biol. Chem.* (2005) 280: 41494-41503); ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 38); KSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 39); KCCVDCP (SEQ ID NO: 40); KYGPPCP (SEQ ID NO: 41); EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 42) (шарнир IgG1 человека);

ERKCCVECPCP (SEQ ID NO: 43) (шарнир IgG2 человека); ELKTPPLGDTTHTCPCP (SEQ ID NO: 44) (шарнир IgG3 человека); SPNMVPHANHAQ (SEQ ID NO: 45) (шарнир IgG4 человека); и т.п.

[0177] В некоторых вариантах реализации шарнирная область представляет собой шарнирную область тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации шарнир выбран из CH1- и CH3-доменов IgG (например, IgG4 человека). В некоторых вариантах реализации шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность шарнирного домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации шарнирная область может содержать одну или более аминокислотных замен и/или инсерций и/или делеций по сравнению с шарнирной областью дикого типа (природной). В некоторых вариантах реализации гистидин в положении 229 (His229) шарнира IgG1 человека замещен тирозином (Tyr). В некоторых вариантах реализации шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTYTCPCP (SEQ ID NO: 46).

4. Костимулирующий домен

[0178] CAR согласно настоящему изобретению также содержит внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен или, иначе, цитоплазматический домен CAR отвечает за активацию клетки, в которой экспрессируется CAR. Таким образом, термин «внутриклеточный домен» включает любой фрагмент внутриклеточного домена, достаточный для передачи сигнала активации. В одном варианте реализации указанный внутриклеточный домен содержит домен, ответственный за эффекторную функцию. Термин «эффektorная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секрецию цитокинов. В одном варианте реализации внутриклеточный домен CAR содержит домен, ответственный за активацию и/или передачу сигнала. Внутриклеточный домен может передавать активацию сигнала посредством белок-белковых взаимодействий, биохимических изменений или другой реакции, меняющей метаболизм, форму, экспрессию генов, или другой реакции клетки на активацию химерной внутриклеточной сигнальной молекулы.

[0179] Примеры внутриклеточного домена для применения в настоящем изобретении включают цитоплазматический фрагмент Т-клеточного рецептора (TCR) и любую костимулирующую молекулу или любую молекулу, действующую совместно с TCR, иницируя передачу сигнала в Т-клетке после взаимодействия с антигенным рецептором, а также любое производное или вариант этих элементов и любую синтетическую последовательность, которая обладает такой же функциональной способностью, но не ограничиваются перечисленным.

[0180] В некоторых вариантах реализации внутриклеточный домен содержит костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В определенных вариантах реализации внутриклеточный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В одном варианте реализации внутриклеточный домен CAR содержит костимулирующий сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из фрагмента сигнального домена белков суперсемейства TNFR, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS (CD278), NKG2C, B7-H3 (CD276), и внутриклеточного домена, полученного из иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR, любого его производного или варианта, любой синтетической последовательности, которая обладает такой же функциональной способностью, и любой их комбинации.

[0181] В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен содержит один или более из костимулирующего домена белка, выбранного из группы, состоящей из белков суперсемейства TNFR, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS (CD278), NKG2C, B7-H3 (CD276) и внутриклеточного домена, полученного из иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR), или его варианта. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен содержит один или более костимулирующих доменов белка, выбранного из группы, состоящей из белков CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD27, CD2 или их комбинации. В некоторых вариантах реализации костимулирующий сигнальный домен содержит костимулирующий домен 4-1BB. В некоторых вариантах реализации костимулирующий сигнальный домен содержит

костимулирующий домен CD2. В некоторых вариантах реализации костимулирующий сигнальный домен содержит костимулирующий домен CD28.

[0182] В одном варианте реализации костимулирующий домен CAR содержит костимулирующий домен 4-1BB, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен 4-1BB кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или 3. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен CAR содержит костимулирующий домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен CD28 кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен CAR содержит костимулирующий домен CD28(YMFM), содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен CD28(YMFM) кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В одном варианте реализации внутриклеточный домен CAR содержит костимулирующий домен ICOS, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен ICOS кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный домен CAR содержит костимулирующий домен ICOS(YMNM), содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен ICOS (YMNM) кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный домен рассматриваемого CAR содержит костимулирующий домен CD2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен CD2 кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14. В одном варианте реализации внутриклеточный домен CAR содержит костимулирующий домен CD27, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен CD27 кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В одном варианте реализации внутриклеточный домен CAR содержит костимулирующий домен OX40, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах реализации костимулирующий домен OX40 кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

5. Внутриклеточный домен

[0183] В определенных вариантах реализации внутриклеточный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен. Примеры внутриклеточного домена включают фрагмент или домен из одной или более молекул или рецепторов, включая TCR, CD3-дзета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD86, общий FcR-гамма, FcR-бета (Fc-эпсилон Rib), CD79a, CD79B, Fc-гамма R11a, DAP10, DAP12, Т-клеточный рецептор (TCR), CD2, CD8, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX9, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICO, белок семейства KIR, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, CBET, NKG2C, B7-H3, лиганд, специфично связывающийся с CD83, CD5, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), ВИНОВАТ (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, Toll-подобный рецептор 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, тирозинкиназы семейства syk (Syk, ZAP 70 и т. д.), тирозинкиназы семейства src (Lck, Fyn, Lyn и т. д.), другие костимулирующие молекулы, описанные в настоящем документе, любое их производное, вариант или фрагмент, любую синтетическую последовательность костимулирующей

молекулы, обладающую той же функциональной способностью, и любую их комбинацию, но не ограничиваясь ими.

[0184] В некоторых вариантах реализации внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен, выбранный из группы, состоящей из цитоплазматических сигнальных доменов CD2 человека, CD3-дзета-цепи (CD3 ζ), Fc γ RIII, Fc γ RI, цитоплазматического хвоста Fc-рецептора, цитоплазматического рецептора, несущего иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), TCR-дзета, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d, или их варианта. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета.

[0185] Дополнительные примеры внутриклеточных доменов включают, без ограничения, внутриклеточные сигнальные домены нескольких типов различных других иммунологических сигнальных рецепторов, включая: Т-клеточные сигнальные белки первого, второго и третьего поколения, включая CD3, костимулирующие белки семейства B7 и рецепторы суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR), но не ограничиваясь ими. Кроме того, внутриклеточные сигнальные домены могут включать сигнальные домены, используемые NK-клетками и NKT-клетками, например, сигнальные домены NKp30 (B7-H6) и DAP 12, NKG2D, NKp44, NKp46, DAP10 и CD3z.

[0186] Внутриклеточные сигнальные домены, подходящие для применения в CAR согласно настоящему изобретению, включают любой желательный сигнальный домен, передающий сигнал в ответ на активацию CAR (т.е. активируемый антигеном и димеризующим агентом). В некоторых вариантах реализации отчетливый и обнаруживаемый сигнал, например, включает повышенную продукцию одного или более цитокинов клеткой; изменение транскрипции гена-мишени; изменение активности белка; изменение поведения клеток (например, гибель клеток); пролиферацию клеток; дифференцировку клеток; выживание клеток; и/или модуляцию клеточных сигнальных реакций; например, в некоторых вариантах реализации внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальные цепи типа DAP10/CD28. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный сигнальный домен не присоединен к мембраносвязанному CAR ковалентной связью, а диффундирует в цитоплазме.

[0187] Внутриклеточные сигнальные домены, подходящие для применения в CAR согласно настоящему изобретению, включают внутриклеточные сигнальные полипептиды, содержащие иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах реализации внутриклеточный сигнальный домен содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть мотивов ITAM, как описано ниже. В некоторых вариантах реализации мотив ITAM дважды повторяется во внутриклеточном сигнальном домене, причем первая и вторая копии мотива ITAM отделены друг от друга 6-8 аминокислотами. В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен субъекта CAR содержит 3 мотива ITAM. В некоторых вариантах реализации внутриклеточные сигнальные домены включают сигнальные домены рецепторов иммуноглобулинов человека, содержащие иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM), например, Fc-гамма RI, Fc-гамма RIIA, Fc-гамма RIIС, Fc-гамма RIIIA, FcRL5, но не ограничиваются ими.

[0188] Подходящий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой фрагмент, содержащий мотив ITAM, полученный из полипептида, содержащего мотив ITAM. Например, подходящий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой домен, содержащий мотив ITAM, полученный из любого белка, содержащего мотив ITAM. Таким образом, подходящий внутриклеточный сигнальный домен не обязательно должен содержать полную последовательность полноразмерного белка, из которого он получен. Примеры подходящих полипептидов, содержащих мотив ITAM, включают: DAP12, FCER1G (гамма-цепь рецептора Fc-эпсилон I), CD3D (CD3-дельта), CD3E (CD3-эпсилон), CD3G (CD3-гамма), CD3Z (CD3-дзета) и CD79A (альфа-цепь белка, ассоциированного с комплексом антигенного рецептора), но не ограничиваются ими.

[0189] В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен получен из DAP12 (также известного как TYROBP; белка TYRO, связывающего протеинтирозинкиназу; KARAP; PLOSL; белка 12 активации DNAX; белка, ассоциированного с KAR; белка TYRO, связывающего протеинтирозинкиназу; белка, ассоциированного с рецептором активации киллеров; белка, ассоциированного с рецептором активации киллеров; и т.д.). В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен получен из FCER1G (также известного как FCRG; гамма-цепи рецептора

Fc-эпсилон I; гамма-цепи рецептора Fc; RI-гамма fc-эпсилон; fcR-гамма; fceR1-гамма; гамма-субъединицы рецептора иммуноглобулина-эпсилон с высоким сродством; гамма-цепи рецептора иммуноглобулина E с высоким сродством; и т.д.). В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен получен из дельта-цепи гликопротеина CD3 поверхности Т-клеток (также известной как CD3D; CD3-DELTA; T3D; дельта-субъединицы антигена CD3; CD3-дельта; дельта-полипептида антигена CD3d (комплекса TiT3); дельта-цепи ОКТ3; дельта-цепи Т3 Т-клеточного рецептора; дельта-цепи CD3 гликопротеина поверхности Т-клеток; и т.д.). В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен получен из эпсилон-цепи гликопротеина CD3 поверхности Т-клеток (также известной как CD3e, эпсилон-цепи антигена T3/Leu-4 поверхности Т-клеток, эпсилон-цепи гликопротеина CD3 поверхности Т-клеток, AI504783, CD3, CD3-эпсилон, T3e и т.д.). В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен получен из гамма-цепи гликопротеина CD3 поверхности Т-клеток (также известной как CD3G, гамма-цепь Т3 Т-клеточного рецептора, CD3-гамма, T3G, гамма-полипептид (комплекса TiT3) и т.д.). В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен получен из дзета-цепи гликопротеина CD3 поверхности Т-клеток (также известной как CD3Z, дзета-цепи Т3 Т-клеточного рецептора, CD247, CD3-дзета, CD3H, CD3Q, T3Z, TCRZ и т.д.). В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен получен из CD79a (также известного как альфа-цепь белка, ассоциированного с комплексом рецептора антигенов В-клеток; антиген CD79a (альфа-цепи, ассоциированной с иммуноглобулинами); мембранный гликопротеин MB-1; Ig-альфа; мембраносвязанный белок, ассоциированный с иммуноглобулинами; поверхностный белок, ассоциированный с IgM; и т.д.). В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен, подходящий для применения в CAR согласно настоящему изобретению, содержит сигнальную цепь типа DAP10/CD28. В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен, подходящий для применения в рассматриваемом CAR в соответствии с настоящим изобретением, включает полипептид ZAP70. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный сигнальный домен включает цитоплазматический сигнальный домен TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b или CD66d. В одном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен в составе CAR включает цитоплазматический сигнальный домен CD3-дзета человека.

[0190] Хотя обычно можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. При использовании укороченного фрагмента внутриклеточного сигнального домена такой укороченный фрагмент можно применять вместо интактной цепи, если он может передавать сигнал эффекторной функции. Внутриклеточный сигнальный домен включает любой укороченный фрагмент внутриклеточного сигнального домена, достаточный для передачи сигнала эффекторной функции.

[0191] Внутриклеточные сигнальные домены, описанные в настоящем документе, можно комбинировать с любым из костимулирующих сигнальных доменов, описанных в настоящем документе, любым из антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе, любым из трансмембранных доменов, описанных в настоящем документе, или любым из других доменов, описанных в настоящем документе, которые могут входить в состав CAR. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный домен CAR содержит двойные сигнальные домены. Двойные сигнальные домены могут включать фрагмент или домен любой из молекул, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный домен содержит костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета; костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета; костимулирующий домен CD2 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный домен CAR включает любой фрагмент костимулирующей молекулы, например, по меньшей мере один сигнальный домен CD3, CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, PD-1, Т-клеточного рецептора (TCR), любое его производное или вариант, любую синтетическую последовательность, обладающую такой же функциональной способностью, и любую их комбинацию.

[0192] Кроме того, в данной области техники известны варианты внутриклеточных сигнальных доменов, подходящих для применения в рассматриваемом CAR. Мотив YMFM находится в ICOS и представляет собой SH2-связывающий мотив, рекрутирующий как субъединицу p85, так и субъединицу p50-альфа PI3K, что приводит к усилению эффективности сигнального пути АКТ. В одном варианте реализации можно получить вариант внутриклеточного домена CD28, содержащий мотив YMFM.

[0193] В одном варианте реализации внутриклеточный домен рассматриваемого CAR

содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 21, которую может кодировать последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 22, соответственно.

[0194] Специалистам в данной области техники известны допустимые изменения внутриклеточного домена при сохранении его специфической активности. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 19 или 21. В некоторых вариантах реализации внутриклеточный домен кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из нуклеотидных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 20 или 22.

[0195] В одном варианте реализации внутриклеточный домен рассматриваемого CAR содержит костимулирующий домен ICOS и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В одном варианте реализации внутриклеточный домен рассматриваемого CAR содержит костимулирующий домен CD28 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В одном варианте реализации внутриклеточный домен рассматриваемого CAR содержит костимулирующий домен варианта CD28 YMFМ и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В одном варианте реализации внутриклеточный домен рассматриваемого

CAR содержит костимулирующий домен CD27 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В одном варианте реализации внутриклеточный домен рассматриваемого CAR содержит костимулирующий домен OX40 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В одном типичном варианте реализации внутриклеточный домен рассматриваемого CAR содержит костимулирующий домен 4-1BB и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В одном типичном варианте реализации внутриклеточный домен рассматриваемого CAR содержит костимулирующий домен CD2 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета.

[0196] В таблице 2 показаны типичные последовательности доменов CAR, описанных в настоящем документе.

Таблица 2		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Аминокислотная последовательность костимулирующего домена 4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
2	Нуклеотидная последовательность №1 костимулирующего домена 4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGACGGCT GTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA CTG
3	Нуклеотидная последовательность №2 костимулирующего домена 4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCT GTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA CTG
4	Аминокислотная последовательность костимулирующего домена CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
5	Нуклеотидная последовательность костимулирующего домена CD28	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAA CATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACC AGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
6	Аминокислотная последовательность костимулирующего домена CD28(YMFM)	RSKRSRLLHSDYMFMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
7	Нуклеотидная последовательность костимулирующего домена CD28(YMFM)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGTT CATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACC AGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
8	Аминокислотная последовательность костимулирующего домена ICOS	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL

Таблица 2		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
9	Нуклеотидная последовательность №1 костимулирующего домена ICOS	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGG TGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAAT CCAGACTCACAGATGTGACCCTA
10	Нуклеотидная последовательность №2 костимулирующего домена ICOS	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGG TGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAAT CTAGACTCACAGATGTGACCCTA
11	Аминокислотная последовательность костимулирующего домена ICOS(YMNM)	TKKKYSSSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTL
12	Нуклеотидная последовательность костимулирующего домена ICOS(YMFM)	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGG TGAATACATGAACATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAAT CCAGACTCACAGATGTGACCCTA
13	Аминокислотная последовательность костимулирующего домена CD2	TKRKKQRSRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPA TSQHPPPPGHRSPAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVH QQKGPPLPRPRVQPKPPHGAENSLSPSSN
14	Нуклеотидная последовательность костимулирующего домена CD2	ACCAAAAAGGAAAAAACAGAGGAGTCGGAGAAATGATGAGG AGCTGGAGACAAGAGCCACAGAGTAGCTACTGAAGAAAG GGGCCGGAAGCCCCACCAAATTCAGCTTCAACCCCTCAGA ATCCAGCAACTCCCAACATCCTCCTCCACCACCTGGTCATC GTTCCAGGCACCTAGTCATCGTCCCCCGCCTCCTGGACACC GTGTTCAAGCACCAGCCTCAGAAGAGGCCTCCTGCTCCGTCG GGCACACAAGTTCACCAGCAGAAAGGCCCGCCCTCCCCAG ACCTCGAGTTCAGCCAAAACCTCCCATGGGGCAGCAGAAA ACTCATTGTCCCCTTCTCTAAT
15	Аминокислотная последовательность костимулирующего домена CD27	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTPIQEDYRKPEPA CSP
16	Нуклеотидная последовательность костимулирующего домена CD27	CAACGAAGGAAATATAGATCAAACAAAGGAGAAAGTCCTG TGGAGCCTGCAGAGCCTTGTCTGTTACAGCTGCCCCAGGGAG GAGGAGGGCAGCACCATCCCCATCCAGGAGGATTACCGAAA ACCGGAGCCTGCCTGCTCCCCC
17	Аминокислотная последовательность костимулирующего домена OX40	ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
18	Нуклеотидная последовательность костимулирующего домена OX40	GCCCTGTACCTGCTCCGCAGGGACCAGAGGCTGCCCCCGA TGCCACACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCAGGACCCCA TCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCACTCCACCCTGGCCAAG ATC
19	Аминокислотная последовательность внутриклеточного сигнального домена CD3-дзета	RVKFQRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
20	Нуклеотидная последовательность	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCA GCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGAC

Таблица 2		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
	внутриклеточного сигнального домена CD3-дзета	GAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG GACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTC AGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCC TGCCCCCTCGC
21	Аминокислотная последовательность внутриклеточного сигнального домена CD3-дзета (Q14K)	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
22	Нуклеотидная последовательность внутриклеточного сигнального домена CD3-дзета (Q14K)	AGAGTGAAGTTT CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAA GCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGAC GAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG GACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTC AGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCC TGCCCCCTCGC
23	Аминокислотная последовательность трансмембранного домена CD8 альфа (CD8 α)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
24	Нуклеотидная последовательность трансмембранного домена CD8 альфа (CD8 α)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTCT CTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTACTGC
25	Аминокислотная последовательность шарнирного домена CD8 альфа (CD8 α)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC D
26	Нуклеотидная последовательность шарнирного домена CD8 альфа (CD8 α)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCAC CATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCC GGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGA CTTCGCCTGTGAT
27	Аминокислотная последовательность трансмембранного домена CD28	FWVLVVVGGVLCYSLLVTVAFIIFWV
28	Нуклеотидная последовательность трансмембранного домена CD28	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTAT AGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTG
29	Шарнир/линкер	GGSG
30	Шарнир/линкер	GGSGG
31	Шарнир/линкер	GSGSG
32	Шарнир/линкер	GSGGG

Таблица 2		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
33	Шарнир/линкер	GSSSG
34	Шарнир/линкер	GGGSG
35	Шарнирная область Ig	DKTHT
36	Шарнирная область Ig	CPPC
37	Шарнирная область Ig	CPEPKSCDTPPPCPR
38	Шарнирная область Ig	ELKTPLGDTTHT
39	Шарнирная область Ig	KSCDKTHTCP
40	Шарнирная область Ig	KCCVDCP
41	Шарнирная область Ig	KYGPPCP
42	шарнир IgG1 человека	EPKSCDKTHTCPPCP
43	шарнир IgG2 человека	ERKCCVECPCP
44	шарнир IgG3 человека	ELKTPLGDTTHTCPRCP
45	шарнир IgG4 человека	SPNMVPHAHHAQ
46	шарнир IgG1 ^{H229Y} человека	EPKSCDKT <u>Y</u> TCPPCP
47	Шарнир/линкер	(GSGGS)n
48	Шарнир/линкер	(GGGS)n
49	Шарнир/линкер	(GGGGS)n
50	Шарнир/линкер	GGGGSGGGSGGGGS
51	Шарнир/линкер	GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGG ATCT
52	CD3-эпсилон	AGATCCAGGATACTGAGGGCA
53	CD3-дельта	TCTCTGGCCTGGTACTGGCTA
54	CD3 гамма	GCTTCTGCATCACAAGTCAGA
55	B2M	TATCTCTTGTACTACACTGA
56	TAP1	GCTCTTGGAGCCAACCGTTG
57	TAP2	CTTCCTCAAGGGCTGCCAGGA
58	TAPBP_нРНК1	CCTACATGCCCCCCACCTCC
59	TAPBP_нРНК2	CGCTCGCATCCTCCACGAAC
60	NLRC5	GTGAGCAGCCTCACAAGACAG
61	C2TA	CCTTGGGGCTCTGACAGGTA
62	HLA-DMA	CCAGAACAACCTCGGGTGCCTCG
63	RFX5_нРНК1	CAAGGCCGTGCAGAACAAGT
64	RFX5_нРНК2	TTCTGCACGGCCTTGGAAATG
65	RFXANK	CCTGCACCCCTGAGCCTGTGA
66	RFXAP	GAGGATCTAGAGGACGAGGAG
67	Ii-цепь_нРНК1	CATCCTGGTGA CTCTGCTCCT
68	Ii-цепь_нРНК2	TCCAGCCGGCCCTGCTGCTGG
69	Нуклеотидная последовательность Tn-MUC1 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTG CTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCCAGGTGCAGCTGCA GCAGTCTGATGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGA AGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACCAC GCCATCCACTGGGTCAAGCAGAAGCCTGAGCAGGGCCTGGA GTGGATCGGCCACTTACAGCCCCGGAACACCGACATCAAGT ACAACGACAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGAC AGAAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAACAGCCTGAC CAGCGAGGACAGCGCCGTGTA CTCTGCAAGACCAGCACCT TCTTTTTCGACTACTGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGT CTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGGCGGAGGAAGTGGCGG AGGGGATCTGAACTCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTC TGACAGTGACAGCCGGCGAGAAAGTGACCATGATCTGCAAG

Таблица 2

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p>TCCTCCCAGAGCCTGCTGAACTCCGGCGACCAGAAGAААСТА CCTGACCTGGTATCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCAAGC TGCTGATCTTTTGGGCCAGCACCCGGGAAAGCGGCGTGCCC GATAGATTCACAGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTTACCTT GACCATCAGCTCCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATT ACTGCCAGAACGACTACAGCTACCCCTGACCTTCGGAGCC GGCACCАAGCTGGAАCTGAAGTCCGGAACCACGACGCCAGC GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGC CCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGG GGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATAT CTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCT CCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCACCAAAAGGAAAA ACAGAGGAGTCGGAGAAATGATGAGGAGCTGGAGACААГА GCCACAGAGTAGCTACTGAAGAAAGGGGCCGGAAGCCCC ACCAАATTCAGCTTCAACCCCTCAGAATCCAGCAACTTCCC AACATCCTCCTCCACCACCTGGTCATCGTTCCCAGGCACCTA GTCATCGTCCCCCGCTCCTGGACACCGTGTTCAGCACCAGC CTCAGAAGAGGCCTCCTGCTCCGTCGGGCACACAAGTTAC CAGCAGAAAGGCCCGCCCTCCCAGACCTCGAGTTCAGCC AAAACCTCCCATGGGGCAGCAGAAACTCATTGTCCCCTT CCTCTAATATCGATAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC GCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACA AGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAA AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTT CACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC</p>
70	Аминокислотная последовательность Tn-MUC1 CAR	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPGSQVQLQQSDAELVKPGSSVKI SCKASGYTFTDHAHFWVKQKPEQGLEWIGHFSPGNTDIKYNDK FKGKATLTVDRSSSTAYMQLNSLTSEDSAIFYFCKTSTFFFDYW GQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSELVMTOSPSSLTVTAGEK VTMICKSSQSLNLSGDQKNYLTWYOQKPGQPPKLLIFWASTRE SGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCONDYSYPLTFG AGTKLELKSGLTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRKKQRSRR NDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPONPATSQHPPPPPGH RSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVHQQKGPPLPRPR VQPKPPHGAAENSLSPSSNIDRVKFSRSADAPAYKQGNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR</p>
71	Аминокислотная последовательность мезотелинового CAR (M5)	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASG YTFTDYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT MTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLASVGDVITCR ASQSIRYILSWYQKPKGAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSTDF TLTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKTTTPAPRPPTAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPPEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR</p>

Таблица 2		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK KGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
72	Аминокислотная последовательность мезотелинового CAR (M11)	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTGYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYA QNFQGRVTMTRDTSISTAYMELRRLRSDDTAVYYCASGWDFD YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSDIRMTQSPSS LSASVGDRTVITCRASQSIRYYLSWYQQKPKAPKLLIYASIL QNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGP GTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK QGQNLNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
73	Аминокислотная последовательность гуманизованного PSMA-специфичного связывающего домена	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPG KGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVITITVDKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSS GGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCKASQDVGTAVDWYQQ KPGQAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPED FAVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIK
74	Нуклеотидная последовательность гуманизованного PSMA-специфичного связывающего домена	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACA CATTCAGTGAATACACCATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAACAA TGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCA CAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAG CTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGTCTATTACTGT GCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCAC GGTCACCGTCTCCTCAGGAGGCGGAGGATCTGGCGCGGAG GAAGTTCTGGCGGAGGACGACATTCAGATGACCCAGTCT CCCAGCACCCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGGTCAACAT CACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTAAGTCTGTAGACT GGTATCAACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATT TACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGACTGCAGCCTGAAGACTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCA ATATAACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGG TGGATATCAAA
75	Аминокислотная последовательность мезотелин-специфичного связывающего домена	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVWRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQNFFQGRVTMTRDTSISTAY MELRRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGGSDIRMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIR YYLSWYQQKPKAPKLLIYASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK
76	Аминокислотная последовательность доминантно-негативного рецептора TGFβRII (TGFβRII-DN)	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVOKSVNNDMIVTDNNG AVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPEVCSVAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPG ETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVTVGISLLPPL GVAISVIIIICYRVNRQQKLSSSG

Таблица 2

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
77	Нуклеотидная последовательность доминантно-негативного рецептора TGFβRII (TGFβRII-DN)	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACG TTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAAC AACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAATTTTGTGAT GTGAGATTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAG CAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAG TCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACA CTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGAC TTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAG GAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCTGT AGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGA ATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTGTAGTCATATTTCA AGTGACAGGCATCAGCCCTCCTGCCACCCTGGGAGTTGCCA TATCTGTCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACCGGC AGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGA
78	Аминокислотная последовательность рецептора PD1-CTM-CD28	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALL VVTEGDNATFTCSFSNTSESVLWYRMSPSNQTDKLAAPFED RSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVLCGAI SLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
79	Нуклеотидная последовательность рецептора PD1-CTM-CD28	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGT GCTACAACCTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC CAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTCACCTGCAGC TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCG CATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCC CCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT GTCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGT GGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTG GGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGC CTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAG TGCCCACAGCCCACCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGC CAGTTCCAAACCCTGGTGTGTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGT GGAGTCTGGCTTGTATAGCTTGTAGTAACAGTGGCCTTT ATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCA CAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCA CCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG CAGCCTATCGCTCC
80	Аминокислотная последовательность рецептора PD1-PTM-CD28	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALL VVTEGDNATFTCSFSNTSESVLWYRMSPSNQTDKLAAPFED RSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVLCGAI SLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLLVWVLA VIRSKRSRLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAVRS
81	Нуклеотидная последовательность рецептора PD1-PTM-CD28	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGT GCTACAACCTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC CAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTCACCTGCAGC TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGC ATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCC CGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTG

Таблица 2

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		TCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTG GTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGG GGCCATCTCCCTGGCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCC TGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGT GCCCACAGCCCACCCCAGCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCC AGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGGGCGGCCTGCTGG GCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCAGGA GTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACATGAACATG ACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCC CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
82	Аминокислотная последовательность рецептора PD1A ^{132L} _PTM-CD28	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALL VVTEGDNATFTCSFSNTSESVLWYRMSPSNQTDKLAAPFED RSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVLCGAI APKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAQGFQTLVVG VVGGLLGLVLLVWVLAVIRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAVRS
83	Нуклеотидная последовательность рецептора PD1A ^{132L} _PTM-CD28	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCTGCTGGGCGGT GCTACAACCTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC CAGACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTACCTGCAGC TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGC ATGAGCCCCAGCAACCAGACGACAAGCTGGCCGCCTTCCC CGAGGACCGCAGCCAGCCCCGCCAGGACTGCCGCTCCGTG TCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTG GTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGG GGCCATCTCCCTGGCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCC TGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGT GCCCACAGCCCACCCCAGCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCC AGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGGGCGGCCTGCTGG GCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCAGGA GTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACATGAACATG ACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCC CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGC
84	Аминокислотная последовательность рецептора PD-1-4-1BB (PD1-BB)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALL VVTEGDNATFTCSFSNTSESVLWYRMSPSNQTDKLAAPFED RSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVLCGAI APKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAQGFQTLVI WAPLAGTCGVLLLSVITLYCKKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
85	Нуклеотидная последовательность рецептора PD-1-4-1BB (PD1-BB)	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCTGCTGGGCGGT GCTACAACCTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC CAGACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTACCTGCAGC TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGC ATGAGCCCCAGCAACCAGACGACAAGCTGGCCGCCTTCCC CGAGGACCGCAGCCAGCCCCGCCAGGACTGCCGCTCCGTG TCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTG GTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGG GGCCATCTCCCTGGCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCC TGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGT GCCCACAGCCCACCCCAGCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCC AGTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCG

Таблица 2

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		GGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTT ACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAAGAAACTCCTGTATATATTC AAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAG GATGTGAACTG
86	Аминокислотная последовательность рецептора PD1 ^{A132L} _4- 1BВ (PD1*ВВ)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALL VVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARNDSTVLCGAI APKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVIYI WAPLAGTCGVLLLSL VITL VCKKRGRKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
87	Нуклеотидная последовательность рецептора PD1 ^{A132L} _4- 1BВ (PD1*ВВ)	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGT GCTACAACCTGGGCTGGCGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC CAGACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACTGCAGC TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGC ATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTCCC CGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTG TCACACAACCTGCCAACGGGCGTACTTCCACATGAGCGTG GTCAGGGCCCGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGG GGCCATCTCCCTGGCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCC TGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGT GCCACAGCCCACCCAGCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCC AGTTCCAACCCTGGTTATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCG GGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTT ACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAAGAAACTCCTGTATATATTC AAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAG GATGTGAACTG
88	Аминокислотная последовательность рецептора TGFβR- IL12Rβ1	MEAAVAAPRPRLLLLVLAIAAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVC APSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVI AGPVCFVCISLMLMVYIRARHLCPPLPTPCASSAIEFPGGKET WOWINPVDVQEEASLQEALVEMSWDKGERTEPLEKTELPEG APELALDTELSLEDGDRCKAKM
89	Нуклеотидная последовательность рецептора TGFβR- IL12Rβ1	ATGGAGGCGGGCGGTGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTC CTCGTGTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGTGT CCCGGGGCGGACGGCGTTACAGTGTTCCTGCCACCTCTGTAC AAAAGACAATTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGT CTCTGTACAGAGACCACAGACAAAGTTATACACAACAGCA TGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGT TTGTATGTGCACCCTCTTCAAAAACCTGGGCTGTGACTACAA CATATTGCTGCAATCAGGACCATTGCAATAAAATAGAACTT CCAACACTGTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCCTGTGGAA CTGGCAGCTGTCAATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGTCTGCATC TCACTCATGTTGATGGTCTATATCAGGGCCGCACGGCACCTG TGCCCCGCGCTGCCACACCCTGTGCCAGCTCCGCCATTGAG TTCCCTGGAGGGAAGGAGACTTGGCAGTGGATCAACCCAGT GGACTTCCAGGAAGAGGCATCCCTGCAGGAGGCCCTGGTGG TAGAGATGTCCTGGGACAAAGGCGAGAGGACTGAGCCTCTC GAGAAGACAGAGCTACCTGAGGGTGCCCCTGAGCTGGCCCT

Таблица 2		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		GGATACAGAGTTGTCCTTGGAGGATGGAGACAGGTGCAAGG CCAAGATG
90	Аминокислотная последовательность рецептора TGFβR-IL12Rβ2	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVOKSVNNDMIVTDNNG AVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPG ETFFMCSRSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVGTGISLLPPL GVAISVIIIIFYQQKVFVLLAALRPOWCSREIPDPANSTCAKKYPI AEEKTOLPLDRLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQVTPVFRHPPCSN WPQREKGIQGHQASEKDDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLY KVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPHTDGYLPSNIDDLPSH EAPLADSLEELPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMR CDSLML
91	Нуклеотидная последовательность рецептора TGFβR-IL12Rβ2	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACAT CGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACG TTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAAC AACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACGTGTGTAATTTTGTGAT GTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAG CAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAG TCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACA CTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGAC TTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAG GAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCCTGT AGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGA ATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTGCTAGTCATATTTCA AGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCA TATCTGTCATCATCATCTTCTACCAGCAAAAGGTGTTTGTTC TCCTAGCAGCCCTCAGACCTCAGTGGTGTAGCAGAGAAAT CCAGATCCAGCAAATAGCACTTGCCTAAGAAATATCCCAT TGCAGAGGAGAAGACACAGCTGCCCTTGGACAGGCTCCTGA TAGACTGGCCACGCTGAAGATCCTGAACCGCTGGTCATC AGTGAAGTCCTTCATCAAGTGACCCAGTTTTCAGACATCCC CCCTGCTCCAACCTGGCCACAAAGGGAAAAAGGAATCCAAGG TCATCAGGCCTCTGAGAAAGACATGATGCACAGTGCCTCAA GCCCACCACCTCCAAGAGCTCTCCAAGCTGAGAGCAGACAA CTGGTGGATCTGTACAAGGTGCTGGAGAGCAGGGGCTCCGA CCCAAAGCCAGAAAACCCAGCCTGTCCCTGGACGGTGTCTCC CAGCAGGTGACCTTCCCACCCATGATGGCTACTTACCCTCCA ACATAGATGACCTCCCCTCACATGAGGCACCTCTCGCTGACT CTCTGGAAGAACTGGAGCCTCAGCACATCTCCCTTTCTGTTT TCCCCTCAAGTTCTCTTCAACCCACTCACCTTCTCTGTGGTGA TAAGCTGACTCTGGATCAGTTAAAGATGAGGTGTGACTCCCT CATGCTC

В. Дополнительные антигенсвязывающие полипептиды

[0197] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка экспрессирует антигенсвязывающий полипептид, лиганд рецептора клеточной поверхности или полипептид, связывающийся с опухолевым антигеном. В некоторых случаях антигенсвязывающий домен содержит антитело, распознающее белок клеточной

поверхности или рецептор, экспрессируемый на опухолевой клетке. В некоторых случаях антигенсвязывающий домен содержит антитело, распознающее опухолевый антиген. В некоторых случаях антигенсвязывающий домен содержит полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, Fab, F(ab)₂, моноспецифичный Fab₂, биспецифичный Fab₂, триспецифичный Fab₂, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), диатело, триатело, миниантитело, V-Nag или VhH.

C. Лиганды рецепторов клеточной поверхности

[0198] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка экспрессирует лиганд рецептора клеточной поверхности. В некоторых случаях указанный лиганд связывается с рецептором клеточной поверхности, экспрессируемым на опухолевой клетке. В некоторых случаях указанный лиганд содержит белок дикого типа или его вариант, связывающийся с рецептором клеточной поверхности. В некоторых случаях указанный лиганд содержит полноразмерный белок или его функциональный фрагмент, связывающийся с рецептором клеточной поверхности. В некоторых случаях длина функционального фрагмента составляет приблизительно 90%, приблизительно 80%, приблизительно 70%, приблизительно 60%, приблизительно 50% или приблизительно 40% по сравнению с полноразмерной версией белка, однако указанный фрагмент сохраняет способность к связыванию с рецептором клеточной поверхности. В некоторых случаях указанный лиганд представляет собой сконструированный *de novo* белок, связывающийся с рецептором клеточной поверхности. Типичные лиганды включают: эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) или Wnt3A, но не ограничиваются ими.

D. Опухолевые антигены

[0199] В некоторых вариантах реализации модифицированная Т-клетка экспрессирует полипептид, связывающийся с опухолевым антигеном. В некоторых случаях опухолевый антиген ассоциирован с гематологическим злокачественным заболеванием. Типичные опухолевые антигены включают CD19, CD20, CD22, CD33/IL3Ra, ROR1, мезотелин, c-Met, PSMA, PSCA, альфа-рецептор фолатов, бета-рецептор фолатов, EGFRvIII, GPC2, Tn-MUC1, рецептор альфа-4 семейства GDNF (GFRa4), белок активации фибробластов (FAP) и IL13Ra2, но не ограничиваются ими. В некоторых случаях опухолевый антиген включает

CD19, CD20, CD22, BCMA, CD37, мезотелин, PSMA, PSCA, Tn-MUC1, EGFR, EGFRvIII, c-Met, HER1, HER2, CD33, CD133, GD2, GPC2, GPC3, NKG2D, KRAS или WT1. В некоторых случаях полипептид представляет собой лиганд опухолевого антигена, например, полноразмерный белок, связывающийся с опухолевым антигеном, его функциональный фрагмент или сконструированный *de novo* лиганд, связывающийся с опухолевым антигеном. В некоторых случаях полипептид представляет собой антитело, связывающееся с опухолевым антигеном.

Е. Переключающие рецепторы и доминантно-негативные рецепторы

[0200] В одном аспекте настоящее изобретение также включает модифицированную иммунную клетку со сниженной экспрессией гена, описанную в настоящем документе, дополнительно содержащую экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую доминантно-негативный рецептор, переключающий рецептор или их комбинацию. В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка со сниженной экспрессией гена, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и/или доминантно-негативный рецептор. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка со сниженной экспрессией гена, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит CAR и переключающий рецептор. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка со сниженной экспрессией гена, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит рекомбинантный TCR и переключающий рецептор. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка со сниженной экспрессией гена, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит рекомбинантный TCR и доминантно-негативный рецептор. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка со сниженной экспрессией гена, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит KIR и переключающий рецептор. В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка со сниженной экспрессией гена, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит KIR и доминантно-негативный рецептор.

1. Переключающий рецептор

[0201] В настоящем изобретении предложены композиции и способы для модифицированных иммунных клеток или их предшественников со сниженной

экспрессией генов, содержащих CAR и переключающий рецептор. Опухолевые клетки формируют иммуносупрессивное микроокружение, которое служит для их защиты от распознавания и уничтожения иммунной системой. Это иммуносупрессивное микроокружение может ограничивать эффективность иммуносупрессивной терапии, например, CAR-T или TCR-T-клеточной терапии. Например, секретируемый цитокин, трансформирующий фактор роста β (TGF β), непосредственно ингибирует функцию цитотоксических Т-клеток и дополнительно индуцирует образование регуляторных Т-клеток для дальнейшего подавления иммунных реакций. Т-клеточная иммуносупрессия, обусловленная TGF β в контексте рака предстательной железы, была продемонстрирована Donkor et al (2011) и Shalpour et al (2015). Для снижения иммуносупрессивного действия TGF на иммунные клетки их можно модифицировать с целью экспрессии рекомбинантного TGF β R, содержащего внеклеточный лиганд-связывающий домен TGF β R, соединенный с внутриклеточным сигнальным доменом, например, рецептора интерлейкина-12 (IL12R; TGF β R-IL12R). Следовательно, модифицированная иммунная клетка, содержащая переключающий рецептор, может связывать молекулу передачи негативных сигналов в микроокружении модифицированной иммунной клетки и преобразовывать передаваемый негативный сигнал ингибирующей молекулы, которая может влиять на модифицированную иммунную клетку, в позитивный сигнал, стимулирующий модифицированную иммунную клетку. Переключающий рецептор согласно настоящему изобретению можно сконструировать для уменьшения эффектов негативной сигнальной молекулы или для преобразования негативного сигнала в позитивный за счет содержания внутриклеточного домена, ассоциированного с позитивным сигналом.

[0202] Таким образом, в некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка, содержащая инсерцию и/или делецию в одном или более локусах генов, кодирующих эндогенный иммунологический белок, дополнительно генетически модифицирована с целью экспрессии переключающего рецептора. В настоящем документе термин «переключающий рецептор» относится к молекуле, предназначенной для снижения влияния негативной сигнальной молекулы на модифицированную иммунную клетку согласно настоящему изобретению. Переключающий рецептор содержит: первый домен, полученный из первого полипептида, ассоциированного с негативным сигналом (передачей сигнала, подавляющего или ингибирующего активацию клетки или Т-клетки); и второй

домен, полученный из второго полипептида, ассоциированного с позитивным сигналом (передачей сигнала, стимулирующего клетку или Т-клетку). В некоторых вариантах реализации указанный белок, ассоциированный с негативным сигналом, выбран из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, TGF β RII, BTLA, VSIG3, VSIG8 и TIM-3. В некоторых вариантах реализации указанный белок, ассоциированный с позитивным сигналом, выбран из группы, состоящей из CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS и CD27.

[0203] В одном варианте реализации первый домен содержит по меньшей мере фрагмент внеклеточного домена первого полипептида, ассоциированного с негативным сигналом, а второй домен содержит по меньшей мере фрагмент внутриклеточного домена второго полипептида, ассоциированного с позитивным сигналом. Таким образом, переключающий рецептор содержит внеклеточный домен, ассоциированный с негативным сигналом, соединенный с внутриклеточным доменом, ассоциированным с позитивным сигналом. В некоторых вариантах реализации переключающий рецептор содержит внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным сигналом, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с позитивным сигналом. В некоторых вариантах реализации указанный трансмембранный домен переключающего рецептора выбран из трансмембранного белка, ассоциированного с негативным сигналом, или трансмембранного домена белка, ассоциированного с негативным сигналом. В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен переключающего рецептора выбран из трансмембранного домена белка, выбранного из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, VSIG3, VSIG8, TGF β RII, BTLA, TIM-3, CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS и CD27.

[0204] В некоторых вариантах реализации указанный переключающий рецептор выбран из группы, состоящей из PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1 и TGF β RII-IL12R β 2.

[0205] В некоторых вариантах реализации переключающий рецептор представляет собой PD-1-CD28 и содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78. В одном варианте реализации переключающий рецептор представляет собой PD-1^{A132L}-CD28 и содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82. В одном варианте реализации переключающий рецептор представляет собой PD-1-4-1BB и содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84. В одном варианте реализации переключающий рецептор представляет собой PD-1^{A132L}-4-1BB и содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 86. В одном варианте реализации переключающий рецептор представляет собой TGFβRII-IL12Rβ1 и содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88. В одном варианте реализации переключающий рецептор представляет собой TGFβRII-IL12Rβ2 и содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90. В одном варианте реализации переключающий рецептор кодирует нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 79, 81, 83, 85, 87, 89 или 91.

[0206] Специалистам в данной области техники известны допустимые изменения переключающего рецептора при сохранении его заданной биологической активности (например, преобразования негативного сигнала в позитивный сигнал при экспрессии в клетке). Соответственно, в некоторых вариантах реализации переключающий рецептор согласно настоящему изобретению может кодировать нуклеотидная последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичная нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 79, 81, 83, 85, 87, 89 или 91. В некоторых вариантах реализации переключающий рецептор согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере

мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 78, 80, 82, 84, 86, 88 или 90.

[0207] В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка содержит инсерцию и/или делецию, способную подавлять экспрессию CD3, B2M и СИТА, CAR и переключающий рецептор, выбранный из группы, состоящей из PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1 и TGF β RII-IL12R β 2. В некоторых вариантах реализации указанная модифицированная иммунная клетка содержит инсерцию и/или делецию в одном или более локусах генов, каждый из которых кодирует эндогенный иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантную цепь (Ii-цепь) и их комбинацию, CAR и переключающий рецептор, выбранный из группы, состоящей из PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1 и TGF β RII-IL12R β 2.

2. Доминантно-негативный рецептор

[0208] В настоящем изобретении предложены композиции и способы для модифицированных иммунных клеток или их предшественников со сниженной экспрессией генов, содержащих CAR и доминантно-негативный рецептор. Таким образом, в некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка, содержащая

инсерцию и/или делецию в одном или более локусах генов, кодирующих эндогенный иммунологический белок, дополнительно генетически модифицирована с целью экспрессии доминантно-негативного рецептора. В настоящем документе термин «доминантно-негативный рецептор» относится к молекуле, предназначенной для снижения влияния негативной сигнальной молекулы (например, влияния негативной сигнальной молекулы на модифицированную иммунную клетку согласно настоящему изобретению). Доминантно-негативный рецептор представляет собой укороченный вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом. В некоторых вариантах реализации белок, ассоциированный с негативным сигналом, выбран из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, BTLA, TGF β RII, VSIG3, VSIG8 и TIM-3.

[0209] Доминантно-негативный рецептор согласно настоящему изобретению может связывать негативную сигнальную молекулу (например, CTLA4, PD-1, BTLA, TGF β RII, VSIG3, VSIG8 и TIM-3) за счет внеклеточного домена, ассоциированного с негативным сигналом, и может снижать влияние указанной негативной сигнальной молекулы. Например, модифицированная иммунная клетка, содержащая доминантно-негативный рецептор, может связывать негативную сигнальную молекулу в микроокружении модифицированной иммунной клетки, однако это связывание не передает этот сигнал в клетку для изменения активности модифицированной Т-клетки. Напротив, указанное связывание блокирует негативную сигнальную молекулу и предотвращает ее связывание с эндогенным рецептором/лигандом, тем самым снижая влияние негативной сигнальной молекулы на модифицированную иммунную клетку. Таким образом, для снижения иммуносупрессивных эффектов определенной молекулы иммунные клетки можно модифицировать с целью экспрессии доминантно-негативного рецептора, который является доминантно-негативным рецептором.

[0210] В некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор включает укороченный вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом. В некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор содержит вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и по существу не содержащий внутриклеточного сигнального домена. В некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор содержит внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным

сигналом, и трансмембранный домен. В некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор представляет собой доминантно-негативный рецептор PD-1, CTLA4, BTLA, TGF β RII, VSIG3, VSIG8 или TIM-3. В некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор представляет собой PD-1 или TGF β RII. В некоторых вариантах реализации TGF β RII содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах реализации TGF β RII кодирует нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 77.

[0211] Специалистам в данной области техники известны допустимые изменения доминантно-негативного рецептора при сохранении его заданной биологической активности (например, блокирования негативного сигнала и/или изоляции молекулы, передающей негативный сигнал, при экспрессии в клетке). Соответственно, в некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор согласно настоящему изобретению может кодировать нуклеотидная последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичная нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах реализации доминантно-негативный рецептор согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 76.

Г. Хемокин и цитокин как иммуностимулирующие факторы для улучшения приспособляемости

[0212] В настоящем изобретении предложены композиции и способы для

модифицированных иммунных клеток со сниженной экспрессией иммунологического гена, содержащих CAR и дополнительно содержащих доминантно-негативный рецептор, переключающий рецептор, хемокин, рецептор хемокина, цитокин, рецептор цитокина, интерлейкин-7 (ИЛ-7), рецептор интерлейкина-7 (ИЛ-7R), интерлейкин-15 (ИЛ-15), рецептор интерлейкина-15 (ИЛ-15R), интерлейкин-21 (ИЛ-21), интерлейкин-18 (ИЛ-18), CCL21, CCL19 или их комбинацию. В некоторых вариантах реализации хемокин, рецептор хемокина, цитокин, рецептор цитокина, ИЛ-7, ИЛ-7R, ИЛ-15, ИЛ-15R, ИЛ-21, ИЛ-18, лиганд 21 хемокинов с C-C-мотивом (CCL21) или лиганд 19 хемокинов с C-C-мотивом (CCL19) представляет собой иммуностимулирующий фактор, улучшающий приспособляемость заявленной модифицированной иммунной клетки. Безотносительно к теоретическим представлениям, добавление хемокина, рецептора хемокина, цитокина, рецептора цитокина, ИЛ-7, ИЛ-7R, ИЛ-15, ИЛ-15R, ИЛ-21, ИЛ-18, CCL21 или CCL19 к модифицированной иммунной клетке усиливает эффект, индуцирующий иммунитет, и противоопухолевую активность модифицированной иммунной клетки.

[0213] Безотносительно к теоретическим представлениям, интерлейкины и хемокины могут способствовать усилению примирования Т-клеток и/или инфильтрации Т-клеток в солидную опухоль. Например, при микросателлитно-стабильном раке оболочной и прямой кишки (CRC) с низкой Т-клеточной инфильтрацией ИЛ-15 способствует примированию Т-клеток. В некоторых вариантах реализации комбинация CAR и комплекса рецептора хемокина/интерлейкина способствует примированию Т-клеток. Кроме того, ИЛ-15 может индуцировать NK-клеточную инфильтрацию. В некоторых вариантах реализации реакция на комплекс ИЛ-15/ИЛ-15RA может привести к NK-клеточной инфильтрации. В определенных вариантах реализации модифицированная иммунная клетка, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит комплекс ИЛ-15/ИЛ-15Ra. В некоторых вариантах реализации комплекс ИЛ-15/ИЛ-15Ra выбран из NIZ985 (Novartis), ATL-803 (Altor) или CYP0150 (Cytune). В некоторых вариантах реализации комплекс ИЛ-15/ИЛ-15RA представляет собой NIZ985. В некоторых вариантах реализации ИЛ-15 стимулирует устранение (например, уничтожение) клеток рака поджелудочной железы естественными киллерами. В некоторых вариантах реализации терапевтический ответ на модифицированную иммунную клетку, описанную в настоящем документе, дополнительно содержащую ИЛ-15/ИЛ-15Ra, ассоциирован с инфильтрацией естественных киллеров в

животной модели рака ободочной и прямой кишки. В некоторых вариантах реализации комплекс ИЛ-15/ИЛ-15Ra содержит ИЛ-15 человека в комплексе с растворимой формой ИЛ-15Ra человека. Указанный комплекс может содержать ИЛ-15, ковалентно или нековалентно связанный с растворимой формой ИЛ-15Ra. В конкретном варианте реализации ИЛ-15 человека нековалентно связан с растворимой формой ИЛ-15Ra.

[0214] Неэффективность CAR T-клеточной терапии против солидных опухолей частично вызвана ограниченным рекрутингом и накоплением иммунных клеток и CAR T-клеток в солидных опухолях. Одним из подходов к решению этой проблемы является конструирование CAR T-клеток, имитирующих функцию фибробластных ретикулярных клеток (FRC) T-зоны. Лимфатический узел отвечает за обнаружение патогенов и иммуногенов. T-зона содержит три типа клеток: (1) клетки врожденного иммунитета, например, дендритные клетки, моноциты, макрофаги и гранулоциты; (2) клетки адаптивного иммунитета, например, CD4- и CD8-лимфоциты, и (3) стромальные клетки (FRC). Эти клетки взаимодействуют, вызывая эффективный иммунный ответ против патогена посредством облегчения активации, дифференцировки и созревания CD4 T-клеток. FRC особенно важны, поскольку они образуют сеть, позволяющую дендритным клеткам и T-клеткам перемещаться по всему лимфатическому узлу и привлекающую B-клетки. В частности, FRC обеспечивают сеть для: (i) рекрутинга наивных T-клеток, B-клеток и дендритных клеток в лимфатический узел путем высвобождения двух хемокинов (CCL21 и CCL19); (ii) выживания T-клеток путем секреции ИЛ-7, который является фактором выживания, особенно наивных T-клеток; и (iii) транспорта CD4 T-клеток к зародышевому центру (GC; другой части лимфатического узла). Соответственно, CAR, модифицированный экзогенным CCL21 или CCL19 и ИЛ-7, должен усиливать рекрутинг T-клеток, B-клеток и дендритных клеток в солидные опухоли. В некоторых вариантах реализации модифицированная T-клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуностимулирующий фактор, причем указанная нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий фактор, представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую интерлейкин-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19 или CCL21.

[0215] В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота иммуностимулирующего фактора (т.е. хемокина, рецептора хемокина, цитокина, рецептора цитокина, ИЛ-7, ИЛ-7R, ИЛ-15, ИЛ-15R, ИЛ-21, ИЛ-18, CCL21 или CCL19) объединена с

CAR. В некоторых вариантах реализации хемокин, рецептор хемокина, цитокин, рецептор цитокина, ИЛ-7, ИЛ-7R, ИЛ-15, ИЛ-15R, ИЛ-21, ИЛ-18, CCL21 или CCL19 присоединены к CAR посредством саморасщепляющегося пептида, например, P2A, T2A, E2A или F2A.

VI. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОЙ Т-КЛЕТКИ

[0216] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения модифицированной иммунной клетки (например, аллогенной Т-клетки, НК-клетки или НКТ-клетки). Модифицированную иммунную клетку согласно настоящему изобретению, как правило, конструируют путем (1) введения в иммунную клетку одной или более нуклеиновых кислот, способных снижать экспрессию одного или более эндогенных иммунологических генов, кодирующих эндогенный иммунологический белок; (2) введения в иммунную клетку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор; и (3) размножения модифицированной иммунной клетки для получения модифицированных иммунных Т-клеток. Такую модифицированную иммунную клетку можно включить в терапевтическую композицию и ввести пациенту, нуждающемуся в этом.

[0217] В некоторых вариантах реализации способ получения модифицированной иммунной клетки согласно настоящему изобретению включает введение в иммунную клетку одной или более нуклеиновых кислот, способных подавлять экспрессию одного или более эндогенных иммунологических генов. Один или более иммунологических генов кодируют эндогенный иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, SIPA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). Кроме того, в иммунную клетку также вводят экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (KIR), антигенсвязывающий полипептид, лиганд рецептора клеточной поверхности или опухолевый антиген. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает введение в иммунную клетку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей доминантно-негативный рецептор, переключающий рецептор или их комбинацию.

А. Способ введения нуклеиновой кислоты в клетку

[0218] Способы введения нуклеиновых кислот в клетку включают физические, биологические и химические способы. Физические способы введения полинуклеотида, например, РНК, в клетку-хозяина включают осаждение с фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. РНК можно вводить в клетки-мишени с использованием коммерчески доступных способов, которые включают электропорацию (Amaha Nucleofector-II (Amaha Biosystems, Кельн, Германия)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Бостон, Массачусетс) или Gene Pulser II (BioRad, Денвер, Колорадо), Multiporator (Eppendorf, Гамбург, Германия). РНК также можно вводить в клетки с использованием катионной липосомно-опосредованной трансфекции, с использованием липофекции, с использованием инкапсуляции в полимеры, с использованием пептид-опосредованной трансфекции или с использованием биолистических систем доставки частиц, например, «генных пушек».

1. Биологические способы

[0219] Биологические способы введения целевого полинуклеотида в клетку-хозяина (например, иммунную клетку) включают применение ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы, особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом введения генов в клетки млекопитающих (например, клетки человека). Другие вирусные векторы могут происходить от лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов и т.п. См., например, патент США № 5350674 и 5585362.

[0220] В некоторых вариантах реализации нуклеиновую кислоту, кодирующую рассматриваемый CAR, рассматриваемый рекомбинантный TCR, рассматриваемый KIR, рассматриваемый антигенсвязывающий полипептид, рассматриваемый лиганд рецептора клеточной поверхности, рассматриваемый опухолевый антиген, рассматриваемый переключающий рецептор и/или рассматриваемый доминантно-негативный рецептор согласно настоящему изобретению, вводят в клетку с помощью экспрессирующего вектора. В настоящем документе предложены экспрессирующие векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую рассматриваемый CAR, рассматриваемый рекомбинантный TCR, рассматриваемый KIR, рассматриваемый антигенсвязывающий

полипептид, рассматриваемый лиганд рецептора клеточной поверхности, рассматриваемый опухолевый антиген, рассматриваемый переключающий рецептор и/или рассматриваемый доминантно-негативный рецептор. Подходящие экспрессирующие векторы включают лентивирусные векторы, гамма-ретровирусные векторы, спумавирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), аденовирусные векторы, рекомбинантные гибридные вирусы, депротеинизированную ДНК, включая транспозон-опосредованные векторы, например, Sleeping Beauty, Piggyback и интегразы, например, Phi31, но не ограничиваясь ими. Некоторые другие подходящие экспрессирующие векторы включают экспрессирующие векторы на основе вируса простого герпеса (ВПГ) и ретровирусов.

[0221] Экспрессирующие аденовирусные векторы основаны на аденовирусах, обладающих низкой способностью к встраиванию в геномную ДНК, но высокой эффективностью в отношении трансфекции клеток-хозяев. Экспрессирующие аденовирусные векторы содержат последовательности аденовируса, достаточные для: (a) поддержки упаковки экспрессирующего вектора и (b) прежде всего, экспрессии рассматриваемого CAR, рассматриваемого рекомбинантного TCR, рассматриваемого KIR, рассматриваемого антигенсвязывающего полипептида, рассматриваемого лиганда рецептора клеточной поверхности, рассматриваемого опухолевого антигена, рассматриваемого переключающего рецептора и/или рассматриваемого доминантно-негативного рецептора в клетке-хозяине. В некоторых вариантах реализации геном аденовируса представляет собой линейную двуцепочечную ДНК размером 36 т.п.о., где размещают последовательность чужеродной ДНК. Например, можно ввести нуклеиновую кислоту, кодирующую рассматриваемый CAR, рассматриваемый TCR, рассматриваемый рекомбинантный TCR, рассматриваемый KIR, рассматриваемый антигенсвязывающий полипептид, рассматриваемый лиганд рецептора клеточной поверхности, рассматриваемый опухолевый антиген, рассматриваемый переключающий рецептор и/или рассматриваемый доминантно-негативный рецептор, с заменой крупных фрагментов аденовирусной ДНК с целью получения экспрессирующего вектора согласно настоящему изобретению.

[0222] Другой экспрессирующий вектор основан на аденоассоциированном вирусе, который использует преимущества систем, связанных с аденовирусом. Этот экспрессирующий AAV-вектор характеризуется высокой частотой встраивания в геном хозяина. Он может инфицировать неделящиеся клетки, что делает его пригодным для

доставки генов в клетки млекопитающих, например, в тканевых культурах или *in vivo*. AAV-вектор характеризуется широким спектром хозяев, в отношении которых он проявляет инфицирующую способность. Подробная информация о получении и применении AAV-векторов описана в патентах США № 5139941 и 4797368.

[0223] Экспрессирующие ретровирусные векторы способны встраиваться в геном хозяина, доставлять большое количество чужеродного генетического материала, инфицировать широкий спектр видов животных и типов клеток и упаковываться в клетках специальных линий. Ретровирусный вектор конструируют путем вставки нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей рассматриваемый CAR, рассматриваемый рекомбинантный TCR, рассматриваемый KIR, рассматриваемый антигенсвязывающий полипептид, рассматриваемый лиганд рецептора клеточной поверхности, рассматриваемый опухолевый антиген, рассматриваемый переключающий рецептор и/или рассматриваемый доминантно-негативный рецептор) в определенные местоположения в составе вирусного генома с получением вируса, который является дефектным с точки зрения репликации. Хотя ретровирусные векторы способны инфицировать широкий спектр типов клеток, встраивание и стабильная экспрессия рассматриваемого CAR, рассматриваемого рекомбинантного TCR, рассматриваемого KIR, рассматриваемого антигенсвязывающего полипептида, рассматриваемого лиганда рецептора клеточной поверхности, рассматриваемого опухолевого антигена, рассматриваемого переключающего рецептора и/или рассматриваемого доминантно-негативного рецептора требуют деления клеток-хозяев.

[0224] Lentivirusные векторы происходят от лентивирусов, которые представляют собой сложные ретровирусы, содержащие другие гены с регуляторной или структурной функцией в дополнение к общим ретровирусным генам *gag*, *pol* и *env*. См., например, патенты США № 6013516 и 5994136. Некоторые примеры лентивирусов включают вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и вирус иммунодефицита обезьян (ВИО). Lentivirusные векторы получают путем многократного ослабления генов вирулентности ВИЧ, например, удаления генов *env*, *vif*, *vpr*, *vri* и *nef*, что делает вектор биологически безопасным. Lentivirusные векторы способны инфицировать неделящиеся клетки, их можно использовать для переноса генов и экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей рассматриваемый CAR, рассматриваемый рекомбинантный TCR, рассматриваемый KIR,

рассматриваемый антигенсвязывающий полипептид, рассматриваемый лиганд рецептора клеточной поверхности, рассматриваемый опухолевый антиген, рассматриваемый переключающий рецептор и/или рассматриваемый доминантно-негативный рецептор как *in vivo*, так и *ex vivo*. См., например, патент США № 5994136.

[0225] Экспрессирующие векторы, содержащие нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, можно вводить в клетку-хозяина с помощью любых средств, известных специалистам в данной области техники. Экспрессирующие векторы при необходимости могут включать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы, экспрессирующие векторы можно вводить путем слияния, электропорации, биолистики, трансфекции, липофекции и т.п. Клетку-хозяина (например, иммунную клетку) можно выращивать и размножать в культуре перед введением экспрессирующих векторов с последующей соответствующей обработкой для введения и встраивания векторов. Затем клетки-хозяева (например, иммунные клетки) размножают; кроме того, их можно подвергать скринингу с использованием маркера, присутствующего в векторах. В некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты, кодирующие рассматриваемый CAR, рассматриваемый рекомбинантный TCR, рассматриваемый KIR, рассматриваемый антигенсвязывающий полипептид, рассматриваемый лиганд рецептора клеточной поверхности, рассматриваемый опухолевый антиген, рассматриваемый переключающий рецептор и/или рассматриваемый доминантно-негативный рецептор, вводят в иммунную клетку путем вирусной трансдукции. В некоторых вариантах реализации вирусная трансдукция включает приведение иммунной клетки в контакт с вирусным вектором, содержащим одну или более нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации указанный вирусный вектор выбран из группы, состоящей из ретровирусного вектора, векторов на основе вируса Сендай, аденовирусных векторов, векторов на основе аденоассоциированного вируса и лентивирусных векторов. Различные маркеры, которые можно применять, известны в данной области техники и могут включать *hprt*, устойчивость к неомицину, тимидинкиназу, устойчивость к гигромицину и т. д. В настоящем документе термины «клетка», «линия клеток» и «культура клеток» могут использоваться взаимозаменяемо. В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин представляет собой иммунную клетку или ее предшественника. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные клетки представляют собой рекомбинантные Т-лимфоциты (Т-клетки),

наивные Т-клетки (ТN), Т-клетки памяти (например, центральные Т-клетки памяти (ТСМ), эффекторные клетки памяти (ТЕМ)), естественные киллеры (НК-клетки) и макрофаги, способные давать терапевтически значимое потомство. В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин представляет собой Т-клетку, НК-клетку или НКТ-клетку. В некоторых вариантах реализации иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественного киллера (НК-клетки), естественного Т-киллера, лимфоидной клетки-предшественника, гемопоэтической стволовой клетки, стволовой клетки, макрофага и дендритной клетки. В некоторых вариантах реализации иммунная клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку или CD8⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах реализации иммунная клетка представляет собой аллогенную Т-клетку или аутологичную Т-клетку. В некоторых вариантах реализации аллогенная Т-клетка или аутологичная Т-клетка представляет собой клетку человека.

[0226] Модифицированные иммунные клетки согласно настоящему изобретению (например, содержащие нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию гена, CAR, KIR, TCR, доминантно-негативный рецептор и/или переключающий рецептор) можно получать путем стабильной трансфекции клеток-хозяев (например, иммунных клеток) экспрессирующим вектором, содержащим нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению. Дополнительные способы получения модифицированной клетки согласно настоящему изобретению включают, без ограничения, способы химической трансформации (например, с использованием фосфата кальция, дендримеров, липосом и/или катионных полимеров), способы нехимической трансформации (например, электропорации, оптической трансформации, электропереноса генов и/или гидродинамической доставки) и/или способы на основе частиц (например, импалефекции, с использованием генной пушки и/или магнитофекции). Трансфицированные клетки (т.е. иммунные клетки), экспрессирующие нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию гена, CAR, KIR, TCR, доминантно-негативный рецептор и/или переключающий рецептор согласно настоящему изобретению, можно размножить *ex vivo*.

2. Физические способы

[0227] Физические способы введения экспрессирующего вектора в клетки-хозяева включают осаждение с фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами,

микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, включающие векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001).

3. Химические способы

[0228] Химические способы введения экспрессирующего вектора в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, например, комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, например, комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типичная коллоидная система, применяемая в качестве носителя для доставки *in vitro* и *in vivo*, представляет собой липосому (например, искусственную мембранную везикулу).

[0229] Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иного воздействия на клетку ингибитором согласно настоящему изобретению, для подтверждения присутствия нуклеиновых кислот в клетке-хозяине можно выполнять различные анализы. Такие анализы включают, например, молекулярно-биологические анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, например, саузерн-блоттинг и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; биохимические анализы, например, обнаружение присутствия или отсутствия конкретного пептида (например, иммунологические средства (твердофазный ИФА и вестерн-блоттинг) или анализы, описанные в настоящем документе в целях выявления агентов, входящих в рамки настоящего изобретения.

[0230] Кроме того, нуклеиновые кислоты можно вводить любыми способами, например, посредством трансдукции размноженных клеток-хозяев (например, иммунных клеток), трансфекции размноженных клеток-хозяев (например, иммунных клеток) и электропорация размноженных клеток-хозяев (например, иммунных клеток). Одну нуклеиновую кислоту можно ввести одним способом, а другую нуклеиновую кислоту можно ввести в указанную

клетку-хозяина (например, иммунные клетки) другим способом.

4. РНК

[0231] В одном варианте реализации нуклеиновые кислоты, введенные в клетку-хозяина (например, иммунную клетку), представляют собой РНК. В еще одном варианте реализации РНК представляет собой мРНК, содержащую РНК, транскрибированную *in vitro*, или синтетическую РНК. РНК получают путем транскрипции *in vitro* с использованием матрицы, полученной с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Целевую ДНК из любого источника можно непосредственно преобразовать с помощью ПЦР в матрицу для синтеза мРНК *in vitro* с использованием соответствующих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может быть геномная ДНК, плазмидная ДНК, фаговая ДНК, кДНК, синтетическая последовательность ДНК или любой другой подходящий источник ДНК.

[0232] ПЦР можно использовать для получения матрицы для транскрипции мРНК *in vitro*, которую затем вводят в клетки. Способы выполнения ПЦР хорошо известны в данной области техники. Праймеры для применения в ПЦР конструируют таким образом, чтобы они содержали области, по существу комплементарные областям ДНК, которые будут использоваться в качестве матрицы для ПЦР. В настоящем документе термин «по существу комплементарный» относится к последовательностям нуклеотидов, в которых большинство или все основания в последовательности праймера являются комплементарными, или одно или более оснований не являются комплементарными или не совпадают. По существу комплементарные последовательности способны отжигаться или гибридизоваться с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях отжига, используемых для ПЦР. Праймеры можно конструировать таким образом, чтобы они являлись по существу комплементарными любому фрагменту ДНК-матрицы. Например, можно сконструировать праймеры для амплификации фрагмента гена, который обычно транскрибируется в клетках (открытой рамки считывания), включая 5'- и 3'-НТО. Кроме того, можно сконструировать праймеры для амплификации фрагмента гена, который кодирует конкретный целевой домен. В одном варианте реализации праймеры предназначены для амплификации кодирующей области кДНК человека, полностью или частично включая 5'- и 3'-НТО. Праймеры, пригодные для ПЦР, получают с помощью синтетических способов, хорошо

известных в данной области техники. «Прямые праймеры» представляют собой праймеры, содержащие область из нуклеотидов, по существу комплементарных нуклеотидам на ДНК-матрице, находящимся против хода транскрипции от последовательности ДНК, подлежащей амплификации. Термин «против хода транскрипции» в настоящем документе относится к положению в направлении 5' от последовательности ДНК, подлежащей амплификации, относительно кодирующей цепи. «Обратные праймеры» представляют собой праймеры, содержащие область нуклеотидов, по существу комплементарных двуцепочечной ДНК-матрице, расположенной по ходу транскрипции от последовательности ДНК, подлежащей амплификации. Термин «по ходу транскрипции» в настоящем документе относится к положению в направлении 3' от последовательности ДНК, подлежащей амплификации, относительно кодирующей цепи.

[0233] Кроме того, можно применять химические структуры, обладающие способностью повышать стабильность и/или эффективность трансляции РНК. РНК предпочтительно содержит 5'- и 3'-НТО. В одном варианте реализации длина 5'-НТО составляет от нуля до 3000 нуклеотидов. Длину 5'- и 3'-последовательностей НТО, добавляемых к кодирующей области, можно изменять различными способами, включая конструирование праймеров для ПЦР, отжигающихся с различными областями НТО, но не ограничиваясь этим. Используя этот подход, специалист в данной области техники может менять длину 5'- и 3'-НТО, необходимую для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибируемой РНК.

[0234] 5'- и 3'-НТО могут представлять собой природные эндогенные 5'- и 3'-НТО целевого гена. В качестве альтернативы можно добавлять последовательности НТО, не являющиеся эндогенными для целевого гена, путем включения последовательностей НТО в прямой и обратный праймеры или с помощью любых других модификаций матрицы. Применение последовательностей НТО, не являющихся эндогенными для целевого гена, может быть полезным для изменения стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что богатые AU элементы в 3'-НТО-последовательностях могут снижать стабильность мРНК. Следовательно, можно выбрать или сконструировать 3'-НТО в целях повышения стабильности транскрибируемой РНК на основании свойств НТО, хорошо известных в данной области техники.

[0235] В одном варианте реализации 5'-НТО может содержать последовательность Козака эндогенного гена. В качестве альтернативы, если с помощью ПЦР добавляют 5'-НТО, не являющуюся эндогенной для целевого гена, как описано выше, можно повторно сконструировать консенсусную последовательность Козака путем добавления 5'-НТО-последовательности. Последовательности Козака могут повышать эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, но, по-видимому, не требуются для обеспечения эффективной трансляции всех РНК. Требования к последовательностям Козака для многих мРНК известны в данной области техники. В других вариантах реализации 5'-НТО можно получить из РНК-вируса, РНК-геном которого стабилен в клетках. В других вариантах реализации в составе 3'- или 5'-НТО можно применять различные аналоги нуклеотидов в целях предотвращения разрушения мРНК экзонуклеазами.

[0236] Для обеспечения синтеза РНК с ДНК-матрицы без клонирования генов к ДНК-матрице можно присоединить промотор транскрипции в положении против хода транскрипции по отношению к последовательности, подлежащей транскрипции. Если к 5'-концу прямого праймера добавляют последовательность, функционирующую в качестве промотора для РНК-полимеразы, промотор РНК-полимеразы включается в продукт ПЦР в положении против хода транскрипции по отношению к открытой рамке считывания, подлежащей транскрипции. В одном варианте реализации указанный промотор представляет собой промотор полимеразы T7, описанный в другом разделе настоящего документа. Другие пригодные промоторы включают промоторы РНК-полимераз T3 и SP6, но не ограничиваются ими. Консенсусные нуклеотидные последовательности промоторов T7, T3 и SP6 известны в данной области техники.

[0237] В одном варианте реализации мРНК содержит как кэп на 5'-конце, так и 3'-поли(А)-хвост, которые определяют связывание рибосом, начало трансляции и стабильность мРНК в клетке. На кольцевой ДНК-матрице, например, плазмидной ДНК, РНК-полимераза продуцирует длинный конкатамерный продукт, не подходящий для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линеаризованной в конце 3'-НТО, приводит к получению мРНК нормального размера, транскрипция которой в эукариотических клетках неэффективна, даже если она полиаденилирована после транскрипции. На линейной ДНК-матрице РНК-полимераза фага T7 может удлинять 3'-конец транскрипта за пределы последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf,

Nuc Acids Res., 13: 6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem, 270: 1485-65 (2003).

[0238] Традиционным способом встраивания полиА/Т-фрагментов в матрицу ДНК является молекулярное клонирование. В то же время последовательность полиА/Т, встроенная в плазмидную ДНК, может приводить к нестабильности плазмиды, поэтому матрицы на основе плазмидной ДНК, полученные из бактериальных клеток, часто сильно загрязнены делециями и другими абберациями. Это делает процедуры клонирования не только трудоемкими и длительными, но часто и ненадежными. Поэтому очень желательная разработка способа, позволяющего конструировать ДНК-матрицы с 3'-фрагментом полиА/Т без клонирования. Сегмент polyА/Т ДНК-матрицы для транскрипции можно получить во время ПЦР с использованием обратного праймера, содержащего хвост polyТ, например, хвост 100Т (размер хвоста может составлять 50-5000 Т), или после ПЦР любым другим способом, включая лигирование ДНК или рекомбинацию *in vitro*, но не ограничиваясь ими. Поли(А)-хвосты также обеспечивают стабильность РНК и замедляют их разрушение. Как правило, длина поли(А)-хвоста положительно коррелирует со стабильностью транскрибируемой РНК. В одном варианте реализации поли(А)-хвост содержит от 100 до 5000 оснований аденозина.

[0239] Поли(А)-хвосты РНК можно дополнительно удлинять после транскрипции *in vitro* с использованием поли(А)-полимеразы, например, полиА-полимеразы *E. coli* (E-PAP). В одном варианте реализации удлинение поли(А)-хвоста со 100 нуклеотидов до 300-400 нуклеотидов приводит к приблизительно двукратному увеличению эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение различных химических групп к 3'-концу может повысить стабильность мРНК. Такой присоединяемый фрагмент может содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, в поли(А)-хвост можно включать аналоги АТФ с использованием поли(А)-полимеразы. Аналоги АТФ могут дополнительно повышать стабильность РНК. 5'-кэпы также обеспечивают стабильность молекул РНК. В предпочтительном варианте реализации РНК, полученные способами, описанными в настоящем документе, включают 5'-кэп. 5'-кэп получают с применением методик, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе. Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.* 29:436-444 (2001); Stepinski, et

al, *RNA* 7: 1468-95 (2001); Elango, et al, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 330:958-966 (2005).

[0240] РНК, полученные способами, описанными в настоящем документе, также могут содержать последовательность внутреннего сайта посадки рибосом (IRES). Последовательность IRES может представлять собой любую вирусную, хромосомную или искусственно сконструированную последовательность, инициирующую кэп-независимое связывание рибосомы с мРНК и облегчающее инициацию трансляции. Можно включать любые растворители, подходящие для электропорации клеток, которые могут содержать факторы, способствующие проницаемости и жизнеспособности клеток, например, углеводы, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества. В некоторых вариантах реализации выполняют электропорацию РНК, например, РНК, транскрибированной *in vitro*, в клетки.

[0241] Предложенные способы можно применять для модулирования активности клеток-хозяев в фундаментальных исследованиях и терапии, в областях онкологии, стволовых клеток, острых и хронических инфекций и аутоиммунных заболеваний, включая оценку способности генетически модифицированной клетки-хозяина уничтожать раковую клетку-мишень.

[0242] Указанные способы также обеспечивают возможность контроля уровня экспрессии в широком диапазоне путем изменения, например, промотора или количества входной РНК, что позволяет индивидуально регулировать уровень экспрессии. Кроме того, метод продукции мРНК на основе ПЦР значительно облегчает конструирование мРНК с различными структурами и комбинациями доменов. Одним из преимуществ способов трансфекции РНК согласно настоящему изобретению является то, что трансфекция РНК является по существу временной и осуществляется без использования векторов. РНК-трансген можно доставить в лимфоцит и экспрессировать в нем после краткой активации клеток *in vitro* в виде минимальной экспрессирующей кассеты без необходимости использования каких-либо дополнительных вирусных последовательностей. В этих условиях встраивание трансгена в геном клетки-хозяина маловероятно. Клонирование клеток не требуется из-за эффективности трансфекции РНК и ее способности равномерно модифицировать всю популяцию лимфоцитов.

[0243] Соответственно, в настоящем изобретении предложен способ получения

модифицированной иммунной клетки или ее клетки-предшественника, включающий введение в иммунную клетку одной или более нуклеиновых кислот, способных подавлять экспрессию одного или более эндогенных иммунологических генов, описанных в настоящем документе, с использованием любого из способов редактирования генов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в данной области техники. Подавление экспрессии эндогенного гена, участвующего в формировании иммунного ответа на клетку, например, цепи TCR α , цепи TCR β , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , молекулы HLA-I (например, бета-2-микроглобулина, TAP1, TAP2, TAPBP или NLRC5) или молекулы HLA-II (например, СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или инвариантной цепи), снижает иммуноопосредованное отторжение модифицированной Т-клетки. Например, подавление экспрессии генов эндогенных компонентов рецептора TCR, MHC-I или MHC-II, бета-2-микроглобулина, СИТА устраняет поверхностную презентацию аллоантигенов на Т-клетке, которая может вызывать отторжение иммунной системой хозяина. В некоторых вариантах реализации в Т-клетку вводят нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию эндогенных генов, например, путем электропорации, трансфекции или лентивирусной или другой вирусной трансдукции. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает модифицированную Т-клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, введенную путем электропорации и способную подавлять экспрессию эндогенного гена. В некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты вводят в иммунную клетку посредством вирусной трансдукции. В некоторых вариантах реализации вирусная трансдукция включает приведение иммунной клетки в контакт с вирусным вектором, содержащим одну или более нуклеиновых кислот. В одном варианте реализации вирусный вектор выбран из группы, состоящей из ретровирусного вектора, векторов на основе вируса сендай, аденовирусных векторов, векторов на основе аденоассоциированного вируса и лентивирусных векторов.

В. Способ генетического редактирования иммунной клетки

[0244] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ генетического редактирования иммунной клетки, включающий введение в иммунную клетку одной или более нуклеиновых кислот, способных подавлять экспрессию одного или более эндогенных иммунологических генов, кодирующих эндогенный иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5,

HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). В одном варианте реализации способ генетического редактирования модифицированной иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов субъединицы Т-клеточного рецептора, выбранной из CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ . В одном варианте реализации способ генетического редактирования модифицированной иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию гена молекулы HLA I класса, выбранной из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP или NLRC5. В одном варианте реализации способ генетического редактирования модифицированной иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию гена молекулы HLA II класса, выбранной из HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или инвариантной цепи (Ii-цепи).

[0245] В некоторых вариантах реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию гена CD3 δ и экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации. В некоторых вариантах реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию гена CD3 ϵ и экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации. В некоторых вариантах реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию гена CD3 γ и экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации. В некоторых вариантах реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию гена CD3 γ и экспрессию генов CD3 ϵ , B2M и СИТА.

[0246] В некоторых вариантах реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов: (1) CD3 ϵ , B2M и RFX5; (2) CD3 ϵ , B2M и RFXAP; (3) CD3 ϵ , B2M и

RFXANK; (4) CD3ε, B2M и HLA-DM; (5) CD3ε, B2M и Ii-цепи; (6) CD3ε, TAP1 и СИТА; (7) CD3ε, TAP1 и RFX5; (8) CD3ε, TAP1 и RFXAP; (9) CD3ε, TAP1 и RFXANK; (10) CD3ε, TAP1 и HLA-DM; (11) CD3ε, TAP1 и Ii-цепи; (12) CD3ε, TAP2 и СИТА; (13) CD3ε, TAP2 и RFX5; (14) CD3ε, TAP2 и RFXAP; (15) CD3ε, TAP2 и RFXANK; (16) CD3ε, TAP2 и HLA-DM; (17) CD3ε, TAP2 и Ii-цепи; (18) CD3ε, NLRC5 и СИТА; (19) CD3ε, NLRC5 и RFX5; (20) CD3ε, NLRC5 и RFXAP; (21) CD3ε, NLRC5 и RFXANK; (22) CD3ε, NLRC5 и HLA-DM; (23) CD3ε, NLRC5 и Ii-цепи; (24) CD3ε, TAPBP и СИТА; (25) CD3ε, TAPBP и RFX5; (26) CD3ε, TAPBP и RFXAP; (27) CD3ε, TAPBP и RFXANK; (28) CD3ε, TAPBP и HLA-DM; или (29) CD3ε, TAPBP и Ii-цепи.

[0247] В некоторых вариантах реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов: (1) CD3δ, B2M и RFX5; (2) CD3δ, B2M и RFXAP; (3) CD3δ, B2M и RFXANK; (4) CD3δ, B2M и HLA-DM; (5) CD3δ, B2M и Ii-цепи; (6) CD3δ, TAP1 и СИТА; (7) CD3δ, TAP1 и RFX5; (8) CD3δ, TAP1 и RFXAP; (9) CD3δ, TAP1 и RFXANK; (10) CD3δ, TAP1 и HLA-DM; (11) CD3δ, TAP1 и Ii-цепи; (12) CD3δ, TAP2 и СИТА; (13) CD3δ, TAP2 и RFX5; (14) CD3δ, TAP2 и RFXAP; (15) CD3δ, TAP2 и RFXANK; (16) CD3δ, TAP2 и HLA-DM; (17) CD3δ, TAP2 и Ii-цепи; (18) CD3δ, NLRC5 и СИТА; (19) CD3δ, NLRC5 и RFX5; (20) CD3δ, NLRC5 и RFXAP; (21) CD3δ, NLRC5 и RFXANK; (22) CD3δ, NLRC5 и HLA-DM; (23) CD3δ, NLRC5 и Ii-цепи; (24) CD3δ, TAPBP и СИТА; (25) CD3δ, TAPBP и RFX5; (26) CD3δ, TAPBP и RFXAP; (27) CD3δ, TAPBP и RFXANK; (28) CD3δ, TAPBP и HLA-DM; или (29) CD3δ, TAPBP и Ii-цепи.

[0248] В некоторых вариантах реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов: (1) CD3γ, B2M и RFX5; (2) CD3γ, B2M и RFXAP; (3) CD3γ, B2M и RFXANK; (4) CD3γ, B2M и HLA-DM; (5) CD3γ, B2M и Ii-цепи; (6) CD3γ, TAP1 и СИТА; (7) CD3γ, TAP1 и RFX5; (8) CD3γ, TAP1 и RFXAP; (9) CD3γ, TAP1 и RFXANK; (10) CD3γ, TAP1 и HLA-DM; (11) CD3γ, TAP1 и Ii-цепи; (12) CD3γ, TAP2 и СИТА; (13) CD3γ, TAP2 и RFX5; (14) CD3γ, TAP2 и RFXAP; (15) CD3γ, TAP2 и RFXANK; (16) CD3γ, TAP2 и HLA-DM; (17) CD3γ, TAP2 и Ii-цепи; (18) CD3γ, NLRC5 и СИТА; (19) CD3γ, NLRC5 и RFX5; (20) CD3γ, NLRC5 и RFXAP; (21) CD3γ, NLRC5 и RFXANK; (22) CD3γ, NLRC5 и HLA-DM; (23)

CD3 γ , NLRC5 и Ii-цепи; (24) CD3 γ , TAPBP и CIITA; (25) CD3 γ , TAPBP и RFX5; (26) CD3 γ , TAPBP и RFXAP; (27) CD3 γ , TAPBP и RFXANK; (28) CD3 γ , TAPBP и HLA-DM или (29) CD3 γ , TAPBP и Ii-цепи.

[0249] В некоторых вариантах реализации предложен способ генетического редактирования иммунной клетки, включающий введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов и содержащей систему редактирования генов, выбранную из группы, состоящей из антисмысловой РНК, антигомерной РНК, миРНК, кшРНК и системы CRISPR. Экспрессию эндогенного иммунологического гена можно подавлять, подвергать нокдауну, снижать и/или ингибировать за счет, например, антисмысловой РНК, антигомерной РНК, миРНК, кшРНК, системы CRISPR и т. д. В одном варианте реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов и включающей CRISPR-ассоциированную (Cas) (CRISPR-Cas) эндонуклеазную систему и направляющую РНК. В некоторых вариантах реализации указанная нуклеиновая кислота, способная подавлять экспрессию генов, содержит эндонуклеазу Cas, выбранную из группы, состоящей из Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, Cas9 *S. pyogenes* (spCas9), Cas9 *Staphylococcus aureus* (saCas9), нуклеазы MAD7 (CRISPR-нуклеазы V типа) и любой их комбинации. Способ генетического редактирования клетки хорошо известен в данной области техники и описан в настоящем документе.

[0250] В некоторых вариантах реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку CRISPR/Cas для повреждения одного или более эндогенных иммунологических генов в модифицированной клетке (например, модифицированной Т-клетке). В некоторых вариантах реализации CRISPR/Cas9 применяют для повреждения одного или более эндогенных иммунологических белков, выбранных из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). В некоторых типичных вариантах реализации CRISPR/Cas9 применяют для повреждения одного или более из эндогенных CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-

DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи), что приводит к подавлению экспрессии CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). Подходящие нРНК для применения при повреждении одного или более из эндогенных TRAC, TRBC, B2M, СИТА и/или PD1 приведены на фиг. 26 и 27. В некоторых вариантах реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку CRISPR/Cas и направляющей РНК для повреждения одного или более эндогенных иммунологических генов в модифицированной клетке (например, модифицированной Т-клетке). В одном варианте реализации способ генетического редактирования иммунной клетки включает введение в иммунную клетку CRISPR/Cas и направляющей РНК, причем направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в пределах одного или более локусов гена, выбранных из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи). Подходящие направляющие РНК (нРНК) для применения при повреждении одного или более из эндогенных CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи) приведены в таблице 4.

[0251] В одном варианте реализации предложен способ генетического редактирования иммунной клетки, включающий введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов и содержащей систему редактирования генов TALEN. В одном варианте реализации предложен способ генетического редактирования иммунной клетки, включающий введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов и включающей систему редактирования генов на основе нуклеазы с мотивом "цинковый палец" (ZFN). В одном варианте реализации предложен способ генетического редактирования иммунной клетки, включающий введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов, содержащей мегануклеазную систему редактирования генов. В одном варианте реализации предложен способ генетического редактирования иммунной клетки, включающий введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов и содержащей систему редактирования генов мега-TALEN. В одном варианте реализации предложен способ генетического редактирования модифицированной

иммунной клетки, включающий введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию генов и содержащей систему сайленсинга генов, выбранную из антисмысловой РНК, антигомерной РНК, РНКи, миРНК или кшРНК.

С. Размножение модифицированных иммунных клеток

[0252] В других вариантах реализации способ получения модифицированной Т-клетки, описанной в настоящем документе, дополнительно включает размножение модифицированной иммунной клетки для получения популяции модифицированных Т-клеток. Как до, так и после модификации иммунных клеток с целью экспрессии CAR, TCR, доминантно-негативного рецептора и/или переключающего рецептора модифицированные клетки можно активировать и размножить с использованием способов, известных в данной области техники. Например, иммунные клетки согласно настоящему изобретению можно размножать путем контакта с поверхностью, содержащей присоединенный к ней агент, стимулирующий сигнал, ассоциированный с комплексом CD3/TCR, и лиганд, стимулирующий костимулирующую молекулу на поверхности модифицированных иммунных клеток. В частности, популяции модифицированных иммунных клеток можно стимулировать путем контакта с антителом против CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом против CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Для совместной стимуляции вспомогательной молекулы на поверхности модифицированных иммунных клеток используют лиганд, связывающий вспомогательную молекулу. Например, модифицированные иммунные клетки могут контактировать с антителом против CD3 и антителом против CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации иммунных клеток. Примеры антитела против CD28 включают 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diaclone, Безансон, Франция), и их можно применять в настоящем изобретении наряду с другими способами и реагентами, известными в данной области техники.

[0253] Размножение модифицированных иммунных клеток способами, описанными в настоящем документе, может увеличить их количество приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз, 900 раз, 1000 раз, 2000 раз, 3000 раз, 4000 раз, 5000 раз, 6000 раз,

7000 раз, 8000 раз, 9000 раз, 10000 раз, 100000 раз, 1000000 раз, 10000000 раз или более, включая всевозможные целые числа между ними. В одном варианте реализации модифицированные иммунные клетки размножают в диапазоне от приблизительно 20 до приблизительно 50 раз.

[0254] После культивирования модифицированные иммунные клетки можно инкубировать в клеточной среде в аппарате для культивирования в течение определенного периода времени или пока клетки не достигнут конfluence или высокой плотности клеток для оптимального посева перед посевом клеток в другой аппарат для культивирования. Аппарат для культивирования может представлять собой любой аппарат для культивирования, обычно используемый для культивирования клеток *in vitro*. Уровень конfluence перед посевом клеток в другой аппарат для культивирования предпочтительно составляет 70% или более. В более предпочтительном случае уровень конfluence составляет 90% или более. Период времени может представлять собой любое время, подходящее для культивирования клеток *in vitro*. Среду для иммунных клеток можно менять в любое время в ходе культивирования иммунных клеток. Среду для иммунных клеток предпочтительно меняют приблизительно каждые 2-3 дня. Затем иммунные клетки собирают из аппарата для культивирования, после чего модифицированные иммунные клетки можно немедленно использовать или криоконсервировать для последующего хранения. В одном варианте реализации настоящее изобретение включает криоконсервацию размноженных модифицированных иммунных клеток. Криоконсервированные иммунные клетки размораживают перед введением нуклеиновых кислот в иммунную клетку.

[0255] В еще одном варианте реализации указанный способ включает выделение иммунных клеток и размножение иммунных клеток. В еще одном варианте реализации настоящее изобретение дополнительно включает криоконсервацию иммунных клеток перед размножением. В еще одном варианте реализации криоконсервированные иммунные клетки размораживают для электропорации с РНК, кодирующей химерный мембранный белок.

[0256] В еще одном варианте реализации способ получения модифицированной Т-клетки, описанный в настоящем документе, дополнительно включает размножение

модифицированной иммунной клетки *ex vivo*. В некоторых вариантах реализации культивирование *ex vivo* и размножение модифицированных иммунных клеток включает добавление клеточных факторов роста. В то же время можно добавлять и другие факторы, например, flt3-L, ИЛ-1, ИЛ-3 и лиганд c-kit. В некоторых вариантах реализации размножение модифицированной Т-клетки включает культивирование модифицированной Т-клетки с фактором, выбранным из группы, состоящей из flt3-L, ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21, TGF-бета, ИЛ-10 и лиганда c-kit. Этап культивирования, описанный в настоящем документе (контакт с агентами, описанными в настоящем документе, или после электропорации), может быть очень коротким, например, менее 24 часов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 часов. Этап культивирования может быть более продолжительным, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток.

[0257] Для описания клеток в культуре используют различные термины. Клеточная культура обычно относится к клеткам, взятым из живого организма и выращенным в контролируемых условиях. Первичная культура клеток представляет собой культуру клеток, тканей или органов, взятых непосредственно из организма и до первого субкультивирования. Клетки размножаются в культуре, когда их помещают в ростовую среду в условиях, облегчающих рост и/или деление клеток, что приводит к увеличению популяции клеток. При размножении клеток в культуре скорость пролиферации клеток обычно измеряют по количеству времени, необходимому для удвоения количества клеток, иначе известному как время удвоения.

[0258] Условия, подходящие для культивирования иммунных клеток, включают подходящую среду (например, минимальную основную среду или среду RPMI 1640 или X-vivo 15 (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, эмбриональную сыворотку КРС или человека), интерлейкин-2 (ИЛ-2), инсулин, ИФН-гамма, ИЛ-4, ИЛ-7, ГМКСФ, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-15, TGF-бета и ФНО-а, или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают поверхностно-активное вещество, плазманат и восстановители, например, N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол, но не ограничиваются ими.

[0259] Среда может включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, без сыворотки либо с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов, и/или количества цитокинов, достаточного для роста и размножения иммунных клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, а не в культуры клеток, подлежащие вливанию в организм субъекта. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при соответствующей температуре (например, 37 °C) и в атмосфере (например, воздух плюс 5% CO₂).

[0260] Среда, используемая для культивирования иммунных клеток, может включать агент, способный совместно стимулировать иммунные клетки. Например, агент, способный стимулировать CD3, представляет собой антитело против CD3, а агент, который может стимулировать CD28, представляет собой антитело против CD28. Это связано с тем, что, как показано на данных, приведенных в настоящем документе, клетку, выделенная способами, описанными в настоящем документе, можно размножить приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз, 900 раз, 1000 раз, 2000 раз, 3000 раз, 4000 раз, 5000 раз, 6000 раз, 7000 раз, 8000 раз, 9000 раз, 10000 раз, 100000 раз, 1000000 раз, 10000000 раз или более. В одном варианте реализации иммунные клетки размножают в диапазоне от приблизительно 20 до приблизительно 50 раз или более путем культивирования популяции, подвергнутой электропорации. В одном варианте реализации Т-регуляторные клетки человека размножают с помощью искусственных антигенпрезентирующих клеток КТ64.86, покрытых антителом против CD3 (aAPC). Способы размножения и активации иммунных клеток можно найти в патентах США № 7754482, 8722400 и 9555105, содержание которых полностью включено в настоящий документ.

D. Источники иммунных клеток

[0261] Перед размножением у субъекта получают источник иммунных клеток для манипуляций *ex vivo*. Источники клеток-мишеней для манипуляций *ex vivo* также могут включать, например, аутологичную или гетерологичную донорскую кровь, пуповинную кровь или костный мозг. Например, источником иммунных клеток может быть субъект,

подлежащий лечению модифицированными иммунными клетками согласно настоящему изобретению, например, кровь субъекта, пуповинная кровь субъекта или костный мозг субъекта. Неограничивающие примеры субъектов включают людей, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные разновидности. Субъект предпочтительно представляет собой человека.

[0262] Иммунные клетки можно получать из ряда источников, включая кровь, мононуклеары периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, ткань селезенки, пуповину, лимфу или лимфоидные органы. Иммунные клетки представляют собой клетки иммунной системы, например, клетки врожденного или адаптивного иммунитета, например, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т-клетки и/или НК-клетки. Другие типичные клетки включают стволовые клетки, например, мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). В некоторых аспектах указанные клетки представляют собой клетки человека. По отношению к субъекту, подлежащему лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. Клетки обычно представляют собой первичные клетки, например, выделенные непосредственно из организма субъекта и/или выделенные из организма субъекта и замороженные.

[0263] В некоторых вариантах реализации иммунная клетка представляет собой Т-клетку, например, CD8⁺ Т-клетку (например, CD8⁺ наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти или эффекторную Т-клетку памяти), CD4⁺ Т-клетку, естественный Т-киллер (НКТ-клетки), регуляторную Т-клетку (Treg), стволовую Т-клетку памяти, лимфоидную клетку-предшественницу, гемопоэтическую стволовую клетку, естественный киллер (НК-клетку) или дендритную клетку. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы. В одном варианте реализации клетка-мишень представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую (ИПС) клетку или клетку, полученную из ИПС-клетки, например, ИПС-клетки, полученной из организма субъекта и подвергнутой манипуляциям с целью изменения (например, внесения мутации) или манипуляциям экспрессией одного или более генов-мишеней, и дифференцировавшуюся, например, в Т-клетку, например, CD8⁺ Т-клетку (например, CD8⁺ наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти или эффекторную Т-

клетку памяти), CD4+ Т-клетку, стволовую Т-клетку памяти, лимфоидную клетку-предшественницу или гемопоэтическую стволовую клетку.

[0264] В некоторых вариантах реализации указанные клетки включают одно или более подмножеств Т-клеток или клеток другого типа, например, целые популяции Т-клеток, CD4+ клеток, CD8+ клеток и их субпопуляции, например, определяемые функцией, состоянием активации, зрелостью, способностью к дифференцировке, размножению, рециркуляции, локализацией и/или устойчивостью, антиген-специфичностью, типом антигенного рецептора, наличием в конкретном органе или компартменте, маркером или профилем секреции цитокинов и/или степенью дифференцировки.

[0265] К подтипам и субпопуляциям Т-клеток и/или CD4+ и/или CD8+ Т-клеток относятся наивные Т (TN) клетки, эффекторные Т-клетки (TEFF), Т-клетки памяти и их подтипы, например, стволовые Т-клетки памяти (TSCM), центральные Т-клетки памяти (TCM), эффекторные Т-клетки памяти (TEM) или окончательно дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, Т-хелперы, цитотоксические Т-клетки, инвариантные Т-клетки, ассоциированные с слизистыми (MAIT), естественные и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), Т-хелперы, например, TH1-клетки, TH2-клетки, TH3-клетки, TH17-клетки, TH9-клетки, TH22-клетки, фолликулярные Т-хелперы, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки. В определенных вариантах реализации можно использовать любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники.

[0266] В некоторых вариантах реализации способы включают выделение иммунных клеток из организма субъекта, их получение, обработку, культивирование и/или конструирование. В некоторых вариантах реализации получение рекомбинантных клеток включает один или более этапов культивирования и/или получения. Клетки для конструирования в соответствии с описанием можно выделить из образца, например, биологического образца, например, полученного из организма субъекта или происходящего из организма субъекта. В некоторых вариантах реализации субъект, из организма которого выделена клетка, представляет собой субъекта с заболеванием или патологическим состоянием, или нуждающегося в клеточной терапии, подлежащего введению клеточно-терапевтических средств. В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой человека,

нуждающегося в конкретном терапевтическом вмешательстве, например, адоптивной клеточной терапии, для которой выделяют, обрабатывают и/или конструируют клетки. Соответственно, клетки в некоторых вариантах реализации представляют собой первичные клетки, например, первичные клетки человека. Образцы включают образцы ткани, жидкости и другие образцы, взятые непосредственно из организма субъекта, а также образцы, полученные в результате одного или более этапов обработки, например, разделения, центрифугирования, генно-инженерных манипуляций (например, трансдукции вирусным вектором), промывки и/или инкубирования. Биологический образец может являться образцом, полученным непосредственно из биологического источника, или образцом, подвергаемым обработке. Биологические образцы включают биологические жидкости организма, например, кровь, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, синовиальную жидкость, мочу и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них, но не ограничиваются ими.

[0267] В некоторых аспектах образец, из которого получены или выделены иммунные клетки, представляет собой кровь или образец, полученный из крови, или получен из продукта афереза или лейкофереза. Типичные образцы включают цельную кровь, мононуклеары периферической крови (МПК), лейкоциты, костный мозг, тимус, биоптат ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником, лимфоидную ткань, ассоциированную с слизистыми, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкие, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другой орган и/или клетки, происходящие из них. В контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы включают образцы из аутологических и аллогенных источников.

[0268] В некоторых вариантах реализации клетки получают из линий клеток, например, линий Т-клеток. В некоторых вариантах реализации клетки получают из ксеногенного источника, например, мыши, крысы, примата, не являющегося человеком, и свиньи. В некоторых вариантах реализации выделение клеток включает один или более этапов получения и/или разделения клеток на неаффинной основе. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения

желательными компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на основе одного или более свойств, например, плотности, адгезивных свойств, размера, чувствительности и/или устойчивости к конкретным компонентам.

[0269] В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, с помощью афереза или лейкоафереза. В некоторых аспектах образцы содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах содержат клетки, не являющиеся эритроцитами и тромбоцитами. В некоторых вариантах реализации клетки крови, собранные из организма субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих этапов обработки. В некоторых вариантах реализации клетки промывают физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS). В некоторых случаях этап промывки осуществляют путем тангенциальной проточной фильтрации (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В определенных вариантах реализации клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах после промывки. В определенных вариантах реализации компоненты образца клеток крови удаляют, а клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде. В некоторых вариантах реализации способы включают способы разделения клеток на основе плотности, например, получение лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте перколла или фиколла.

[0270] В одном варианте реализации иммунные клетки получают из циркулирующей крови индивида путем афереза или лейкоафереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Клетки, собранные с помощью афереза, можно промыть для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду, например, физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS) или промывочный раствор, в котором отсутствует кальций и может отсутствовать магний или могут отсутствовать многие или все двухвалентные катионы, для последующих этапов обработки. Специалисты в данной области техники должны принимать во внимание, что этап промывки можно осуществить способами, известными специалистам в данной области

техники, например, с помощью полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, устройства для обработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывки клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, например, PBS, не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} , PlasmaLyte A или другом физиологическом растворе, содержащем или не содержащем буфер. В некоторых вариантах реализации нежелательные компоненты образца для афереза можно удалить, а клетки непосредственно ресуспендировать в культуральной среде.

[0271] В некоторых вариантах реализации способы выделения включают разделение клеток различных типов на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или более специфичных молекул, например, поверхностных маркеров, например, поверхностных белков, внутриклеточных маркеров или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации можно применять любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах реализации указанное разделение представляет собой разделение на основе сродства или иммунологического сродства. Например, в некоторых аспектах выделение включает разделение клеток и клеточных популяций на основе экспрессии или уровня экспрессии клетками одного или более маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубирования с антителом или партнером по связыванию, специфично связывающимся с такими маркерами, с последующей, как правило, промывкой и отделением клеток, связывающих антитело или партнера по связыванию, от клеток, не связывающих антитело или партнера по связыванию. Такие этапы разделения могут быть основаны на положительном отборе, при котором клетки, связывающие реагенты, сохраняют для дальнейшего использования, и/или отрицательном отборе, при котором сохраняют клетки, не связывающие антитело или партнера по связыванию. В некоторых примерах обе фракции сохраняют для дальнейшего использования. В некоторых аспектах отрицательный отбор может быть особенно полезным в случае отсутствия антитела, позволяющего специфично выявлять клетки определенного типа в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего выполнять на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желательной популяции. Разделение не обязательно приводит к 100% обогащению или удалению конкретной популяции клеток или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например,

положительный отбор или обогащение клетками конкретного типа, например, клетками, экспрессирующими маркер, относится к увеличению количества или процента таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогично, отрицательный отбор, удаление или истощение клеток определенного типа, например, клеток, экспрессирующих маркер, относится к уменьшению количества или процента таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток. В некоторых типичных вариантах реализации выполняют несколько циклов этапов разделения, при которых фракцию, отобранную посредством положительного или отрицательного отбора на одном этапе, подвергают другому этапу разделения, например, последующему положительному или отрицательному отбору. В некоторых типичных вариантах реализации один этап разделения может удалять клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, путем инкубирования клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждый из которых специфичен по отношению к маркеру, который является его мишенью, в целях отрицательного отбора. Аналогичным образом, можно выполнить одновременный положительный отбор клеток нескольких типов путем инкубирования клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессируемых на клетках различных типов.

[0272] В некоторых вариантах реализации одна или более популяций Т-клеток обогащены или обеднены клетками, которые являются положительными по (маркерⁱ-) или характеризуются высоким уровнем экспрессии (маркер^{high}) одного или более конкретных маркеров, например, поверхностных маркеров, или которые являются отрицательными по (маркер-) или характеризуются относительно низким уровнем экспрессии (маркер^{low}) одного или более маркеров. Например, в некоторых аспектах конкретные субпопуляции Т-клеток, например, клетки, положительные по или характеризующиеся высоким уровнем экспрессии одного или более поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺ Т-клетки, выделяют с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В некоторых случаях такие маркеры представляют собой маркеры, отсутствующие или экспрессирующиеся с относительно низким уровнем в определенных популяциях Т-клеток (например, не являющихся клетками памяти), но присутствующие или экспрессирующиеся с относительно более высоким уровнем в некоторых других популяциях Т-клеток (например, клетках памяти). В одном

варианте реализации клетки (например, CD8⁺ клетки или Т-клетки, например, CD3⁺ клетки) обогащены (т.е. подвергались положительному отбору в отношении) клетками, которые являются положительными или экспрессируют высокие поверхностные уровни CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127 и/или CD62L, и/или обеднены (например, подвергались отрицательному отбору в отношении) клетками, которые являются положительными или экспрессируют высокие поверхностные уровни CD45RA. В некоторых вариантах реализации клетки обогащены или обеднены клетками, положительными или экспрессирующими высокие поверхностные уровни CD122, CD95, CD25, CD27 и/или IL7-Ra (CD 127). В некоторых типичных вариантах реализации CD8⁺ Т-клетки обогащены клетками, положительными по CD45RO (или отрицательными по CD45RA) и CD62L. Например, CD3⁺, CD28⁺ Т-клетки можно подвергать положительному отбору с использованием магнитных гранул, конъюгированных с CD3/CD28 (например, DYNABEADS[®] M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

[0273] В некоторых вариантах реализации Т-клетки отделяют от образца МПК путем отрицательного отбора по маркерам, экспрессируемым на клетках, не являющихся Т-клетками, например, В-клетках, моноцитах или других лейкоцитах, например, CD14. В некоторых аспектах для разделения CD4⁺ хелперов и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток используют этап отбора CD4⁺ или CD8⁺. Такие популяции CD4⁺ и CD8⁺ можно дополнительно сортировать на субпопуляции путем положительного или отрицательного отбора по маркерам, экспрессируемым или экспрессируемым в относительно более высокой степени на одной или более субпопуляциях наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток. В некоторых вариантах реализации CD8⁺ клетки дополнительно обогащены или обеднены наивными клетками, центральными клетками памяти, эффекторными клетками памяти и/или центральными стволовыми клетками памяти, например, путем положительного или отрицательного отбора на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах реализации обогащение центральными Т-клетками памяти (TCM) выполняют для повышения эффективности, например, для улучшения долгосрочной выживаемости, размножения и/или приживления после введения, что в некоторых аспектах является особенно надежным с использованием таких субпопуляций.

[0274] В некоторых вариантах реализации объединение CD8⁺ Т-клеток, обогащенных

TCM, и CD4+ Т-клеток дополнительно повышает эффективность. В некоторых вариантах реализации Т-клетки памяти присутствуют в обеих субпопуляциях CD62L+ и CD62L- CD8+ лимфоцитов периферической крови. МПК могут быть обогащены или обеднены фракциями CD62L-CD8 + и/или CD62L+CD8+, например, с использованием антител против CD8 и против CD62L. В некоторых вариантах реализации популяция CD4+ Т-клеток и/или популяция CD8+ Т-клеток обогащена центральными клетками памяти (TCM). В некоторых вариантах реализации обогащение центральными Т-клетками памяти (TCM) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CDS и/или CD 127; в некоторых аспектах оно основано на отрицательном отборе клеток, экспрессирующих или характеризующихся высоким уровнем экспрессии CD45RA и/или гранзима В. В некоторых аспектах выделение популяции CD8+, обогащенной клетками TCM, выполняют путем удаления клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, и положительного отбора или обогащения клетками, экспрессирующими CD62L. В одном аспекте обогащение центральными Т-клетками памяти (TCM) выполняют, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранных на основе экспрессии CD4, которую подвергают отрицательному отбору на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и положительному отбору на основе CD62L. Такие этапы отбора в определенных аспектах выполняют одновременно, а в других аспектах - последовательно, в любом порядке. В некоторых случаях один и тот же этап отбора на основе экспрессии CD4, применяемый при получении популяции или субпопуляции клеток CD8+, также применяют для получения популяции или субпопуляции клеток CD4+, так что как положительные, так и отрицательные фракции при разделении на основе CD4 сохраняют и используют на последующих этапах указанных способов, необязательно после одного или более дополнительных этапов положительного или отрицательного отбора.

[0275] CD4+ Т-хелперы сортируют с получением наивных клеток, центральных клеток памяти и эффекторных клеток путем выявления популяций клеток, содержащих антигены на своей поверхности. CD4+ лимфоциты можно получить с помощью стандартных способов. В некоторых вариантах реализации наивные CD4+ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO-, CD45RA+, CD62L+, CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах реализации центральные CD4+ клетки памяти представляют собой CD62L+ и CD45RO+. В некоторых вариантах реализации CD4+ эффекторные клетки представляют собой CD62L- и CD45RO.

В одном примере смесь моноклональных антител для обогащения CD4+ клетками путем отрицательного отбора обычно включает антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CDS. В некоторых вариантах реализации антитело или партнер по связыванию связывают с твердой подложкой или матрицей, например, магнитной или парамагнитной гранулой с целью разделения клеток путем положительного и/или отрицательного отбора.

[0276] В некоторых вариантах реализации клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генно-инженерными манипуляциями. Этапы инкубирования могут включать получение культуры, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. В некоторых вариантах реализации композиции или клетки инкубируют в стимулирующих условиях или в присутствии стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, имитации воздействия антигена и/или примирования клеток для генно-инженерной манипуляции, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора. Условия могут включать одну или более из конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание диоксида углерода, время, агенты, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, например, цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, гибридные белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток. В некоторых вариантах реализации стимулирующие условия или агенты включают один или более агентов, например, лиганд, способный активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах агент запускает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут включать антитела, например, антитела, специфичные по отношению к компоненту TCR и/или костимулирующему рецептору, например, антитело против CD3, антитело против CD28, например, связанные с твердой подложкой, например, гранулой, и/или один или более цитокинов. Способ размножения необязательно может дополнительно включать этап добавления в культуральную среду антитела против CD3 и/или против CD28 (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах реализации стимулирующие агенты включают ИЛ-2 и/или ИЛ-15, например, концентрацию ИЛ-2, составляющую по меньшей мере приблизительно 10 единиц/мл.

[0277] В еще одном варианте реализации Т-клетки выделяют из периферической крови путем лизиса эритроцитов и удаления моноцитов, например, путем центрифугирования в градиенте PERCOLL™. В качестве альтернативы Т-клетки можно выделить из пуповины. В любом случае можно дополнительно выделить конкретную субпопуляцию Т-клеток с помощью методик положительного или отрицательного отбора.

[0278] Выделенные таким образом моноклеарные клетки пуповинной крови можно обеднить клетками, экспрессирующими определенные антигены, включая CD34, CDS, CD14, CD19 и CD56, но не ограничиваясь ими. Удаление этих клеток можно выполнить с использованием выделенного антитела, биологического образца, содержащего антитело, например, асцитной жидкости, антитела, связанного с физической подложкой, и антитела, связанного с клеткой.

[0279] Обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора можно выполнить с использованием комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для клеток, подвергаемых отрицательному отбору. Типичным способом является сортировка и/или отбор клеток с помощью отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, при которой используют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, подвергаемых отрицательному отбору. Например, смесь моноклональных антител для обогащения CD4⁺ клетками путем отрицательного отбора обычно включает антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CDS.

[0280] Для выделения желательной популяции клеток путем положительного или отрицательного отбора концентрация клеток и элементов поверхности (например, частиц, например, гранул) может варьироваться. В определенных вариантах реализации для обеспечения максимального контакта клеток и гранул может быть желательным значительное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (т.е. увеличение концентрации клеток). Например, в одном варианте реализации используют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В другом варианте реализации используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном варианте реализации используют более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном варианте реализации используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл.

В еще одном варианте реализации используют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах реализации можно использовать концентрации 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может привести к увеличению выхода клеток, активации клеток и размножению клеток.

[0281] Т-клетки также можно замораживать после этапа промывки, который не требует этапа удаления моноцитов. Безотносительно к теоретическим представлениям, этап замораживания и последующего размораживания обеспечивает более однородный продукт за счет удаления гранулоцитов и в некоторой степени моноцитов из популяции клеток. После этапа промывки, на котором удаляют плазму и тромбоциты, клетки можно суспендировать в растворе для замораживания. Хотя в данной области техники известны многие растворы и параметры для замораживания, пригодные в данном контексте, в неограничивающем примере один способ включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% человеческого сывороточного альбумина, или другой подходящей среды для замораживания клеток. Затем клетки замораживают до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и хранят в парогазовой фазе резервуара для хранения жидкого азота. Можно применять другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемое немедленное замораживание при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или в жидком азоте.

[0282] В одном варианте реализации популяция Т-клеток содержится в клетках, например, мононуклеарах периферической крови, клетках пуповинной крови, очищенной популяции Т-клеток и линии Т-клеток. В еще одном варианте реализации мононуклеары периферической крови содержат популяцию Т-клеток. В еще одном варианте реализации очищенные Т-клетки содержат популяцию Т-клеток.

[0283] В некоторых вариантах реализации иммунную клетку получают из образца крови, образца цельной крови, образца мононуклеара периферической крови (МПК) или образца для афереза. В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, с помощью афереза или лейкоафереза. В одном варианте реализации иммунные клетки получают из циркулирующей крови индивида путем афереза или лейкоафереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах реализации образец для афереза представляет собой

криоконсервированный образец. В некоторых вариантах реализации образец для афереза представляет собой свежий образец. В некоторых вариантах реализации иммунную клетку получают из организма субъекта-человека.

VII. КОМПОЗИЦИИ

[0284] В одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция, содержащая модифицированную иммунную клетку, описанную в настоящем документе, или популяцию модифицированных иммунных клеток, полученных любым из способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению могут содержать модифицированную нестимулированную Т-клетку или модифицированную стимулированную Т-клетку, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации композиция может включать фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах реализации композиция может включать фармацевтическую композицию и дополнительно содержит один или более фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей, адъювантов или вспомогательных веществ. Такие композиции могут содержать буферы, например, нейтральный забуференный физиологический раствор, физиологический раствор с фосфатным буфером и т.п.; углеводы, например, глюкозу, маннозу, сахарозу или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, например, глицин, антиоксиданты; хелатирующие агенты, например, ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно составлены для парентерального введения (например, внутривенного введения). В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей модифицированные Т-клетки, можно вводить нуждающемуся в этом субъекту.

VIII. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[0285] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ терапии посредством адоптивного переноса клеток, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту модифицированной иммунной клетки согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации в настоящем документе описан способ лечения заболевания или патологического состояния у субъекта, включающий введение указанному субъекту

популяции модифицированных Т-клеток, описанных в настоящем документе, например, популяции модифицированных нестимулированных Т-клеток или популяции модифицированных стимулированных Т-клеток, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает способ лечения заболевания или патологического состояния у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей модифицированные иммунные клетки, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации способ лечения заболевания или патологического состояния у субъекта включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, модифицированной иммунной клетки (например, Т-клетки), содержащей инсерцию и/или делецию в одном или более локусах генов, каждый из которых кодирует эндогенный иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи), и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (KIR), антигенсвязывающий полипептид, лиганд рецептора клеточной поверхности или опухолевый антиген. В некоторых вариантах реализации инсерция и/или делеция способна подавлять экспрессию одного или более эндогенных иммунологических генов.

[0286] В некоторых вариантах реализации модифицированная иммунная клетка дополнительно содержит доминантно-негативный рецептор, переключающий рецептор, хемокин, рецептор хемокина, цитокин, рецептор цитокина, ИЛ-7, ИЛ-7R, ИЛ-15, ИЛ-15R, ИЛ-21, ИЛ-18, CCL21, CCL19 или их комбинацию. В некоторых случаях заболевание представляет собой рак, необязательно солидную опухоль или гематологическое злокачественное заболевание. В некоторых случаях каждая из модифицированных нестимулированных Т-клеток или модифицированных стимулированных Т-клеток экспрессирует антигенсвязывающий домен, специфичный по отношению к антигену, экспрессируемому при раке. В некоторых вариантах реализации способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту модифицированной иммунной клетки (например, Т-клетки), содержащей нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию генов, TCR, KIR, CAR, доминантно-негативный рецептор и/или переключающий рецептор, описанные в других частях настоящего документа. В некоторых вариантах реализации

модифицированная иммунная клетка представляет собой перенаправленную Т-клетку с универсальным TCR (например, аллогенную Т-клетку).

[0287] В некоторых вариантах реализации рак представляет собой солидную опухоль. Типичные солидные опухоли включают рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга (например, глиому, глиобластому, нейробластому), рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак пищевода, рак глаза, рак головы и шеи, рак почки, рак легких, меланому, мезотелиому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак желудка, но не ограничиваются ими. В некоторых случаях солидная опухоль представляет собой рак головного мозга (например, глиому, глиобластому, нейробластому), рак молочной железы, рак легких, меланому, мезотелиому, рак яичников, рак поджелудочной железы или рак предстательной железы. В некоторых случаях солидная опухоль представляет собой метастатический рак. В некоторых случаях солидная опухоль представляет собой рецидивирующую или рефрактерную солидную опухоль.

[0288] В некоторых вариантах реализации рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В некоторых вариантах реализации гематологическое злокачественное заболевание представляет собой В-клеточное злокачественное заболевание или Т-клеточное злокачественное заболевание. В некоторых вариантах реализации гематологическое злокачественное заболевание представляет собой лимфому, лейкоз или миелому. В некоторых вариантах реализации гематологическое злокачественное заболевание представляет собой лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому. Типичные гематологические злокачественные заболевания включают хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), лимфому из клеток мантии (MCL), макроглобулинемию Вальденстрема, множественную миелому, внеузловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, лимфому Беркитта, В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности, не являющуюся лимфомой Беркитта, первичную В-клеточную лимфому средостения (PMBL), иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников, пролимфоцитарный В-клеточный лейкоз, лимфоплазмочитарную лимфому, лимфому из

клеток краевой зоны селезенки, плазмноклеточную миелому, плазмоцитому, крупноклеточную В-клеточную лимфому средостения (тимуса), внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную эффузионную лимфому или лимфоматоидный гранулематоз, но не ограничиваются ими. В некоторых случаях гематологическое злокачественное заболевание представляет собой метастатическое гематологическое злокачественное заболевание. В некоторых случаях гематологическое злокачественное заболевание представляет собой рецидивирующее или рефрактерное гематологическое злокачественное заболевание.

[0289] В некоторых вариантах реализации способ лечения заболевания дополнительно включает введение субъекту дополнительного терапевтического агента или применение дополнительной терапии. В некоторых случаях дополнительный терапевтический агент, описанный в настоящем документе, включает химиотерапевтический агент, иммунотерапевтический агент, таргетную терапию, лучевую терапию или их комбинацию. Типичные дополнительные терапевтические агенты включают алкилирующие агенты, например, алтретамин, бусульфан, карбоплатин, кармустин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, дакарбазин, ломустин, мелфалан, оксалаплатин, темозоломид или тиотепу; антиметаболиты, например, 5-фторурацил (5-FU), 6-меркаптопурин (6-MP), капецитабин, цитарабин, флоксуридин, флударабин, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат или пеметрексед; антрациклины, например, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин или идарубицин; ингибиторы топоизомеразы I, например, топотекан или иринотекан (CPT-11); ингибиторы топоизомеразы II, например, этопозид (VP-16), тенипозид или митоксантрон; ингибиторы митоза, например, доцетаксел, эстрамустин, иксабепилон, паклитаксел, винбластин, винкристин или винорелбин; или кортикостероиды, например, преднизон, метилпреднизолон или дексаметазон, но не ограничиваются ими. В некоторых случаях дополнительный терапевтический агент включает средство, используемое в качестве терапии первой линии. В настоящем документе термин «терапия первой линии» включает первичное лечение субъекта со злокачественным новообразованием. В некоторых случаях рак представляет собой первичный рак. В других случаях рак представляет собой метастатический или рецидивирующий рак. В некоторых случаях терапия первой линии включает химиотерапию. В других случаях лечение первой линии включает лучевую терапию. Специалисту в данной области техники легко понять,

что различные терапевтические средства первой линии можно применять к различным видам рака. В некоторых случаях дополнительный терапевтический агент содержит ингибитор иммунных контрольных точек. В некоторых случаях ингибитор иммунных контрольных точек содержит ингибиторы, например, антитело или его фрагменты (например, моноклональное антитело, антитело человека, гуманизированное или химерное антитело), молекулы для РНКи или низкомолекулярные соединения-ингибиторы PD-1, PD-L1, CTLA4, PD-L2, LAG3, B7-H3, KIR, CD137, PS, TFM3, CD52, CD30, CD20, CD33, CD27, OX40, GITR, ICOS, VTLA (CD272), CD160, 2B4, LAIR1, TIGIT, LIGHT, DR3, CD226, CD2 или SLAM. Типичные ингибиторы контрольных точек включают пембролизумаб, ниволумаб, тремелимумаб или ипилимумаб. В некоторых вариантах реализации дополнительная терапия включает лучевую терапию.

[0290] В некоторых вариантах реализации дополнительная терапия включает хирургическое вмешательство.

IX. НАБОРЫ И ИЗДЕЛИЯ

[0291] В некоторых вариантах реализации набор или изделие, описанное в настоящем документе, включает одну или более популяций модифицированных Т-клеток (например, модифицированных нестимулированных Т-клеток или модифицированных стимулированных Т-клеток). В некоторых случаях набор или изделие, описанное в настоящем документе, дополнительно содержит носитель, упаковку или контейнер, разделенный на отсеки для приема одного или более контейнеров, например, флаконов, пробирок и т.п., причем каждый из контейнеров содержит один из отдельных элементов, используемых в способе, описанном в настоящем документе. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. В одном варианте реализации контейнеры изготовлены из различных материалов, например, стекла или пластмассы.

[0292] Предложенные в настоящем документе изделия содержат упаковочные материалы. Примеры фармацевтических упаковочных материалов включают блистерные упаковки, бутылки, пробирки, пакеты, контейнеры, бутылки и любой упаковочный материал, подходящий для выбранного состава и предполагаемого способа введения и обработки, но не ограничиваются ими.

[0293] Набор обычно содержит этикетки с перечнем содержимого и/или инструкции по

применению и вкладывши в упаковку с инструкциями по применению. Он также обычно включает набор инструкций.

IX. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0294] Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно имеют в виду специалисты средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практической реализации или при проверке настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, подходящие для этого способы и материалы описаны в настоящем документе.

[0295] Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации и не имеет ограничительного характера.

[0296] При практической реализации настоящего изобретения используют, если не указано иное, стандартные методики, применяемые в области культивирования тканей, иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и технологии рекомбинантных ДНК, которые находятся в рамках компетенции специалистов в данной области техники. См., например, Green and Sambrook eds. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th edition; серия Ausubel et al. eds. (2015) *Current Protocols in Molecular Biology*; серия *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (2015) *PCR 1 : A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; McPherson et al. (2006) *PCR: The Basics* (Garland Science); Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Greenfield ed. (2014) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 6th edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Herdewijn ed. (2005) *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Buzdin and Lukyanov ed. (2007) *Nucleic Acids Hybridization: Modern Applications*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Grandi ed. (2007) *In Vitro Transcription and Translation Protocols*, 2nd edition; Guisan ed. (2006) *Immobilization of*

Enzymes and Cells; Perbal (1988) A Practical Guide to Molecular Cloning, 2nd edition; Miller and Calos eds, (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Lundblad and Macdonald eds. (2010) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 4th edition; и Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5th edition.

[0297] В настоящем документе формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не указывает иное. Например, термин «клетка» включает множество клеток, включая их смеси, и означает одну клетку или более чем одну клетку.

[0298] В настоящем документе термин «приблизительно» используется для указания на то, что значение включает стандартное отклонение ошибки для устройства или способа, используемого для определения указанного значения. Термин «приблизительно» при использовании перед численным показателем, например, температурой, временем, количеством и концентрацией, включая диапазон, указывает на приближения, которые могут варьироваться на (+) или (-) (\pm) 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 2% или 1%. Предпочтительно $\pm 5\%$, более предпочтительно $\pm 1\%$ и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения подходят для реализации описанных способов.

[0299] В настоящем документе термин «активация» относится к состоянию Т-клетки, подвергшейся достаточной стимуляции для индукции обнаружимой клеточной пролиферации. Активация также может быть связана с индуцированной продукцией цитокинов и обнаружимыми эффекторными функциями. Термин «активированные Т-клетки» относится, в числе прочего, к Т-клеткам, подвергающимся делению клеток.

[0300] «Аллогенный» относится к любому материалу, полученному из другого животного того же вида, что и индивид, которому вводят указанный материал. Говорят, что два или более индивидов аллогенны по отношению друг к другу, если гены в одном или более их локусах не идентичны. В некоторых аспектах аллогенный материал, полученный от индивидов одного и того же вида, может в достаточной степени отличаться с генетической точки зрения для антигенного взаимодействия.

[0301] В настоящем документе термин «аллогенной Т-клеточная мишень» или «аллогенная Т-клетка» относится к белку, опосредующему или способствующему развитию реакции "хозяин против трансплантата", опосредующему или способствующему развитию реакции "трансплантат против хозяина" или являющемуся мишенью для иммунодепрессанта; а также гену, кодирующему указанную молекулу, и связанным с ним регуляторным элементам (например, промоторам). Следует понимать, что термин «аллогенная Т-клеточная мишень» относится к гену (и связанным с ним регуляторным элементам), кодирующему белок-мишень аллогенной Т-клетки, при его использовании в сочетании с последовательностью-мишенью или молекулой нРНК. Безотносительно к теоретическим представлениям, ингибирование или удаление одной или более аллогенных Т-клеточных мишеней (например, с помощью способов и композиций, описанных в настоящем документе) может повысить эффективность, выживаемость, функцию и/или жизнеспособность аллогенной клетки. В некоторых вариантах реализации эффективность, выживаемость, функцию и/или жизнеспособность аллогенной клетки улучшают за счет снижения или устранения нежелательной иммуногенности (например, реакции "хозяин против трансплантата" или реакции "трансплантат против хозяина"). В некоторых вариантах реализации белок, опосредующий или способствующий развитию реакции "трансплантат против хозяина" или реакции "хозяин против трансплантата", представляет собой один или более компонентов комплекса Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах реализации компонент комплекса Т-клеточного рецептора представляет собой альфа-цепь Т-клеточного рецептора, константный домен TCR альфа (TRAC; TCR α). В некоторых вариантах реализации компонент Т-клеточного рецептора представляет собой бета-цепь Т-клеточного рецептора (TRBC; TCR- β), например, константный домен 1 (TRBC1) или константный домен 2 (TRBC2) TCR-бета. В некоторых вариантах реализации компонент Т-клеточного рецептора представляет собой дельта-цепь Т-клеточного рецептора (CD3 δ), эpsilon-цепь Т-клеточного рецептора (CD3 ϵ), дзета-цепь Т-клеточного рецептора (CD3 ζ ; CD247) и/или гамма-цепь Т-клеточного рецептора (CD3 γ). В некоторых вариантах реализации, в которых белок, кодируемый аллогенной Т-клеточной мишенью, является компонентом сигнального комплекса TCR, ген, кодирующий аллогенную Т-клеточную мишень, может представлять собой, например, TRAC, TRBC1, TRBC2, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 ζ (CD247) или любую их комбинацию.

[0302] В настоящем документе термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, специфично связывающейся с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные фрагменты интактных иммуноглобулинов. Антитела обычно представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Антитела согласно настоящему изобретению могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела (scFv) и гуманизированные антитела. В некоторых вариантах реализации антитело относится к таким сборкам (например, интактным молекулам антитела, иммуноадгезинам или их вариантам), которые обладают значительной известной специфичной иммунореактивной активностью в отношении рассматриваемого антигена (например, опухоль-ассоциированного антигена). Антитела и иммуноглобулины содержат легкие и тяжелые цепи с межцепочечной ковалентной связью между ними или без нее. Основные структуры иммуноглобулинов у позвоночных изучены относительно хорошо.

[0303] Термин «фрагмент антитела» относится к фрагменту интактного антитела и относится к антиген-определяющим переменным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты, линейные антитела, scFv-антитела и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител, но не ограничиваются ими.

[0304] В настоящем документе термин «тяжелая цепь антитела» относится к большей из полипептидных цепей двух видов, присутствующих во всех молекулах антитела в их естественных конформациях.

[0305] В настоящем документе термин «легкая цепь антитела» относится к меньшей из полипептидных цепей двух видов, присутствующих во всех молекулах антитела в их естественных конформациях. Легкие цепи α и β относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

[0306] В настоящем документе термин «синтетическое антитело» означает антитело, получаемое с использованием технологии рекомбинантных ДНК, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом, как описано в настоящем документе. Данный термин

также следует толковать как антитело, полученное путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей указанное антитело и экспрессирующей белок антитела, или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, причем указанную последовательность ДНК или аминокислотную последовательность получили с использованием технологии синтетических ДНК или аминокислотных последовательностей, которая доступна и хорошо известна в данной области техники.

[0307] Антигенсвязывающий домен (например, химерный антигенный рецептор) включает варианты антител. В настоящем документе термин «вариант антитела» включает синтетические и рекомбинантные формы антител, модифицированные таким образом, что они не встречаются в природе, например, антитела, содержащие по меньшей мере два фрагмента тяжелой цепи, но не две полноразмерные тяжелые цепи (например, антитела с удаленным доменом или миниантитела); мультиспецифичные формы антител (например, биспецифичные, триспецифичные и т. д.), измененные с целью связывания с двумя или более различными антигенами или различными эпитопами на одном антигене); молекулы тяжелой цепи, соединенные с молекулами scFv и т.п. Кроме того, термин «вариант антитела» включает поливалентные формы антител (например, трехвалентные, четырехвалентные и т. д. антитела, связывающиеся с тремя, четырьмя или более копиями одного и того же антигена.

[0308] В настоящем документе термин «антиген» или «Ag» определяют как молекулу, провоцирующую иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать продукцию антитела и/или активацию специфичных иммунологически компетентных клеток. Квалифицированный специалист должен понимать, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить антигеном. Кроме того, антигены можно получить из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалист в данной области техники должен понимать, что любая ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, вызывающий иммунный ответ, тем самым кодирует «антиген» в том смысле, как этот термин используется в настоящем документе. Кроме того, специалист в данной области техники должен понимать, что антиген не обязательно кодирует исключительно полноразмерная нуклеотидная последовательность гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает применение частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена, но не

ограничивается этим, и что эти нуклеотидные последовательности упорядочивают в виде различных комбинаций для индукции желательного иммунного ответа. Более того, специалист в данной области техники должен понимать, что антиген вовсе не обязательно кодирует «ген». Очевидно, что антиген можно синтезировать или получить из биологического образца. Такой биологический образец может включать образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость, но не ограничивается ими.

[0309] В настоящем документе термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, уменьшения количества метастазов, увеличения продолжительности жизни или облегчения различных физиологических симптомов, ассоциированных со злокачественным заболеванием. В некоторых вариантах реализации «противоопухолевый эффект» также может в первую очередь проявляться в виде способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител согласно настоящему изобретению предотвращать возникновение опухоли.

[0310] В настоящем документе термин «аутоантиген» означает, в соответствии с настоящим изобретением, любой аутоантиген, который иммунная система распознает как чужеродный. В некоторых вариантах реализации аутоантигены содержат клеточные белки, фосфопротеины, белки клеточной поверхности, клеточные липиды, нуклеиновые кислоты, гликопротеины, включая рецепторы клеточной поверхности, но не ограничиваются ими.

[0311] В настоящем документе термин «аутоиммунное заболевание» определяется как расстройство, возникающее в результате аутоиммунного ответа. Аутоиммунное заболевание является результатом неадекватного и чрезмерного ответа на аутоантиген. Примеры аутоиммунных заболеваний включают, в числе прочего, болезнь Аддисона, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный паротит, рак, болезнь Крона, диабет (I типа), дистрофический буллезный эпидермолиз, эпидидимит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, болезнь Хашимото, гемолитическую анемию, системную красную волчанку, рассеянный склероз, миастению гравис, пузырчатку, псориаз, ревматизм, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, спондилоартропатии, тиреоидит, васкулит, витилиго, микседему, пернициозную анемию, язвенный колит, но не ограничиваются ими.

[0312] В настоящем документе термин «аутологичный» предназначен для обозначения любого материала, полученного от того же индивида, в организм которого впоследствии можно повторно ввести указанный материал.

[0313] В настоящем документе термин «рак» относится к заболеванию, характеризующемуся быстрым и неконтролируемым ростом аномальных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных видов рака включают рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких, метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы, меланому, синовиальную саркому, TnMuc1-положительные солидные опухоли на поздней стадии, нейробластому, нейроэндокринные опухоли и т.п., но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой медуллярную карциному щитовидной железы. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой мезотелиому или рак, экспрессирующий мезотелин. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы. Термины «рак» и «опухоль» используются в настоящем документе взаимозаменяемо, и оба эти термина охватывают солидные опухоли и гемобласты, диффузные или циркулирующие опухоли. В некоторых вариантах реализации рак или опухоль включает предраковые, а также злокачественные раковые новообразования и опухоли.

[0314] В данном контексте термин «антиген, ассоциированный с раком» или «опухолевый антиген» взаимозаменяемо относится к молекуле (обычно белку, углеводу или липиду), экспрессируемой на поверхности раковой клетки, полностью или в виде фрагмента (например, МНС/пептида), и пригодной для предпочтительного адресного воздействия фармакологического агента на раковую клетку. В некоторых вариантах реализации опухолевый антиген представляет собой маркер, экспрессируемый как нормальными клетками, так и раковыми клетками (например, маркер роста, например, CD19 на В-клетках). В некоторых вариантах реализации опухолевый антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, сверхэкспрессирующуюся в раковой клетке по

сравнению с нормальной клеткой, например, характеризующуюся 1-кратной сверхэкспрессией, 2-кратной сверхэкспрессией, 3-кратной сверхэкспрессией или более по сравнению с нормальной клеткой. В некоторых вариантах реализации опухолевый антиген представляет собой поверхностную молекулу клетки, неправильным образом синтезируемую в раковой клетке, например, молекулу, содержащую делеции, добавления или мутации по сравнению с молекулой, экспрессируемой на нормальной клетке. В некоторых вариантах реализации опухолевый антиген экспрессируется полностью или в виде фрагмента (например, МНС/пептида) исключительно на поверхности раковой клетки и не синтезируется или не экспрессируется на поверхности нормальной клетки. В некоторых вариантах реализации CAR согласно настоящему изобретению включают CAR, содержащие антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), связывающийся с пептидом, презентруемым МНС. Как правило, пептиды, полученные из эндогенных белков, заполняют карманы молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса и распознаются Т-клеточными рецепторами (TCR) на CD8 + Т-лимфоцитах. Комплексы МНС I класса конститутивно экспрессируют все ядросодержащие клетки. При раке вирус-специфичные и/или опухоль-специфичные комплексы пептид/МНС представляют собой уникальный класс мишеней клеточной поверхности для иммунотерапии. Описаны TCR-подобные антитела, мишенью которых являются пептиды, полученные из вирусных или опухолевых антигенов в контексте лейкоцитарного антигена человека (HLA)-A1 или HLA-A2. Например, TCR-подобное антитело можно выявить путем скрининга библиотеки, например, библиотеки фагового дисплея scFv человека.

[0315] В настоящем документе термин «антиген, поддерживающий рак» или «антиген, поддерживающий опухоль» взаимозаменяемо относится к молекуле (обычно белку, углеводу или липиду), экспрессируемой на поверхности клетки, которая сама по себе не является раковой, но поддерживает раковые клетки, способствуя их росту или выживанию (например, устойчивости к иммунным клеткам). Типичные клетки этого типа включают стромальные клетки и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC). Сам антиген, поддерживающий опухоль, не обязательно играет роль в поддержании опухолевых клеток при условии, что данный антиген присутствует на клетке, поддерживающей раковые клетки.

[0316] В настоящем документе термин «Cas» или «молекула Cas» относится к ферменту бактериальной системы CRISPR/Cas II типа, ответственной за расщепление ДНК. Cas включает как белок дикого типа, так и его функциональные и нефункциональные мутанты.

[0317] В настоящем документе термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" относится к искусственному Т-клеточному рецептору, сконструированному в целях экспрессии на иммунной эффекторной клетке или ее клетке-предшественнике и специфического связывания с антигеном. CAR можно применять в адоптивной клеточной терапии с адоптивным переносом клеток. В некоторых вариантах реализации адоптивный перенос клеток (или терапия) включает удаление Т-клеток у пациента и модификацию Т-клеток для экспрессии рецепторов, специфичных по отношению к конкретному антигену. В некоторых вариантах реализации CAR обладает специфичностью по отношению к выбранной мишени, например, ROR1, мезотелину, c-Met, PSMA, PSCA, альфа-рецептору фолатов, бета-рецептору фолатов, EGFR, EGFRvIII, GPC2, GPC2, муцину 1 (MUC1), Tn-антигену ((Tn Ag) или (GalNAc-Ser/Thr)), TnMUC1, рецептору семейства GDNF альфа-4 (GFRa4), белку активации фибробластов (FAP) или альфа-2-субъединице рецептора интерлейкина-13 (ИЛ-13Ra2 или CD213A2). В некоторых вариантах реализации CAR также могут содержать внутриклеточный активирующий домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий область, связывающую опухоль-ассоциированный антиген. В некоторых аспектах CAR включают гибриды одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), полученных из моноклональных антител, соединенных с трансмембранным и внутриклеточным доменом CD3-дзета. Специфичность конструкторов CAR может быть обусловлена лигандами рецепторов (например, пептидами). В некоторых вариантах реализации мишенью CAR могут являться злокачественные новообразования за счет перенаправления специфичности Т-клеток, экспрессирующих CAR, специфичный по отношению к опухоль-ассоциированным антигенам.

[0318] В настоящем документе термин «расщепление» относится к разрыву ковалентных связей, например, в остове молекулы нуклеиновой кислоты. Расщепление можно инициировать различными способами, включая ферментативный или химический гидролиз фосфодиэфирной связи, но не ограничиваясь ими. Возможны как одноцепочечное расщепление, так и двуцепочечное расщепление. Двуцепочечное расщепление может возникать в результате двух различных событий одноцепочечного расщепления.

Расщепление ДНК может приводить к образованию тупых концов либо липких концов. В определенных вариантах реализации для адресного воздействия на расщепленную двуцепочечную ДНК можно использовать гибридные полипептиды.

[0319] В настоящем документе термин «комплементарный», используемый в связи с нуклеиновой кислотой, относится к спариванию оснований - А с Т или U и G с С. Термин "комплементарный" относится к молекулам нуклеиновой кислоты, являющимся полностью комплементарными, т.е. образующим пары А-Т или U и пары G-С по всей эталонной последовательности, а также к молекулам, комплементарным по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 99%.

[0320] В настоящем документе термин «консервативные модификации последовательности» предназначен для обозначения аминокислотных модификаций, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего указанную аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации можно вводить в антитело согласно настоящему изобретению стандартными способами, известными в данной области техники, например, посредством сайт-специфического мутагенеза и ПЦР-опосредованного мутагенеза. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, содержащим такую же боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, содержащих сходные боковые цепи, известны в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в CDR-областях антитела можно заменить другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененное антитело можно протестировать на

способность связывать антигены с помощью функциональных анализов, описанных в настоящем документе.

[0321] В настоящем документе термин «костимулирующий лиганд» включает молекулу на антигенпрезентирующей клетке (например, аАРС, дендритной клетке, В-клетке и т. п.), специфично связывающую костимулирующую молекулу-партнера на Т-клетке, тем самым обеспечивая сигнал, который в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, несущей пептид, опосредует Т-клеточный ответ, включая пролиферацию, активацию, дифференцировку и т. п., но не ограничиваясь ими. Костимулирующий лиганд может включать CD2, CD7, В7-1 (CD80), В7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, бета-рецептор лимфотоксина, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, связывающее рецептор Toll-лиганда, и лиганд, специфично связывающийся с В7-Н3, но не ограничивается ими. Костимулирующий лиганд также включает, в числе прочего, антитело, специфично связывающееся с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, например, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированным антигеном лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, В7-Н3, и лигандом, специфично связывающимся с CD83, но не ограничиваясь ими.

[0322] В настоящем документе «костимулирующая молекула» относится к партнеру по связыванию на Т-клетке, специфично связывающемуся с костимулирующим лигандом, что опосредует костимулирующий ответ Т-клетки, например, пролиферацию, но не ограничивается ей. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, не являющиеся рецепторами антигенов или их лигандами, способствующими эффективному иммунному ответу. Костимулирующие молекулы включают молекулу МНС I класса, BTLA, рецептор Toll-лиганда, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS (CD278), NKG2C, В7-Н3 (CD276) и внутриклеточный домен, полученный из иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR), но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации костимулирующая молекула включает OX40, CD27, CD2, CD28, ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137). Дополнительные

примеры таких костимулирующих молекул включают CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, специфично связывающийся с CD83.

[0323] В настоящем документе термин «костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, например, лигированием TCR/CD3, приводит к пролиферации Т-клеток и/или стимуляции или подавлению экспрессии ключевых молекул. Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточный фрагмент костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: Белки рецептора ФНО, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, функционально-ассоциированный антиген лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CDS, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3, лиганд, специфично связывающийся с CD83, и т.п.

[0324] В настоящем документе термин «CRISPR» относится к системе коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами. Термины «система CRISPR», «CRISPR/Cas», «система CRISPR/Cas» или «CRISPR» относятся к локусам ДНК, содержащим короткие повторы последовательностей оснований. За каждым повтором следуют короткие сегменты спейсерной ДНК от предыдущих воздействий вируса. Бактерии и археи развили адаптивную иммунную защиту, называемую CRISPR-CRISPR-ассоциированными (Cas) системами и использующую короткие РНК для направленного разрушения чужеродных нуклеиновых кислот. У бактерий система CRISPR обеспечивает

приобретенный иммунитет против вторжения чужеродной ДНК посредством РНК-зависимого расщепления ДНК. В системе CRISPR/Cas II типа короткие сегменты чужеродной ДНК, называемые «спейсерами», встраиваются в геномные локусы CRISPR, транскрибируются и перерабатываются в короткие CRISPR-РНК (сгРНК). Эти сгРНК отжигаются с транс-активирующими сгРНК (tracrРНК) и обеспечивают направленное, специфичное по отношению к последовательности расщепление и сайленсинг патогенной ДНК белками Cas. Недавняя работа показала, что для распознавания мишени белком Cas9 требуется последовательность "затравки" в составе сгРНК и последовательность консервативного динуклеотидсодержащего мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), расположенная против хода транскрипции от области связывания сгРНК.

[0325] В некоторых вариантах реализации термин «система CRISPR», «CRISPR/Cas», «система CRISPR/Cas» или «CRISPR» относится к группе молекул, содержащей РНК-зависимую нуклеазу или другую эффекторную молекулу и молекулу нРНК, которые вместе необходимы и достаточны для направления и осуществления модификаций нуклеиновой кислоты в последовательности-мишени РНК-зависимой нуклеазой или другой эффекторной молекулой. В некоторых вариантах реализации система CRISPR содержит нРНК и белок Cas, например, белок Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, Cas9 *S. pyogenes* (spCas9) или Cas9 *Staphylococcus aureus* (saCas9). Такие системы, содержащие молекулу Cas или модифицированную молекулу Cas, в настоящем документе называются «системами Cas» или «системами CRISPR/Cas». В некоторых вариантах реализации молекула нРНК и молекула Cas могут быть объединены в комплекс с образованием рибонуклеопротеинового (РНП) комплекса.

[0326] Для осуществления направленного расщепления рассматриваемых последовательностей посредством Cas9 можно сконструировать гибридные транскрипты сгРНК-tracrРНК из промотора U6-полимеразы III человека, далее называемые «направляющими РНК» или «нРНК». CRISPR/CAS-опосредованное редактирование и регуляция генома продемонстрировало преобразующий потенциал данной системы для фундаментальной науки, клеточной инженерии и терапии.

[0327] В настоящем документе термин «сгРНК», используемый в связи с молекулой нРНК, представляет собой фрагмент молекулы нРНК, содержащий домен, обеспечивающий адресное воздействие, и область, взаимодействующую с трагс с образованием флагштоковой области.

[0328] В настоящем документе термин «CRISPRi» относится к системе CRISPR для специфичной по отношению к последовательности репрессии генов или ингибирования экспрессии генов, например, на уровне транскрипции.

[0329] В настоящем документе термин «происходящий от» относится к взаимосвязи между первой и второй молекулой. Он определяет структурное сходство между первой молекулой и второй молекулой и не подразумевает или не включает ограничений процесса или источника в отношении первой молекулы, происходящей от второй молекулы. Например, в случае внутриклеточного сигнального домена, происходящего от молекулы CD3-дзета, указанный внутриклеточный сигнальный домен в достаточной степени сохраняет структуру CD3-дзета, чтобы обладать требуемой функцией, а именно, способностью генерировать сигнал в соответствующих условиях. Это не означает и не включает ограничений конкретного процесса получения указанного внутриклеточного сигнального домена. Это не означает, что для получения внутриклеточного сигнального домена необходимо начинать с последовательности CD3-дзета и удалять нежелательную последовательность или вносить мутации с целью получить в конечном итоге указанный внутриклеточный сигнальный домен.

[0330] В настоящем документе термин «заболевание» относится к состоянию здоровья животного, при котором животное не может поддерживать гомеостаз, причем, если заболевание не купировать, здоровье животного продолжает ухудшаться. В отличие от этого, термин «расстройство» у животного относится к состоянию здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья животного хуже, чем оно было бы при отсутствии расстройства. При отсутствии лечения расстройство не обязательно вызывает дальнейшее ухудшение состояния здоровья животного.

[0331] В настоящем документе термин «заболевание, ассоциированное с экспрессией опухолевого антигена» включает заболевание, ассоциированное с экспрессией опухолевого

антигена, или состояние, ассоциированное с клетками, экспрессирующими опухолевый антиген, включая, в числе прочего, пролиферативные заболевания, например, рак или злокачественное заболевание, или предраковое состояние, например, миелодисплазию, миелодиспластический синдром или прелейкоз; или состояние, не связанное с раком, но ассоциированное с клетками, которые экспрессируют опухолевый антиген, но не ограничивается ими. В некоторых вариантах реализации рак, ассоциированный с экспрессией опухолевого антигена, представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В некоторых вариантах реализации рак, ассоциированный с экспрессией опухолевого антигена, представляет собой солидный рак. Дополнительные заболевания, ассоциированные с экспрессией опухолевого антигена, включают атипичные и/или неклассические виды рака, злокачественные заболевания, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, ассоциированные с экспрессией опухолевого антигена, но не ограничиваются ими. Состояния, не связанные с раком, но ассоциированные с экспрессией опухолевого антигена, включают аутоиммунное заболевание (например, волчанку), воспалительные расстройства (аллергию и астму) и трансплантацию, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, экспрессируют или постоянно экспрессируют мРНК, кодирующую опухолевый антиген. В некоторых вариантах реализации клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, продуцируют белок опухолевого антигена (например, дикого типа или мутантный), причем уровень указанного белка опухолевого антигена может быть нормальным или сниженным. В некоторых вариантах реализации клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, продуцировали обнаружимые уровни белка опухолевого антигена в один момент, а впоследствии практически не продуцировали обнаружимого белка опухолевого антигена.

[0332] В настоящем документе термин «подавление экспрессии» относится к снижению или устранению экспрессии одного или более генов.

[0333] В настоящем документе термин «кодирующий» относится к свойству, присущему специфичным последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде (например, гене, кДНК или мРНК) - служить в биологических процессах в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул, содержащих определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и

обладающих обусловленными ими биологическими свойствами. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, продуцирует белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно представлена в списках последовательностей, так и не кодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут называться последовательностями, кодирующими белок или другой продукт этого гена или кДНК. Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, являющиеся вырожденными версиями друг друга и кодирующими одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза "нуклеотидная последовательность, кодирующая белок или РНК" может также включать интроны в той степени, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых вариантах содержать интрон(ы).

[0334] Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к количеству соединения, состава, материала, фармацевтического агента или композиции, описанных в настоящем документе, эффективному для достижения желательного физиологического, терапевтического или профилактического результата у субъекта, нуждающегося в этом. Такие результаты могут включать количество, которое при введении млекопитающему вызывает обнаружимый уровень иммунного ответа по сравнению с иммунным ответом, обнаруживаемым в отсутствие композиции согласно настоящему изобретению, но не ограничиваются ими. Иммунный ответ можно легко оценить с помощью множества способов, известных в данной области техники. Специалист в данной области техники должен понимать, что вводимое количество композиции в настоящем документе варьируется, и его легко определить на основе ряда факторов, например, заболевания или состояния, подлежащего лечению, возраста, состояния здоровья и физического состояния млекопитающего, подлежащего лечению, тяжести заболевания, конкретного вводимого соединения и т.п. Эффективное количество может варьироваться между субъектами в зависимости от состояния здоровья и физического состояния субъекта, подлежащего лечению, таксономической группы субъектов, подлежащих лечению, состава композиции, оценки состояния здоровья субъекта и других соответствующих факторов.

[0335] В настоящем документе термин «эндогенный» относится к любому материалу, полученному из организма, клетки, ткани или системы или продуцируемому в них.

[0336] В настоящем документе термин «размножать» относится к увеличению количества, например, к увеличению количества иммунных клеток (например, Т-клеток). В некоторых вариантах реализации иммунные клетки (например, Т-клетки), размножающиеся *ex vivo*, увеличиваются в количестве по сравнению с количеством, первоначально присутствующим в культуре. В еще одном варианте реализации иммунные клетки (например, Т-клетки), размножающиеся *ex vivo*, увеличиваются в количестве по сравнению с клетками других типов в культуре.

[0337] В настоящем документе термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, находящейся под управлением промотора.

[0338] В настоящем документе термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному в организм, клетку, ткань или систему или полученному вне них.

[0339] В настоящем документе термин «экспрессирующий вектор» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Экспрессирующий вектор содержит достаточное количество *cis*-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть предоставлены клеткой-хозяином или системой экспрессии *in vitro*. Экспрессирующие векторы включают все известные в данной области техники, например, космиды, плазмиды (например, депротенинизированные или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, вирусы Сендай, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), включающие рекомбинантный полинуклеотид.

[0340] В настоящем документе термин «*ex vivo*» относится к клеткам, удаленным из живого организма (например, человека) и размноженным вне организма (например, в культуральной чашке, пробирке или биореакторе).

[0341] В настоящем документе термин «флагшток», используемый в связи с молекулой нРНК, относится к фрагменту нРНК, в котором происходит связывание или гибридизация сгРНК и tracr друг с другом.

[0342] В настоящем документе термины «направляющая РНК», «молекула направляющей РНК», «молекула нРНК» или «нРНК» используют взаимозаменяемо, и они относятся к группе молекул нуклеиновых кислот, способствующих специфичному направленному воздействию РНК-зависимой нуклеазы или другой эффекторной молекулы (обычно в комплексе с молекулой нРНК) на последовательность-мишень. В некоторых вариантах реализации указанное направленное воздействие осуществляют путем гибридизации фрагмента нРНК с ДНК (например, посредством домена нРНК, обеспечивающего адресное воздействие) и путем связывания фрагмента молекулы нРНК с РНК-зависимой нуклеазой или другой эффекторной молекулой (например, посредством по меньшей мере tracr нРНК). В некоторых вариантах реализации молекула нРНК состоит из одной непрерывной полинуклеотидной молекулы, называемой в настоящем документе «одиночной направляющей РНК» или «онРНК» и т.п. В некоторых вариантах реализации молекула нРНК состоит из множества, обычно двух, полинуклеотидных молекул, которые сами по себе способны ассоциировать, как правило, посредством гибридизации, и называется в настоящем документе «двойной направляющей РНК» или «днРНК» и т.п. Молекулы нРНК подробнее описаны ниже, но обычно содержат домен, обеспечивающий адресное воздействие, и tracr. В некоторых вариантах реализации домен, обеспечивающий адресное воздействие, и tracr расположены на одном полинуклеотиде. В других вариантах реализации домен, обеспечивающий адресное воздействие, и tracr расположены на отдельных полинуклеотидах.

[0343] В настоящем документе термин «гомологичный» относится к идентичности субъективной последовательности между двумя полимерными молекулами (например, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, например, двумя молекулами ДНК или двумя молекулами РНК) или между двумя полипептидными молекулами. Если положение субъективной единицы в обеих молекулах занято одной и той же мономерной субъективной единицей, то они являются гомологичными по данному положению. Например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то две молекулы ДНК являются гомологичными. Гомология между двумя последовательностями представляет собой прямую функцию

количества совпадающих или гомологичных положений. Например, если половина (например, пять положений в полимере длиной в десять субъединиц) положений в двух последовательностях являются гомологичными, две последовательности являются на 50% гомологичными; если 90% положений (например, 9 из 10) являются совпадающими или гомологичными, две последовательности являются на 90% гомологичными.

[0344] В настоящем документе термин «гуманизированные антитела» относится к человеческим формам антител животного, не являющегося человеком (например, мыши), и представляет собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулина или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие последовательности антител), содержащие минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина животного, не являющегося человеком. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменены остатками CDR животного, не являющегося человеком (донорное антитело), например, мыши, крысы или кролика, обладающего желательной специфичностью, сродством и потенциалом. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками иммуноглобулина животного, не являющегося человеком. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, не встречающиеся ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасных последовательностях. Эти модификации вносят для дальнейшего уточнения и оптимизации характеристик антитела. В общем случае гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют областям иммуноглобулина животного, не являющегося человеком, а все или по существу все FR-области являются областями последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело в оптимальном варианте также содержит по меньшей мере фрагмент константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека. Дополнительную информацию см. в Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

[0345] В настоящем документе термин «полностью человеческий» относится к иммуноглобулину, например, антителу, вся молекула которого имеет человеческое происхождение или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной форме антитела человека.

[0346] В настоящем документе термин «идентичность» относится к идентичности субъединичной последовательности между двумя полимерными молекулами, в частности, между двумя аминокислотными молекулами, например, между двумя полипептидными молекулами. Если две аминокислотные последовательности содержат одинаковые остатки в одинаковых положениях, то они идентичны по этому положению. Например, если положение в каждой из двух полипептидных молекул занято аргинином, то два полипептида являются идентичными. Идентичность или степень, в которой две аминокислотные последовательности содержат одинаковые остатки в одинаковых положениях при выравнивании, часто выражают в процентах. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями представляет собой прямую функцию количества совпадающих или идентичных положений. Например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять аминокислот) положений в двух последовательностях идентичны, эти две последовательности на 50% идентичны; если 90% положений (например, 9 из 10) совпадают или идентичны, две аминокислотные последовательности на 90% идентичны.

[0347] В настоящем документе термин «иммуноглобулин» или «Ig» определяет класс белков, которые функционируют как антитела. Антитела, экспрессируемые В-клетками, иногда называют BCR (В-клеточным рецептором) или антигенным рецептором. Пять членов, входящих в этот класс белков, представляют собой IgA, IgG, IgM, IgD и IgE. IgA является первичным антителом, присутствующим в выделениях организма, например, слюне, слезной жидкости, грудном молоке, желудочно-кишечных выделениях и выделениях слизистой дыхательных и мочеполовых путей. IgG является наиболее распространенным циркулирующим антителом. IgM является основным иммуноглобулином, продуцируемым при первичном иммунном ответе у большинства субъектов. Это наиболее эффективный иммуноглобулин для агглютинации, фиксации комплемента и других гуморальных реакций, и он играет важную роль в защите от бактерий и вирусов. IgD представляет собой иммуноглобулин, не обладающий известной функцией

антитела, но способный служить в качестве антигенного рецептора. IgE представляет собой иммуноглобулин, опосредующий гиперчувствительность немедленного типа, вызывая высвобождение медиаторов из тучных клеток и базофилов при воздействии аллергена.

[0348] В настоящем документе термин «иммунный ответ» определяется как клеточный ответ на антиген, возникающий, когда лимфоциты идентифицируют антигенные молекулы как чужеродные и индуцируют образование антител и/или активируют лимфоциты для удаления антигена.

[0349] В настоящем документе термин «иммунная эффекторная клетка» относится к клетке, участвующей в иммунном ответе, например, в стимуляции иммунной эффекторной реакции. Примеры иммунных эффекторных клеток включают Т-клетки (например, альфа-/эта-Т-клетки и гамма-/дельта-Т-клетки), В-клетки, естественные киллеры (НК-клетки), естественные Т-киллеры (НКТ-клетки), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения.

[0350] В настоящем документе термин «иммунная эффекторная функция или иммунная эффекторная реакция» относится к функции или реакции, усиливающим иммунную атаку клетки-мишени или способствующим ей. В некоторых вариантах реализации иммунная эффекторная функция или реакция относится к свойству Т- или НК-клетки, способствующему уничтожению или ингибированию роста или пролиферации клетки-мишени. В случае Т-клетки примерами иммунной эффекторной функции или реакции являются первичная стимуляция и костимуляция.

[0351] В настоящем документе термин «ингибирующая молекула» относится к молекуле, которая при активации вызывает или способствует ингибированию выживания, активации, пролиферации и/или функции клеток; и гену, кодирующему указанную молекулу, и связанным с ним регуляторным элементам (например, промоторам). В некоторых вариантах реализации ингибирующая молекула представляет собой молекулу, экспрессируемую на иммунной эффекторной клетке (например, на Т-клетке). Неограничивающие примеры ингибирующих молекул представляют собой PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), VISTA, TGF β IR, VSIG3, VSIG 8, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD107), KIR, A2aR, MHC I

класса, MHC II класса, GAL9, аденозин и TGF-бета. Следует понимать, что термин «ингибирующая молекула» относится к гену (и связанным с ним регуляторным элементам), кодирующему белок ингибирующей молекулы, при его использовании в связи с последовательностью-мишенью или молекулой нРНК. В некоторых вариантах реализации ген, кодирующий ингибирующую молекулу, представляет собой BTLA, PD-1, TIM-3, VSIG3, VSIG8, CTLA4 или TGFβ1R. В некоторых вариантах реализации ген, кодирующий ингибирующую молекулу, представляет собой VSIG3. В некоторых вариантах реализации ген, кодирующий ингибирующую молекулу, представляет собой PD-1. В некоторых вариантах реализации ген, кодирующий ингибирующую молекулу, представляет собой TGFβ1R.

[0352] В настоящем документе термин «индуцированная плюрипотентная стволовая клетка» или «ИПС-клетка» относится к плюрипотентной стволовой клетке, полученной из взрослых клеток, например, иммунных клеток (т.е. Т-клеток). Экспрессия перепрограммирующих факторов, например, Klf4, Oct3/4 и Sox2, во взрослых клетках превращает клетки в плюрипотентные клетки, способные размножаться и дифференцироваться в клетки различного типа.

[0353] В настоящем документе термин «инструкционный материал» включает публикацию, запись, диаграмму или любое другое выразительное средство, которое можно использовать для передачи полезности композиций и способов согласно настоящему изобретению. Инструкционный материал набора согласно настоящему изобретению можно, например, прикрепить к контейнеру, содержащему нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию согласно настоящему изобретению, или отправить вместе с контейнером, содержащим нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию. В качестве альтернативы, инструкционный материал можно отправить отдельно от контейнера с намерением, чтобы получатель совместно использовал инструкционный материал и соединение.

[0354] В настоящем документе термин «выделенный» означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественным образом присутствующие в живом животном, не являются «выделенными», а та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от материалов,

присутствующих совместно с ними в естественном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, например, клетке-хозяине.

[0355] В настоящем документе термин «нокаут» относится к устранению экспрессии одного или более генов.

[0356] В настоящем документе термин «лентивирус» относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов в отношении способности инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому они являются одним из наиболее эффективных векторов для доставки генов. ВИЧ, ВАО и ВИК являются примерами лентивирусов. Векторы лентивирусного происхождения обеспечивают средства для достижения значительных уровней переноса генов *in vivo*.

[0357] В настоящем документе термин «гибкий полипептидный линкер» или «линкер», используемый в контексте scFv, относится к пептидному линкеру, состоящему из аминокислот, например, остатков глицина и/или серина, и используемому отдельно или в комбинации для связывания переменных областей тяжелой цепи с переменной областью легкой цепи. В одном варианте реализации гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser) $_n$, где n представляет собой положительное целое число, равное или превышающее 1. Например, $n=1$, $n=2$, $n=3$, $n=4$, $n=5$ и $n=6$, $n=7$, $n=8$, $n=9$ и $n=10$ (SEQ ID NO:6592). В одном варианте реализации гибкие полипептидные линкеры включают (Gly $_4$ Ser) $_4$ или (Gly $_4$ Ser) $_3$, но не ограничиваются ими. В еще одном варианте реализации линкеры включают множественные повторы (Gly $_2$ Ser), (GlySer) или (Gly $_3$ Ser).

[0358] В настоящем документе термин «модифицированный» означает измененное состояние или структуру молекулы или клетки согласно настоящему изобретению. Молекулы можно модифицировать многими способами, в том числе химически, структурно и функционально. Клетки можно модифицировать путем введения нуклеиновых кислот.

[0359] В настоящем документе термин «модулирование» означает опосредование обнаруживаемого увеличения или уменьшения уровня реакции у субъекта по сравнению с

уровнем реакции у субъекта в отсутствие лечения или соединения и/или по сравнению с уровнем реакции у субъекта, в остальном идентичного, но не получавшего лечения. Термин охватывает искажение нативного сигнала или реакции и/или воздействие на них, за счет чего опосредуется благоприятная терапевтическая реакция у субъекта, предпочтительно, человека.

[0360] В контексте настоящего изобретения используются следующие сокращения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот. «А» относится к аденозину, «С» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину, а «U» относится к уридину.

[0361] Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, являющиеся вырожденными версиями друг друга и кодирующими одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза "нуклеотидная последовательность, кодирующая белок или РНК" может также включать интроны в той степени, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых вариантах содержать интрон(ы).

[0362] В настоящем документе термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последовательностью, что приводит к экспрессии последней. Например, первая нуклеотидная последовательность функционально связана со второй нуклеотидной последовательностью, если первая нуклеотидная последовательность находится в функциональной взаимосвязи со второй нуклеотидной последовательностью. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и, при необходимости соединения двух областей, кодирующих белок, находятся в одной и той же рамке считывания.

[0363] В настоящем документе термин «сверхэкспрессируемый» опухолевый антиген или «сверхэкспрессия» опухолевого антигена предназначен для обозначения аномального уровня экспрессии опухолевого антигена в клетке из области, пораженной заболеванием,

например, солидной опухоли, в конкретной ткани или органе пациента, относительно уровня экспрессии в нормальной клетке из этой ткани или органа. Пациентов с солидными опухолями или гематологическим злокачественным заболеванием, характеризующимися сверхэкспрессией опухолевого антигена, можно определить с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники.

[0364] В настоящем документе термин «парентеральное» введение иммуногенной композиции включает, например, методики подкожной (п/к), внутривенной (в/в), внутримышечной (в/м) или внутрисуставной инъекции или вливания.

[0365] В настоящем документе термин «полинуклеотид» определяется как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов. Таким образом, термины "нуклеиновые кислоты" и "полинуклеотиды" в настоящем документе являются взаимозаменяемыми. Среди специалистов в данной области техники общеизвестно, что нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, которые можно гидролизовать до мономерных «нуклеотидов». Мономерные нуклеотиды можно гидролизовать до нуклеозидов. В настоящем документе полинуклеотиды включают все нуклеотидные последовательности, полученные любыми способами, доступными в данной области техники, включая, без ограничения, рекомбинантные способы, т.е. клонирование нуклеотидных последовательностей из рекомбинантной библиотеки или генома клетки, с использованием обычной технологии клонирования и ПЦР и т.п., а также синтетические способы, но не ограничиваются ими.

[0366] В настоящем документе термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, а максимальное количество аминокислот, которые могут содержать последовательность белка или пептида, не ограничено. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Данный термин в настоящем документе относится как к коротким цепям, которые также обычно называют в данной области техники, например, пептидами, олигопептидами и олигомерами, так и к более длинным цепям, которые обычно называют в данной области техники белками и которых существует много видов.

«Полипептиды» включают, например, в числе прочего, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, гибридные белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинацию.

[0367] В настоящем документе термин «промотор» определяется как последовательность ДНК, распознаваемая клеточным аппаратом синтеза или привнесенным аппаратом синтеза, необходимая для инициирования специфичной транскрипции полинуклеотидной последовательности.

[0368] В настоящем документе термин «промотор/регуляторная последовательность» означает нуклеотидную последовательность, необходимую для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промотором/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может представлять собой коровую промоторную последовательность, а в других случаях эта последовательность может также включать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, необходимые для экспрессии продукта гена. Промотор/регуляторная последовательность может, например, представлять собой последовательность, экспрессирующую продукт гена тканеспецифичным образом.

[0369] В настоящем документе термин «конститутивный промотор» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональной связи с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает продуцирование продукта гена в клетке в большинстве или во всех физиологических условиях внутри клетки.

[0370] В настоящем документе термин «индуцибельный промотор» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, будучи функционально связанной с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает продуцирование продукта гена в клетке по существу только в присутствии индуктора, соответствующего данному промотору, в клетке.

[0371] В настоящем документе термин «тканеспецифичный промотор» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, будучи функционально связанной с

полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает продуцирование продукта гена в клетке по существу только если клетка представляет собой клетку ткани, соответствующей данному промотору.

[0372] В настоящем документе термин «вирус Сендай» относится к роду семейства Paramyxoviridae. Вирусы Сендай представляют собой одноцепочечные РНК-содержащие вирусы с некодирующей цепью, не встраивающиеся в геном хозяина и не изменяющие генетическую информацию клетки-хозяина. Вирусы Сендай характеризуются исключительно широким диапазоном хозяев и не являются патогенными для человека. В качестве рекомбинантного вирусного вектора вирусы Сендай способны к временной, но сильной экспрессии генов.

[0373] В настоящем документе термин «путь передачи сигнала» относится к биохимическим отношениям между различными сигнальными молекулами, играющими определенную роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза «рецептор клеточной поверхности» включает молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать сигнал через плазматическую мембрану клетки.

[0374] В настоящем документе термин «одноцепочечные антитела» относится к антителам, образованным с использованием технологии рекомбинантных ДНК, в которых фрагменты тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина связаны с Fv-областью посредством рекомбинантной аминокислотной последовательности. Известны различные способы получения одноцепочечных антител, в том числе описанные в патенте США № 4694778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879- 5883 (1988); Ward et al., Nature 334:54454 (1989); Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988).

[0375] В настоящем документе термин «специфичность» относится к способности специфично связываться (например, вступать в иммунологические реакции с) данным антигеном-мишенью (например, антигеном-мишенью человека). Химерный антигенный рецептор может быть моноспецифичным и содержать один или более сайтов связывания, специфично связывающихся с мишенью, или химерный антигенный рецептор может быть мультиспецифичным и содержать два или более сайтов связывания, специфично связывающихся с одной и той же или различными мишенями. В некоторых вариантах реализации химерный антигенный рецептор специфичен по отношению к двум различным

(например, не перекрывающимся) фрагментам одной и той же мишени. В некоторых вариантах реализации химерный антигенный рецептор специфичен по отношению к более чем одной мишени.

[0376] В настоящем документе термин «специфично связывается» в отношении антитела означает антитело или его связывающий фрагмент (например, scFv), распознающее специфичный антиген, но по существу не распознающее или не связывающее другие молекулы в образце. Например, антитело, специфично связывающееся с антигеном одного вида животных, может также связываться с этим антигеном одного или более видов животных. Однако такая межвидовая реакционная способность сама по себе не изменяет классификацию антитела как специфичного. В еще одном примере антитело, специфично связывающееся с антигеном, может также связываться с различными аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная реакционная способность сама по себе не изменяет классификацию антитела как специфичного. В некоторых случаях термины «специфичное связывание» или «специфично связывающееся» можно использовать в отношении взаимодействия антитела, белка, химерного антигенного рецептора или пептида со вторым химическим соединением, что означает, что указанное взаимодействие зависит от наличия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на химическом соединении; например, химерный антигенный рецептор распознает специфичную белковую структуру и связывается с ней, а не с белками в целом. Если антитело специфично к эпитопу «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободного, немеченого А), в реакционной смеси, содержащей меченый «А» и антитело, уменьшит количество меченого А, связанного с антителом.

[0377] В настоящем документе термин «стимуляция» означает первичную реакцию, индуцированную связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) с ее лигандом, что опосредует событие передачи сигнала, например, без ограничения, передачу сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул, например, подавление экспрессии TGF-бета, и/или реорганизацию структур цитоскелета, размножение клона и дифференцировку в отдельные субпопуляции.

[0378] В настоящем документе термин «стимулирующая молекула» означает молекулу на Т-клетке, специфично связывающуюся со стимулирующим лигандом-партнером, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке.

[0379] В настоящем документе термин «стимулирующий лиганд» означает лиганд, который при наличии на антигенпрезентирующей клетке (например, аАРС, дендритной клетке, В-клетке и т.п.) может специфично связываться с партнером по связыванию (называемым в настоящем документе «стимулирующей молекулой») на Т-клетке, тем самым опосредуя первичную реакцию Т-клетки, включая активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и т.п., но не ограничиваясь ими. Стимулирующие лиганды хорошо известны в данной области техники и включают, в числе прочего, молекулу МНС I класса, несущую пептид, антитело против CD3, суперагонистическое антитело против CD28 и суперагонистическое антитело против CD2.

[0380] В настоящем документе термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо. В настоящем документе субъект может представлять собой млекопитающее, например, не являющееся приматом (например, коров, свиней, лошадей, кошек, собак, крыс и т.д.) или являющееся приматом (например, обезьяну и человека). В некоторых вариантах реализации термин «субъект» в настоящем документе относится к позвоночному, например, млекопитающему. Млекопитающие включают, без ограничения, людей, приматов, не являющихся людьми, диких животных, одичавших животных, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и домашних животных. Любой живой организм, в котором можно вызвать иммунный ответ, может представлять собой субъекта или пациента. В некоторых типичных вариантах реализации субъект представляет собой человека.

[0381] В настоящем документе термин «по существу очищенная» клетка представляет собой клетку, по существу не содержащую клеток других типов. По существу очищенная клетка также относится к клетке, отделенной от клеток других типов, с которыми она обычно связана в своем естественном состоянии. В некоторых случаях популяцию по существу очищенных клеток называют однородной популяцией клеток. В других случаях этот термин относится просто к клеткам, отделенным от клеток, с которыми они связаны в

их естественном состоянии. В некоторых вариантах реализации клетки культивируют *in vitro*. В других вариантах реализации клетки не культивируют *in vitro*.

[0382] В настоящем документе термин «сайт-мишень» или «последовательность-мишень» относится к геномной нуклеотидной последовательности, определяющей фрагмент нуклеиновой кислоты, с которой связывающая молекула может специфично связываться в условиях, достаточных для связывания.

[0383] В настоящем документе термин «домен, обеспечивающий адресное воздействие», используемый в отношении нРНК, относится к фрагменту молекулы нРНК, распознающему последовательность-мишень или комплементарному ей. Например, последовательность-мишень в нуклеиновой кислоте клетки (например, в гене).

[0384] В настоящем документе термин «последовательность-мишень» относится к нуклеотидной последовательности, комплементарной, например, полностью комплементарной, домену нРНК, обеспечивающему адресное воздействие. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень расположена на геномной ДНК. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень находится рядом (либо на той же цепи, либо на комплементарной цепи ДНК) с последовательностью мотива, примыкающего к протоспейсеру (РАМ), которую распознает белок, обладающий нуклеазной или другой эффекторной активностью, например, последовательностью РАМ, распознаваемой Cas9. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень представляет собой последовательность-мишень аллогенной Т-клеточной мишени. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень представляет собой последовательность-мишень ингибирующей молекулы. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень представляет собой последовательность-мишень последующего эффектора ингибирующей молекулы.

[0385] В настоящем документе термин «Т-клеточный рецептор» или «TCR» относится к комплексу мембранных белков, участвующему в активации Т-клеток в ответ на презентацию антигена. TCR отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости. TCR состоит из гетеродимера альфа-- (α) и бета- (β) цепи, связанного с тремя димерными модулями CD3δ/CD3ε, CD3γ /CD3ε и CD3ζ/CD3ζ. В некоторых клетках TCR состоит из гамма- и дельта- (γ/δ) цепей (CD3γ /CD3ε). В

некоторых вариантах реализации TCR могут существовать в альфа-/бета- и гамма-/дельта-формах, которые структурно сходны, но характеризуются различным анатомическим расположением и функциями. Каждая цепь состоит из двух внеклеточных доменов, переменного и константного домена. В некоторых вариантах реализации TCR можно модифицировать на любой клетке, содержащей TCR, включая, например, Т-хелпер, цитотоксическую Т-клетку, Т-клетку памяти, регуляторную Т-клетку, естественный Т-киллер и гамма-дельта-Т-клетку.

[0386] В настоящем документе термин «терапевтический» означает лечение и/или профилактику. Терапевтический эффект достигается путем подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

[0387] В настоящем документе термин «терапия» относится к любому протоколу, способу и/или агенту (например, CAR-T), который можно применять для профилактики, лечения и/или облегчения заболевания или связанного с ним симптома. В некоторых вариантах реализации термины «терапевтические средства» и «терапия» относятся к биологической терапии (например, адоптивной клеточной терапии), поддерживающей терапии (например, лимфодеструктивной терапии) и/или другим видам терапии, пригодным для профилактики, лечения и/или облегчения заболевания или связанного с ним симптома, известным специалистам в данной области техники, например, медицинским работникам.

[0388] В настоящем документе термин «tracr», используемый в отношении молекулы нРНК, относится к фрагменту нРНК, связывающемуся с нуклеазой или другой эффекторной молекулой. В некоторых вариантах реализации tracr содержит нуклеотидную последовательность, специфично связывающуюся с Cas9. В некоторых вариантах реализации tracr содержит нуклеотидную последовательность, образующую часть флагштока. В настоящем документе термин «трансфицированный» или «трансформированный» или «трансдуцированный» относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, трансфицированную, трансформированную или трансдуцированную экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

[0389] В настоящем документе термины «лечить» и «лечение» относятся к уменьшению или облегчению прогрессирования, тяжести, частоты и/или продолжительности заболевания или связанного с ним симптома в результате введения одной или более терапевтических средств (включая CAR-T-терапию, направленную на лечение солидных опухолей, но не ограничиваясь ею). Термин «лечение» в настоящем документе также может относиться к изменению течения заболевания у субъекта, подвергаемого лечению. Терапевтические эффекты лечения включают, без ограничения, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптома(ов), уменьшение непосредственных или косвенных патологических последствий заболевания, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию или улучшение прогноза.

[0390] В настоящем документе термин «под контролем транскрипции» или «функционально связанный» в настоящем документе означает, что промотор находится в правильном положении и ориентации по отношению к полинуклеотиду для контроля инициации транскрипции РНК-полимеразой и экспрессии полинуклеотида.

[0391] В настоящем документе термин «вектор» представляет собой композицию вещества, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области техники известно большое количество векторов, включая линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионогенными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы, но не ограничиваясь ими. Таким образом, термин «вектор» включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Этот термин также следует толковать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, облегчающие перенос нуклеиновой кислоты в клетки, например, соединения полилизина, липосомы и т.п. Примеры вирусных векторов включают векторы на основе вируса Сендай, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т.п., но не ограничиваются ими.

[0392] В настоящем документе термин «ксеногенный» относится к трансплантату, полученному из организма животного другого вида.

[0393] В настоящем документе термин «полная среда» относится к среде для культивирования клеток, оптимизированной для роста иммунных клеток (например, роста Т-клеток). В некоторых случаях полная среда содержит белки, неорганические соли, микроэлементы, витамины, аминокислоты, липиды, углеводы, цитокины и/или факторы роста, причем соотношение каждого компонента оптимизировано для роста клеток. Типичные белки включают альбумин, трансферрин, фибронектин и инсулин. Типичные углеводы включают глюкозу. Типичные неорганические соли включают ионы натрия, калия и кальция. Типичные микроэлементы включают цинк, медь, селен и трикарбоновую кислоту. Типичные аминокислоты включают незаменимые аминокислоты, например, L-глутамин (например, аланил-L-глутамин или глицил-L-глутамин); или незаменимые аминокислоты (NEAA), например, глицин, L-аланин, L-аспарагин, L-аспарагиновую кислоту, L-глутаминовую кислоту, L-пролин и/или L-серин. В некоторых вариантах реализации полная среда также содержит один или более из гидрокарбоната натрия (NaHCO_3), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты), фенолового красного, антибиотиков и/или β -меркаптоэтанола. В некоторых случаях полная среда представляет собой бессывороточную среду. В некоторых случаях полная среда представляет собой среду, не содержащую ксеногенных компонентов.

[0394] В настоящем документе термин «среда с определенным химическим составом» относится к среде для культивирования клеток, состав и концентрации всех компонентов которой известны. Она отличается от полной среды тем, что полная среда может содержать компоненты, например, компоненты животного происхождения, состав и/или концентрация которых неизвестны.

[0395] В некоторых случаях среда, «не содержащая ксеногенных компонентов», не содержит какого-либо компонента животного (нечеловеческого) происхождения. В некоторых случаях среда, не содержащая ксеногенных компонентов, содержит один или более компонентов человеческого происхождения, например, сыворотку, факторы роста и инсулин человека.

[0396] В некоторых вариантах реализации «бессывороточная» среда не содержит сыворотки или плазмы, но может содержать компоненты, происходящие из сыворотки или плазмы. В некоторых случаях "бессывороточная" среда содержит компоненты животного

происхождения, например, бычий сывороточный альбумин (БСА).

[0397] В некоторых вариантах реализации «минимальная» среда содержит минимально необходимые компоненты для роста клетки-мишени. В некоторых случаях минимальная среда содержит неорганические соли, источник углерода и воду. В некоторых случаях к минимальной среде добавляют добавки, цитокины и/или белки, например, альбумин (например, HSA). В настоящем документе добавки содержат микроэлементы, витамины, аминокислоты, липиды, углеводы, цитокины, факторы роста или их комбинацию.

[0398] Диапазоны: в настоящем описании различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено исключительно для удобства и краткости, и его не следует рассматривать как жесткое ограничение рамок настоящего изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно описывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные численные значения в указанном диапазоне. Например, описание диапазона, например, от 1 до 6, следует рассматривать как содержащее конкретно описанные поддиапазоны, например, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числа внутри этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это относится к любым диапазонам независимо от их широты.

ПРИМЕРЫ

[0399] Данные примеры представлены исключительно в иллюстративных целях и не ограничивают рамки формулы изобретения, представленной в настоящем документе.

Пример 1

[0400] В данном примере представлены материалы и способы, используемые для получения новых аллогенных CAR-T-клеток согласно настоящему изобретению.

[0401] *Размножение первичных T-клеток человека и криоконсервация клеток.* T-клетки инкубировали при концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде и активировали с использованием Dynabeads® (ThermoFisher) в начале культивирования. Клетки подсчитывали через день с использованием автоматического счетчика клеток NC200™ (Chemometec). Кроме того, через день определяли жизнеспособность и размер клеток. Клетки растили на свежей T-клеточной среде и ресуспендировали при концентрации 5×10^5 клеток/мл. На 9-11 сутки

клетки собирали и криоконсервировали в среде для замораживания, содержащей 5% ДМСО.

[0402] *Анализ посредством многоцветной проточной цитометрии.* Клетки промывали и ресуспендировали в буфере для FACS (физиологическом растворе с фосфатным буфером, содержащем 5% эмбриональной сыворотки КРС). К клеткам добавляли рабочую смесь антител, конъюгированных со специфичными флуорофорами. Клетки промывали и ресуспендировали в буфере для FACS и анализировали с использованием цитометра MACSQuant® (Miltenyi). Используемая панель антител включала антитело против CD3-VioBlue, антитело против TCRab-APC, антитело против B2M-PE-Vio770, антитело против HLA-DR-VioGreen, антитело против HLA1-ABC-FITC, антитело против CAR-PE и 7AAD для оценки жизнеспособности. Для анализа данных использовали программное обеспечение FlowJo® (BD Biosciences).

[0403] *Редактирование генов первичных Т-клеток человека.* Рибонуклеопротеины (РНП) в форме нуклеазы, конъюгированной с соответствующей направляющей РНК для каждой мишени, трансфицировали в Т-клетки человека. Клетки культивировали в специальной Т-клеточной среде, содержащей 5% сыворотки человека, ИЛ-7, ИЛ-15 и глутамин, в течение 5-8 суток. В конце культивирования выполняли многоцветную проточную цитометрию для одновременного определения уровня эффективности редактирования каждого из генов-мишеней.

[0404] *Анализ цитотоксичности по отношению к опухоли в реальном времени.* Цитотоксическую способность CAR Т-клеток оценивали с помощью прибора для анализа клеток в реальном времени xCelligence™ (Agilent). Вкратце, CAR Т-клетки совместно культивировали в титрационных микропланшетах с опухолевыми клетками-мишенями при различных соотношениях эффектора и мишени (например, 1:10, 1:5, 1:2,5, 1:1) в течение нескольких суток. Гибель опухолевых клеток непрерывно определяли как изменение клеточного импеданса, измеренного для каждого состояния. Данные собирали с использованием программного обеспечения RTCA® (Agilent).

[0405] *Оценка эффективности редактирования генов с помощью анализа эндонуклеазы T7E1.* Для определения эффективности редактирования генов на молекулярном уровне авторы использовали анализ эндонуклеазы T7E1, адаптированный к каждому конкретному

гену-мишени. Полную геномную ДНК выделяли из Т-клеток и хранили при минус 80 °С или использовали непосредственно для анализа. ПЦР выполняли с использованием праймеров, охватывающих участок разреза для каждой мишени. Продукты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза с целью подтверждения размера и количества ампликонов. Затем ПЦР-ампликоны расщепляли с использованием нуклеазы T7E1 и анализировали с использованием прибора для автоматизированного электрофореза с высоким разрешением 2100 High-Resolution Automated Electrophoresis BioAnalyzer® (Agilent). Для определения эффективности редактирования генов использовали Программное обеспечение 2100 Expert®.

[0406] *Реакции лейкоцитов в смешанной культуре.* Смешанные культуры аллогенных CAR-T-клеток с Т-клетками от неродственного донора (помеченного как «2й донор») получали в разных соотношениях и наблюдали в течение 16 суток. Гибель клеток определяли посредством проточной цитометрии с использованием специфичных маркеров для дифференцировки и отслеживания каждого конкретного типа клеток (т.е. аллогенных CAR-T-клеток по сравнению с Т-клетками «2-го донора»). Перед проточной цитометрией добавляли 123count™ eBeads для определения абсолютного количества клеток, а для оценки жизнеспособности клеток использовали краситель 7AAD.

Пример 2

[0407] Цель этого примера состояла в подробном описании стратегии тройного нокаута.

[0408] В таблице 3 ниже показана новая платформа аллогенных CAR-T-клеток, использующая стратегию тройного нокаута (комбинация нокаута 3 генов) согласно настоящему изобретению. Уникальный подход включает адресное воздействие на один или более генов модулей TCR (CD3δ, CD3ε и CD3γ), один или более генов HLA-I и один или более генов HLA-II.

Таблица 3: Комбинации CRISPR			
	TCR	HLA-I	HLA-II
1	TRAC	B2M	C2TA
2	CD3ε	B2M	C2TA
3	CD3ε	B2M	RFX5
4	CD3ε	B2M	RFXAP

Таблица 3: Комбинации CRISPR			
	TCR	HLA-I	HLA-II
5	CD3ε	B2M	RFXANK
6	CD3ε	B2M	HLA-DM
7	CD3ε	TAP1	RFX5
8	CD3ε	TAP1	RFXANK
9	CD3ε	TAP1	RFXAP
10	CD3ε	TAP1	HLA-DM
11	CD3ε	NLRC5	RFX5
12	CD3ε	NLRC5	RFXANK
13	CD3ε	NLRC5	RFXAP
14	CD3ε	NLRC5	HLA-DM
15	CD3ε	TAP2	RFX5
16	CD3ε	TAP2	RFXANK
17	CD3ε	TAP2	RFXAP
18	CD3ε	TAP2	HLA-DM
19	CD3δ	B2M	C2TA
20	CD3δ	B2M	RFX5
21	CD3δ	B2M	RFXAP
22	CD3δ	B2M	RFXANK
23	CD3δ	B2M	HLA-DM
24	CD3δ	TAP1	RFX5
25	CD3δ	TAP1	RFXANK
26	CD3δ	TAP1	RFXAP
27	CD3δ	TAP1	HLA-DM
28	CD3δ	NLRC5	RFX5
29	CD3δ	NLRC5	RFXANK
30	CD3δ	NLRC5	RFXAP
31	CD3δ	NLRC5	HLA-DM
32	CD3δ	TAP2	RFX5
33	CD3δ	TAP2	RFXANK
34	CD3δ	TAP2	RFXAP
35	CD3δ	TAP2	HLA-DM

Таблица 3: Комбинации CRISPR			
	TCR	HLA-I	HLA-II
36	CD3 γ	B2M	C2TA
37	CD3 γ	B2M	RFX5
38	CD3 γ	B2M	RFXAP
39	CD3 γ	B2M	RFXANK
40	CD3 γ	B2M	HLA-DM
41	CD3 γ	TAP1	RFX5
42	CD3 γ	TAP1	RFXANK
43	CD3 γ	TAP1	RFXAP
44	CD3 γ	TAP1	HLA-DM
45	CD3 γ	NLRC5	RFX5
46	CD3 γ	NLRC5	RFXANK
47	CD3 γ	NLRC5	RFXAP
48	CD3 γ	NLRC5	HLA-DM
49	CD3 γ	TAP2	RFX5
50	CD3 γ	TAP2	RFXANK
51	CD3 γ	TAP2	RFXAP
52	CD3 γ	TAP2	HLA-DM

[0409] Ожидалось, что стратегия нокаута нескольких генов приведет к получению улучшенного аллогенного Т-клеточного продукта.

Пример 3

[0410] Цель данного примера заключалась в получении различных конструкций, описанных в настоящем документе, с нокаутом по меньшей мере одного гена.

[0411] В **таблице 1** показана новая аллогенная CAR-T стратегия согласно настоящему изобретению, включающая нокаут (КО) альтернативных субъединиц Т-клеточного рецептора (CD3 δ , CD3 γ и CD3 ϵ) и дополнительных важнейших генов путей процессирования и презентации антигенов. В частности, выбрали 15 генов-мишеней, и каждый из них протестировали с несколькими направляющими РНК (нРНК) с использованием CRISPR-ассоциированной (Cas) (CRISPR-Cas) эндонуклеазной системы.

Типичные нРНК, используемые для адресного воздействия на указанные 15 генов, описаны в таблице 4.

Таблица 4: Типичные нРНК		
SEQ ID NO	Гены-мишени	Последовательность нРНК (спейсера)
52	CD3-эпсилон	AGATCCAGGATACTGAGGGCA
53	CD3-дельта	TCTCTGGCCTGGTACTGGCTA
54	CD3 гамма	GCTTCTGCATCACAAGTCAGA
55	B2M	TATCTCTTGTACTACACTGA
56	TAP1	GCTCTTGGAGCCAACCGTTG
57	TAP2	CTTCCTCAAGGGCTGCCAGGA
58	TAPBP_нРНК1	CCTACATGCCCCCACCTCC
59	TAPBP_нРНК2	CGCTCGCATCCTCCACGAAC
60	NLRC5	GTGAGCAGCCTCACAAGACAG
61	C2TA	CCTTGGGGCTCTGACAGGTA
62	HLA-DMA	CCAGAACACTCGGGTGCCTCG
63	RFX5_нРНК1	CAAGGCCGTGCAGAACAAAGT
64	RFX5_нРНК2	TTCTGCACGGCCTTGGAATG
65	RFXANK	CCTGCACCCCTGAGCCTGTGA
66	RFXAP	GAGGATCTAGAGGACGAGGAG
67	Иi-цепь_нРНК1	CATCCTGGTGA CTCTGCTCCT
68	Иi-цепь_нРНК2	TCCAGCCGGCCCTGCTGCTGG

Пример 4

[0412] Цель этого примера заключалась в оценке эффективности нокаута TCR α/β с использованием различных конструктов, ориентированных на адресное повреждение CD3 δ (фиг. 2А), CD3 ϵ (фиг. 2В) и CD3 γ (фиг. 2С).

[0413] Процент эффективности повреждения цепей TCR- α и TCR- β на Т-клетках человека измеряли с помощью проточной цитометрии после направленного адресного повреждения генов CD3 δ (фиг. 2А), CD3 ϵ (фиг. 2В) и CD3 γ (фиг. 2С) с использованием системы CRISPR/Cas. На **фиг. 2А** показаны результаты, полученные после повреждения CD3 δ с использованием четырех различных направляющих РНК: нРНК1, нРНК2, нРНК3 и нРНК4. Повреждение CD3 δ с использованием направляющих РНК нРНК1 и нРНК3 в системе CRISPR/Cas приводило к 100% эффективности КО TCR α/β , в то время как использование нРНК2 и нРНК4 в системе CRISPR/Cas приводило к более чем приблизительно 90% эффективности КО TCR α/β . Таким образом, использование нРНК1 и нРНК3 в системе CRISPR/Cas является предпочтительным для повреждения CD3 δ .

[0414] На **фиг. 2В** показаны результаты, полученные после адресного повреждения CD3 ϵ с использованием пяти различных направляющих РНК: нРНК1, нРНК2, нРНК3, нРНК4 и нРНК5. Повреждение CD3 ϵ с использованием направляющих РНК нРНК4 и нРНК5 в системе CRISPR/Cas приводило к 100% эффективности КО TCR α/β , в то время как использование нРНК1 приводило лишь к приблизительно 50% эффективности КО TCR α/β , и, наконец, использование направляющих нРНК2 и нРНК3 в системе CRISPR/Cas приводило к более чем приблизительно 90% эффективности КО TCR α/β . Таким образом, применение направляющих РНК нРНК4 и нРНК5 в системе CRISPR/Cas является предпочтительным для повреждения CD3 ϵ .

[0415] На **фиг. 2С** показаны результаты, полученные после адресного повреждения CD3 γ с использованием пяти различных направляющих РНК: нРНК1, нРНК2, нРНК3, нРНК4 и нРНК5. Повреждение CD3 γ с использованием нРНК4 и направляющих РНК в системе CRISPR/Cas приводило к 100% эффективности КО TCR α/β , в то время как использование нРНК5 приводило к более чем приблизительно 95% эффективности КО TCR α/β , и, наконец, использование нРНК1, нРНК2 и нРНК3 направляющих РНК в системе CRISPR/Cas приводило к меньшей эффективности КО TCR α/β . Таким образом,

использование направляющей РНК нРНК4 в системе CRISPR/Cas является предпочтительным для повреждения CD3 γ .

Пример 5

[0416] Цель данного примера состояла в оценке размножения различных конструкторов аллогенных CAR-T-клеток в течение 10 суток.

[0417] Различные протестированные конструкторы включали аллогенные CAR-T-клетки с: (1) нокаутом TRAC (ALLO (TRAC KO) на **фиг. 3**) (например, нокаут, использовавшийся до настоящего изобретения), (2) нокаут CD3 δ (ALLO (D1 KO) на **фиг. 3**), (3) нокаут CD3 γ (ALLO (G4 KO) на **фиг. 3**) и (4) нокаут CD3 ϵ (ALLO (E4 KO) на **фиг. 3**). Процент удвоения популяции клеток показан на оси Y, а время в сутках показано на оси X. Результаты подробно показаны на **фиг. 3**.

[0418] На **фиг. 3** показан график, иллюстрирующий размножение аллогенных CAR-T-клеток, полученных с использованием стратегии, изображенной на **фиг. 1**, и демонстрирующий количество удвоений популяции за десятидневный период. Тестируемые аллогенные CAR-T-клетки представляют собой рекомбинантные T-клетки с нокаутом TRAC (TRAC KO), нокаутом CD3 δ (D1 KO), нокаутом CD3 γ (G4 KO) и нокаутом CD3 ϵ (E4 KO).

Пример 6

[0419] В данном примере оценивали несколько различных конструкторов с нокаутом для сравнения поверхностной экспрессии цепи TCR- α/β .

[0420] На **фиг. 4A** и **4B** показаны результаты проточной цитометрии, позволяющие сравнить CRISPR-опосредованное подавление нокаута цепи TCR- α (TRAC) (например, конструктор, использовавшийся до настоящего изобретения), нокаута CD3 δ (D1 KO), нокаута CD3 γ (G4 KO) и нокаута CD3 ϵ (E4 KO). На **фиг. 4A** показано, что нокаут CD3 ϵ (E4 KO) является лучшей мишенью для нокаута T-клеточного рецептора, согласно измерениям поверхностной экспрессии цепи TCR- α/β . На **фиг. 4B** показано, что аллогенные CAR-T-клетки с нокаутом CD3 ϵ (E4 KO), характеризовались более высокой эффективностью трансдукции и улучшенной функциональностью по сравнению с, например, CAR-T-

клетками с нокаутом CD3 γ или CD3 δ ; проиллюстрирован вариант реализации PSMA-CAR-T-клеток.

Пример 7

[0421] Цель данного примера состояла в оценке способности различных PSMA CAR-T-клеточных конструкторов к уничтожению опухоли.

[0422] На **фиг. 5.** показан график, демонстрирующий способность аллогенных PSMA CAR-T-клеток с нокаутом цепи TCR- α (TRAC) (например, конструктора, использовавшегося до настоящего изобретения), нокаутом CD3 δ (D1), нокаутом CD3 ϵ (E4) и нокаутом CD3 γ (G4) к уничтожению опухоли. Результаты показывают, что аллогенные PSMA E4 CAR-T-клетки обладали наилучшими цитотоксическими свойствами. Клетки-мишени представляли собой клетки РС3, которые представляют собой линию клеток рака предстательной железы человека.

[0423] Эти результаты были неожиданными и непредвиденными, поскольку не ожидалось, что адресное повреждение одной субъединицы CD3 приведет к получению более эффективных аллогенных CAR-T-клеток по сравнению с адресным повреждением других субъединиц CD3. На **фиг. 5** продемонстрирован неожиданный результат, означающий, что аллогенные CAR-T-клетки после адресного воздействия на CD3 ϵ (например, с нокаутом CD3 ϵ (E4)), были более эффективными (т.е. уничтожали опухолевые клетки намного быстрее) по сравнению с аллогенными CAR-T-клетками с нокаутом TCR- α цепи (TRAC), аллогенными CAR-T-клетками с нокаутом CD3 δ (D1) или аллогенными CAR-T-клетками с нокаутом CD3 γ (G4).

Пример 8

[0424] Цель данного примера состояла в оценке эффективности методологии CRISPR-Cas в осуществлении нокаута гена-мишени. В частности,

[0425] На **фиг. 6A-6D** показана активность CRISPR-Cas, проиллюстрированная анализом обнаружения несоответствия эндонуклеазы T7 (T7E1). На **фиг. 6A** показано типичное изображение гель-электрофореза продуктов ПЦР, обработанных T7E1, амплифицированных с сайтов трех разных вариантов редактирования гена C2TA (CPTA) посредством CRISPR-Cas с использованием трех разных нРНК. На **фиг. 6B-7D** показаны

электрофореграммы, полученные с помощью электрофореграммы анализа эндонуклеазы T7E1 на Agilent Bioanalyzer и демонстрирующие эффективность редактирования CRISPR-Cas.

[0426] Кроме того, на **фиг. 7A-D** показаны электрофореграммы, полученные на Agilent Bioanalyzer, и гель-электрофорез контрольных образцов и продуктов ПЦР, обработанных T7E1, иллюстрирующие эффективность CRISPR-редактирования C2TA (CITA).

Пример 9

[0427] Цель данного примера состояла в определении жизнеспособности клеток различных типов.

[0428] Выполняли анализ лимфоцитов в смешанной культуре (MLA). На **фиг. 8** показан график, иллюстрирующий результат анализа реакции лимфоцитов в смешанной культуре (MLR) только с аллогенными клетками, только с Т-клетками (второго донора), аллогенными клетками в смешанной культуре и Т-клетками (второго донора) в смешанной культуре. В частности, Т-клетки реципиента (Т-клетки от другого донора) совместно культивировали с аллогенными CAR-Т-клетками в течение 14 суток и анализировали пролиферацию Т-клеток.

[0429] Результаты демонстрировали жизнеспособность контрольных Т-клеток (2-го донора), аллогенных PSMA CAR-Т-клеток отдельно или в смешанной культуре, и показали, что Т-клетки «реципиента» не реагировали (отсутствие пролиферации) на присутствие аллогенных клеток. Таким образом, на **фиг. 8** показано, что Т-клетки 2-го (постороннего) донора не пролиферировали в ответ на аллогенные PSMA CAR-Т-клетки в совместной культуре, несмотря на несоответствие HLA. Аллогенный CAR-Т включает PSMA CAR-Т и нРНК TRAC/B2M/C2TA, отредактированных с помощью CRISPR. Соответственно, у аллогенных CAR-Т-клеток согласно настоящему изобретению будет возможность уничтожения опухолевых клеток без обнаружения иммунной системой (т.е. Т-клетками) реципиента.

* * * *

[0430] Несмотря на то, что некоторые варианты реализации проиллюстрированы и описаны в настоящем документе, следует понимать, что в них могут быть внесены изменения и

модификации в пределах компетенции специалиста среднего уровня квалификации в данной области техники без отступления от технологии в ее расширенных аспектах, заданных в нижеследующей формуле изобретения.

[0431] Варианты реализации, иллюстративно описанные в настоящем документе, можно подходящим способом реализовать на практике при отсутствии любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, не описанных в настоящем документе явным образом. Таким образом, например, термины «содержащий», «включая», «включающий» и т.д. следует истолковывать в широком смысле и без ограничений. Кроме того, фразу «по существу состоящий из» следует понимать как включающую явным образом указанные элементы, а также дополнительные элементы, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики технологии, описанной в формуле изобретения. Фраза «состоящий из» исключает любой не указанный элемент.

[0432] Помимо этого, если характеристики или аспекты настоящего изобретения описаны в терминах групп Маркуша, специалисты в данной области техники должны понимать, что тем самым настоящее изобретение также описывается применительно к любому отдельному члену или подгруппе членов группы Маркуша.

[0433] Специалист в данной области техники должен понимать, что для всевозможных целей, в частности, с точки зрения предоставления письменного описания, все диапазоны, приведенные в настоящем документе, также охватывают все возможные поддиапазоны и комбинации поддиапазонов, включая конечные точки. Можно считать, что любой указанный диапазон в достаточной степени описывает тот же диапазон, разбитый по меньшей мере на равные половины, трети, четверти, пяты, десятые и т. д. В качестве неограничивающего примера, каждый диапазон, обсуждаемый в настоящем документе, можно разбить на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть и т.д. Как также должен понимать специалист в данной области техники, все формулировки, например, «вплоть до», «по меньшей мере», «более чем», «менее чем» и т.п., включают указанное число и относятся к диапазонам, которые впоследствии можно разбить на поддиапазоны, как описано выше. Наконец, как должен понимать специалист в данной области техники, диапазон включает каждый отдельный элемент диапазона.

[0434] Все публикации, заявки на патент, выданные патенты и другие общедоступные документы, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящую заявку посредством ссылок, как если бы было явным образом указано, что каждая отдельная публикация, заявка на патент, выданный патент или другой документ отдельно включены в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме. Определения, содержащиеся в тексте, включенном посредством ссылки, исключаются в той степени, в которой они противоречат определениям в настоящем описании.

[0435] Другие варианты реализации изложены в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированная иммунная клетка, содержащая:

(a) инсерцию и/или делецию в одном или более локусов генов, каждый из которых кодирует эндогенный иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи), причем указанная инсерция и/или делеция способна подавлять экспрессию указанных одного или более эндогенных иммунологических генов; и

(b) экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (KIR), антигенсвязывающий полипептид, лиганд рецептора клеточной поверхности или опухолевый антиген; и, необязательно

(c) дополнительно содержащая доминантно-негативный рецептор, переключающий рецептор, хемокин, рецептор хемокина, цитокин, рецептор цитокина, ИЛ-7, ИЛ-7R, ИЛ-15, ИЛ-15R, ИЛ-21, ИЛ-18, CCL21, CCL19 или их комбинацию.

2. Модифицированная иммунная клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанная инсерция и/или делеция способна подавлять экспрессию генов:

(a) субъединицы Т-клеточного рецептора, выбранной из CD3 δ , CD3 ϵ и/или CD3 γ ;

(b) молекулы HLA I класса, выбранной из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP и/или NLRC5; и

(c) молекулы HLA II класса, выбранной из HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и/или инвариантной цепи (Ii-цепи).

3. Модифицированная иммунная клетка по п. 2, отличающаяся тем, что:

(a) указанная инсерция и/или делеция способна подавлять:

(i) экспрессию гена CD3 δ и

(ii) экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации; или

(b) указанная инсерция и/или делеция способна подавлять:

(i) экспрессию гена CD3ε, и
(ii) экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации; или

(c) указанная инсерция и/или делеция способна подавлять:

(i) экспрессию гена CD3γ, и
(ii) экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации.

4. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что указанная инсерция и/или делеция способна подавлять экспрессию генов:

(I) любого белка из следующих:

- (a) CD3ε, B2M и СИТА;
- (b) CD3ε, B2M и RFX5;
- (c) CD3ε, B2M и RFXAP;
- (d) CD3ε, B2M и RFXANK;
- (e) CD3ε, B2M и HLA-DM;
- (f) CD3ε, B2M и Ii-цепи;
- (g) CD3ε, TAP1 и СИТА;
- (h) CD3ε, TAP1 и RFX5;
- (i) CD3ε, TAP1 и RFXAP;
- (j) CD3ε, TAP1 и RFXANK;
- (k) CD3ε, TAP1 и HLA-DM;
- (l) CD3ε, TAP1 и Ii-цепи;
- (m) CD3ε, TAP2 и СИТА;
- (n) CD3ε, TAP2 и RFX5;
- (o) CD3ε, TAP2 и RFXAP;
- (p) CD3ε, TAP2 и RFXANK;
- (q) CD3ε, TAP2 и HLA-DM;
- (r) CD3ε, TAP2 и Ii-цепи;
- (s) CD3ε, NLRC5 и СИТА;

- (t) CD3ε, NLRC5 и RFX5;
 - (u) CD3ε, NLRC5 и RFXAP;
 - (v) CD3ε, NLRC5 и RFXANK;
 - (w) CD3ε, NLRC5 и HLA-DM;
 - (x) CD3ε, NLRC5 и Ii-цепь;
 - (y) CD3ε, TAPBP и СИТА;
 - (z) CD3ε, TAPBP и RFX5;
 - (aa) CD3ε, TAPBP и RFXAP;
 - (bb) CD3ε, TAPBP и RFXANK;
 - (cc) CD3ε, TAPBP и HLA-DM; или
 - (dd) CD3ε, TAPBP и Ii-цепи; или
- (II) любого белка из следующих:
- (a) CD3δ, B2M и СИТА;
 - (b) CD3δ, B2M и RFX5;
 - (c) CD3δ, B2M и RFXAP;
 - (d) CD3δ, B2M и RFXANK;
 - (e) CD3δ, B2M и HLA-DM;
 - (f) CD3δ, B2M и Ii-цепи;
 - (g) CD3δ, TAP1 и СИТА;
 - (h) CD3δ, TAP1 и RFX5;
 - (i) CD3δ, TAP1 и RFXAP;
 - (j) CD3δ, TAP1 и RFXANK;
 - (k) CD3δ, TAP1 и HLA-DM;
 - (l) CD3δ, TAP1 и Ii-цепи;
 - (m) CD3δ, TAP2 и СИТА;
 - (n) CD3δ, TAP2 и RFX5;
 - (o) CD3δ, TAP2 и RFXAP;
 - (p) CD3δ, TAP2 и RFXANK;
 - (q) CD3δ, TAP2 и HLA-DM;
 - (r) CD3δ, TAP2 и Ii-цепи;

- (s) CD3 δ , NLRC5 и СИТА;
- (t) CD3 δ , NLRC5 и RFX5;
- (u) CD3 δ , NLRC5 и RFXAP;
- (v) CD3 δ , NLRC5 и RFXANK;
- (w) CD3 δ , NLRC5 и HLA-DM;
- (x) CD3 δ , NLRC5 и Ii-цепи;
- (y) CD3 δ , TAPBP и СИТА;
- (z) CD3 δ , TAPBP и RFX5;
- (aa) CD3 δ , TAPBP и RFXAP;
- (bb) CD3 δ , TAPBP и RFXANK;
- (cc) CD3 δ , TAPBP и HLA-DM; или
- (dd) CD3 δ , TAPBP и Ii-цепи; или

(III) любого белка из следующих:

- (a) CD3 γ , B2M и СИТА;
- (b) CD3 γ , B2M и RFX5;
- (c) CD3 γ , B2M и RFXAP;
- (d) CD3 γ , B2M и RFXANK;
- (e) CD3 γ , B2M и HLA-DM;
- (f) CD3 γ , B2M и Ii-цепи;
- (g) CD3 γ , TAP1 и СИТА;
- (h) CD3 γ , TAP1 и RFX5;
- (i) CD3 γ , TAP1 и RFXAP;
- (j) CD3 γ , TAP1 и RFXANK;
- (k) CD3 γ , TAP1 и HLA-DM;
- (l) CD3 γ , TAP1 и Ii-цепи;
- (m) CD3 γ , TAP2 и СИТА;
- (n) CD3 γ , TAP2 и RFX5;
- (o) CD3 γ , TAP2 и RFXAP;
- (p) CD3 γ , TAP2 и RFXANK;
- (q) CD3 γ , TAP2 и HLA-DM;

- (r) CD3 γ , TAP2 и Ii-цепи;
- (s) CD3 γ , NLRC5 и СИТА;
- (t) CD3 γ , NLRC5 и RFX5;
- (u) CD3 γ , NLRC5 и RFXAP;
- (v) CD3 γ , NLRC5 и RFXANK;
- (w) CD3 γ , NLRC5 и HLA-DM;
- (x) CD3 γ , NLRC5 и Ii-цепи;
- (y) CD3 γ , TAPBP и СИТА;
- (z) CD3 γ , TAPBP и RFX5;
- (aa) CD3 γ , TAPBP и RFXAP;
- (bb) CD3 γ , TAPBP и RFXANK;
- (cc) CD3 γ , TAPBP и HLA-DM; или
- (dd) CD3 γ , TAPBP и Ii-цепи.

5. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что:

- (a) модифицированная иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественного киллера (НК-клетки), естественного Т-киллера, лимфоидной клетки-предшественника, гемопоэтической стволовой клетки, стволовой клетки, макрофага и дендритной клетки; и/или
- (b) модифицированная иммунная клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку или CD8⁺ Т-клетку; и/или
- (c) модифицированная иммунная клетка представляет собой аллогенную Т-клетку или аутологичную Т-клетку человека.

6. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что указанная инсерция и/или делеция является результатом редактирования гена, выбранного из группы, состоящей из:

- (a) CRISPR-ассоциированной (Cas) (CRISPR-CAs) эндонуклеазной системы и направляющей РНК;
- (b) системы редактирования генов TALEN, системы редактирования генов на основе нуклеазы с мотивом "цинковый палец" (ZFN), мегануклеазной системы редактирования генов или системы редактирования генов мега-TALEN; и

(с) системы сайленсинга генов, выбранной из антисмысловой РНК, антигомерной РНК, РНКи, миРНК или кшРНК.

7. Модифицированная иммунная клетка по п. 6, отличающаяся тем, что :

(а) эндонуклеаза Cas включает Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, Cas9 *S. pyogenes*, Cas9 *Staphylococcus aureus*, MAD7 или любую их комбинацию ; или

(b) система CRISPR-Cas включает вектор pAd5/F35-CRISPR; или

(с) направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в пределах одного или более локусов генов, каждый из которых кодирует иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, СИТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи).

8. Модифицированная иммунная клетка по п. 7, отличающаяся тем, что:

(а) направляющая РНК комплементарна последовательности в пределах: (1) одного или более экзонов CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ , или (2) экзона 1 CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ ; или

(b) указанная последовательность находится в локусе гена CD3 δ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 53; или

(с) указанная последовательность находится в локусе гена CD3 ϵ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 52; или

(d) указанная последовательность находится в локусе гена CD3 γ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 54; или

(е) указанная последовательность находится в локусе гена B2M, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 55; или

(f) указанная последовательность находится в локусе гена СИТА, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID

NO: 61; или

(g) указанная последовательность находится в локусе гена TAP1, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 56; или

(h) указанная последовательность находится в локусе гена TAP2, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 57; или

(i) указанная последовательность находится в локусе гена TAPBP, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или их комбинацией; или

(j) указанная последовательность находится в локусе гена NLRC5, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 60; или

(k) указанная последовательность находится в локусе гена HLA-DM, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 62; или

(l) указанная последовательность находится в локусе гена RFX5, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 или их комбинацией; или

(m) указанная последовательность находится в локусе гена RFXANK, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 65; или

(n) указанная последовательность находится в локусе гена RFXAP, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 66; или

(o) указанная последовательность находится в локусе гена Ii-цепи, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или их комбинацией.

9. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что:

(a) иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызываемым

немодифицированной иммунной клеткой, введенной тому же субъекту;

(b) иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызываемым иммунной клеткой, содержащей инсерцию и/или делецию, способную подавлять экспрессию генов TRAC, TRBC, B2M и СИТА, причем указанный иммунный ответ необязательно представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ), и, кроме того, ослабленная РТПХ необязательно направлена против клетки с несовпадающим HLA-I или против клетки с несовпадающим HLA-II.

10. Модифицированная иммунная клетка по п. 9, отличающаяся тем, что:

(a) РТПХ ослаблена приблизительно на 10% или более, приблизительно на 20% или более, приблизительно на 30% или более, приблизительно на 40% или более, приблизительно на 50% или более, приблизительно на 60% или более, приблизительно на 70% или более, приблизительно на 80% или более, приблизительно на 90% или более, или приблизительно на 95% или более; или

(b) РТПХ ослаблена приблизительно в 1 раз или более, приблизительно в 2 раза или более, приблизительно в 3 раза или более, приблизительно в 4 раза или более, приблизительно в 5 раз или более, приблизительно в 6 раз или более, приблизительно в 7 раз или более, приблизительно в 8 раз или более, приблизительно в 9 раз или более, приблизительно в 10 раз или более, приблизительно в 20 раз или более, приблизительно в 30 раз или более, приблизительно в 50 раз или более, приблизительно в 100 раз или более, приблизительно в 150 раз или более или приблизительно в 200 раз или более; и/или

(c) ослабление РТПХ за счет модифицированной иммунной клетки сравнивают с действием эквивалентной иммунной клетки, не содержащей делеции и/или инсерции в одном или более локусов генов, или иммунной клетки, содержащей делецию и/или инсерцию в TRAC, B2M и СИТА.

11. Модифицированные клетки по любому из пп. 1-10, отличающиеся тем, что экзогенная нуклеиновая кислота кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), причем указанный CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

12. Модифицированная иммунная клетка по п. 11, отличающаяся тем, что:

(a) антигенсвязывающий домен содержит полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, Fab, F(ab)₂, моноспецифичный Fab₂, биспецифичный Fab₂, триспецифичный Fab₂, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), диатело, триатело, миниантитело, V-Nag или VhH; и/или

(b) трансмембранный домен выбран из искусственной гидрофобной последовательности, трансмембранного домена трансмембранного белка I типа, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD2, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), ICOS (CD278), CD154, CD357 (GITR), Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 и трансмембранного домена, полученного из иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR); и/или

(c) костимулирующий домен содержит один или более из костимулирующего домена белка, выбранного из группы, состоящей из белков суперсемейства TNFR, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS (CD278), NKG2C, B7-H3 (CD276) и внутриклеточного домена, полученного из иммуноглобулиноподобного рецептора киллеров (KIR), или его варианта; и/или

(d) внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен, выбранный из группы, состоящей из цитоплазматических сигнальных доменов CD2 человека, CD3-дзета-цепи (CD3 ζ), Fc γ RIII, Fc ϵ RI, цитоплазматического хвоста Fc-рецептора, цитоплазматического рецептора, несущего иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), TCR-дзета, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d, или их варианта; и/или

(e) мишенью антигенсвязывающего домена является опухолевый антиген:

(i) ассоциированный с гематологическим злокачественным заболеванием;

(ii) ассоциированный с солидной опухолью; и/или

(iii) выбранный из группы, состоящей из ROR1, мезотелина, c-Met, PSMA, PSCA, альфа-рецептора фолата, бета-рецептора фолата, EGFR, EGFRvIII, GPC2, GPC2, муцина 1 (MUC1), Tn-антигена ((Tn-Ag) или (GalNAc-Ser/Thr)), TnMUC1, альфа-4-

рецептора семейства GDNF (GFRa4), белка активации фибробластов (FAP) и альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (ИЛ-13Ra2 или CD213A2); и/или

(f) внутриклеточный сигнальный домен содержит дзета-цепь CD3 (CD3 ζ) человека; и/или

(g) CAR содержит:

(i) антигенсвязывающий домен PSMA, костимулирующий домен CD2 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета;

(ii) антигенсвязывающий домен мезотелина, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета; или

(iii) антигенсвязывающий домен TnMUC1, костимулирующий домен CD2 и сигнальный домен CD3-дзета.

13. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что:

(a) переключающий рецептор содержит внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным сигналом, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с позитивным сигналом; и/или

(b) доминантно-негативный рецептор содержит:

(i) укороченный вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом;

(ii) вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и по существу не содержащий внутриклеточного сигнального домена; или

(iii) внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным сигналом, и трансмембранный домен.

14. Модифицированная иммунная клетка по п. 13, отличающаяся тем, что:

(a) белок, ассоциированный с негативным сигналом, выбран из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, TGF β RII, BTLA, VSIG3, VSIG8 и TIM-3; и/или

(b) белок, ассоциированный с позитивным сигналом, выбран из группы, состоящей из CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS и CD27; и/или

(c) переключающий рецептор выбран из группы, состоящей из PD-1-CD28, PD-

1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12Rβ1, PD-1^{A132L}-IL12Rβ1, PD-1-IL12Rβ2, PD-1^{A132L}-IL12Rβ2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12Rβ1, VSIG8-IL12Rβ1, VSIG3-IL12Rβ2, VSIG8-IL12Rβ2, TGFβRII-CD27, TGFβRII-CD28, TGFβRII-4-1BB, TGFβRII-ICOS, TGFβRII-IL12Rβ1 и TGFβRII-IL12Rβ2; и/или

(d) доминантно-негативный рецептор представляет собой доминантно-негативный рецептор PD1, VSIG3, VSIG8 или TGFβR; и/или

(e) трансмембранный домен:

(i) выбран из трансмембранного домена белка, выбранного из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, VSIG3, VSIG8, TGFβRII, BTLA, TIM-3, CD28, 4-1BB, IL12Rβ1, IL12Rβ2, CD2, ICOS и CD27; или

(ii) выбран из трансмембранного белка, ассоциированного с негативным сигналом, или трансмембранного домена белка, ассоциированного с негативным сигналом.

15. Выделенная модифицированная Т-клетка, содержащая по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD3δ, CD3ε, CD3γ, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи);

причем указанная модифицированная Т-клетка, содержащая указанный функционально неполноценный полипептид, характеризуется по меньшей мере одним из:

(i) сниженной экспрессией Т-клеточного рецептора по сравнению с немодифицированной Т-клеткой;

(ii) сниженной экспрессией указанного неполноценного полипептида;

(iii) полным отсутствием поверхностной экспрессии комплекса Т-клеточного рецептора; и

(iv) сниженным или недостаточным перекрестным связыванием Т-клеточного рецептора.

16. Выделенная модифицированная Т-клетка по п. 15, отличающаяся тем, что:

(a) модифицированная Т-клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом,

вызываемым немодифицированной Т-клеткой, введенной тому же субъекту; и/или

(b) модифицированная Т-клетка содержит два или более функционально неполноценных полипептида, причем второй неполноценный полипептид представляет собой альфа-цепь Т-клеточного рецептора (TRAC); и/или

(c) модифицированная Т-клетка содержит:

(i) три или более функционально неполноценных полипептидов, выбранных из TRAC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи;

(ii) два функционально неполноценных полипептида, выбранных из CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи;

(iii) три функционально неполноценных полипептида, выбранных из CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи;

(iv) функционально неполноценный полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 γ , и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; или

(v) функционально неполноценный полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 γ , и функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; и/или

(d) модифицированная Т-клетка содержит:

(i) функционально неполноценный CD3 δ и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи;

(ii) функционально неполноценный CD3 ϵ и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; или

(iii) функционально неполноценный CD3 γ и по меньшей мере один функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, B2M, C2TA, TAP1,

TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; и/или

(e) модифицированная Т-клетка содержит два или более функционально неполноценных полипептида, выбранных из TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или Ii-цепи; и/или

(f) модифицированная Т-клетка:

(i) характеризуется сниженной экспрессией TRAC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, Ii цепи или любой их комбинации, или

(ii) не экспрессирует CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, Ii цепь или любую их комбинацию; и/или

(g) модифицированная Т-клетка дополнительно содержит функционально неполноценный полипептид, выбранный из TRAC, B2M и C2TA; и/или

(h) модифицированная Т-клетка характеризуется сниженной экспрессией TRAC, B2M или C2TA или не экспрессирует TRAC, B2M или C2TA; и/или

(i) модификация CD3 δ , CD3 ϵ и/или CD3 γ приводит к нарушению функции комплекса TCR/CD3; и/или

(j) CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ модифицируют путем адресного воздействия на один или более экзонов CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ , необязательно экзон 1 CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ .

17. Способ получения модифицированной иммунной клетки, включающий:

(a) введение в иммунную клетку одной или более нуклеиновых кислот, способных подавлять экспрессию одного или более эндогенных иммунологических генов, кодирующих эндогенный иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи).

(b) введение в иммунную клетку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (KIR), антигенсвязывающий полипептид, лиганд рецептора клеточной поверхности или опухолевый антиген; и

(c) размножение модифицированной иммунной клетки для получения

популяции Т-клеток; и, необязательно,

(d) дополнительно включающий введение в иммунную клетку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей доминантно-негативный рецептор, переключающий рецептор или их комбинацию.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что:

(a) одна или более нуклеиновых кислот способны подавлять экспрессию генов:
(i) субъединицы Т-клеточного рецептора, выбранной из CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ ;

(ii) молекулы HLA I класса, выбранной из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP или NLRC5; и

(iii) молекулы HLA II класса, выбранной из HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP или инвариантной цепи (Ii-цепи); и/или

(b) одна или более нуклеиновых кислот способны подавлять экспрессию гена CD3 δ и экспрессию гена молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации; и/или

(c) одна или более нуклеиновых кислот способны подавлять экспрессию гена CD3 ϵ и молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации; и/или

(d) одна или более нуклеиновых кислот способны подавлять экспрессию гена CD3 γ и молекулы HLA, выбранной из группы, состоящей из B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, СИТА, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, инвариантной цепи (Ii-цепи) и их комбинации.

19. Способ по п. 17 или 18, отличающийся тем, что указанная одна или более нуклеиновых кислот способны подавлять экспрессию генов:

(I) любого белка из следующих:

(a) CD3 ϵ , B2M и СИТА;

(b) CD3 ϵ , B2M и RFX5;

(c) CD3 ϵ , B2M и RFXAP;

(d) CD3 ϵ , B2M и RFXANK;

- (e) CD3ε, B2M и HLA-DM;
 - (f) CD3ε, B2M и Ii-цепи;
 - (g) CD3ε, TAP1 и СИТА;
 - (h) CD3ε, TAP1 и RFX5;
 - (i) CD3ε, TAP1 и RFXAP;
 - (j) CD3ε, TAP1 и RFXANK;
 - (k) CD3ε, TAP1 и HLA-DM;
 - (l) CD3ε, TAP1 и Ii-цепи;
 - (m) CD3ε, TAP2 и СИТА;
 - (n) CD3ε, TAP2 и RFX5;
 - (o) CD3ε, TAP2 и RFXAP;
 - (p) CD3ε, TAP2 и RFXANK;
 - (q) CD3ε, TAP2 и HLA-DM;
 - (r) CD3ε, TAP2 и Ii-цепи;
 - (s) CD3ε, NLRC5 и СИТА;
 - (t) CD3ε, NLRC5 и RFX5;
 - (u) CD3ε, NLRC5 и RFXAP;
 - (v) CD3ε, NLRC5 и RFXANK;
 - (w) CD3ε, NLRC5 и HLA-DM;
 - (x) CD3ε, NLRC5 и Ii-цепь;
 - (y) CD3ε, TAPBP и СИТА;
 - (z) CD3ε, TAPBP и RFX5;
 - (aa) CD3ε, TAPBP и RFXAP;
 - (bb) CD3ε, TAPBP и RFXANK;
 - (cc) CD3ε, TAPBP и HLA-DM; или
 - (dd) CD3ε, TAPBP и Ii-цепи; или
- (II) любого белка из следующих:
- (a) CD3δ, B2M и СИТА;
 - (b) CD3δ, B2M и RFX5;
 - (c) CD3δ, B2M и RFXAP;
 - (d) CD3δ, B2M и RFXANK;

- (e) CD3 δ , B2M и HLA-DM;
- (f) CD3 δ , B2M и Ii-цепи;
- (g) CD3 δ , TAP1 и СИТА;
- (h) CD3 δ , TAP1 и RFX5;
- (i) CD3 δ , TAP1 и RFXAP;
- (j) CD3 δ , TAP1 и RFXANK;
- (k) CD3 δ , TAP1 и HLA-DM;
- (l) CD3 δ , TAP1 и Ii-цепи;
- (m) CD3 δ , TAP2 и СИТА;
- (n) CD3 δ , TAP2 и RFX5;
- (o) CD3 δ , TAP2 и RFXAP;
- (p) CD3 δ , TAP2 и RFXANK;
- (q) CD3 δ , TAP2 и HLA-DM;
- (r) CD3 δ , TAP2 и Ii-цепи;
- (s) CD3 δ , NLRC5 и СИТА;
- (t) CD3 δ , NLRC5 и RFX5;
- (u) CD3 δ , NLRC5 и RFXAP;
- (v) CD3 δ , NLRC5 и RFXANK;
- (w) CD3 δ , NLRC5 и HLA-DM;
- (x) CD3 δ , NLRC5 и Ii-цепи;
- (y) CD3 δ , TAPBP и СИТА;
- (z) CD3 δ , TAPBP и RFX5;
- (aa) CD3 δ , TAPBP и RFXAP;
- (bb) CD3 δ , TAPBP и RFXANK;
- (cc) CD3 δ , TAPBP и HLA-DM; или
- (dd) CD3 δ , TAPBP и Ii-цепи; или

(III) любого белка из следующих:

- (a) CD3 γ , B2M и СИТА;
- (b) CD3 γ , B2M и RFX5;

- (c) CD3 γ , B2M и RFXAP;
- (d) CD3 γ , B2M и RFXANK;
- (e) CD3 γ , B2M и HLA-DM;
- (f) CD3 γ , B2M и Ii-цепи;
- (g) CD3 γ , TAP1 и СИТА;
- (h) CD3 γ , TAP1 и RFX5;
- (i) CD3 γ , TAP1 и RFXAP;
- (j) CD3 γ , TAP1 и RFXANK;
- (k) CD3 γ , TAP1 и HLA-DM;
- (l) CD3 γ , TAP1 и Ii-цепи;
- (m) CD3 γ , TAP2 и СИТА;
- (n) CD3 γ , TAP2 и RFX5;
- (o) CD3 γ , TAP2 и RFXAP;
- (p) CD3 γ , TAP2 и RFXANK;
- (q) CD3 γ , TAP2 и HLA-DM;
- (r) CD3 γ , TAP2 и Ii-цепи;
- (s) CD3 γ , NLRC5 и СИТА;
- (t) CD3 γ , NLRC5 и RFX5;
- (u) CD3 γ , NLRC5 и RFXAP;
- (v) CD3 γ , NLRC5 и RFXANK;
- (w) CD3 γ , NLRC5 и HLA-DM;
- (x) CD3 γ , NLRC5 и Ii-цепи;
- (y) CD3 γ , TAPBP и СИТА;
- (z) CD3 γ , TAPBP и RFX5;
- (aa) CD3 γ , TAPBP и RFXAP;
- (bb) CD3 γ , TAPBP и RFXANK;
- (cc) CD3 γ , TAPBP и HLA-DM; или
- (dd) CD3 γ , TAPBP и Ii-цепи.

20. Способ по любому из пп. 17-19, отличающийся тем, что:

- (a) иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественного киллера (НК-клетки), естественного Т-киллера, лимфоидной клетки-предшественника,

гемопозитической стволовой клетки, стволовой клетки, макрофага и дендритной клетки;
и/или

(b) иммунная клетка представляет собой CD4+ Т-клетку или CD8+ Т-клетку;

и/или

(c) иммунная клетка представляет собой аллогенную Т-клетку или аутологичную Т-клетку.

21. Способ по любому из пп. 17-20, отличающийся тем, что:

(a) нуклеиновые кислоты вводят в иммунную клетку путем вирусной трансдукции, причем вирусная трансдукция включает приведение иммунной клетки в контакт с вирусным вектором, содержащим одну или более нуклеиновых кислот; и/или

(b) нуклеиновые кислоты вводят в иммунную клетку посредством вирусной трансдукции, причем вирусная трансдукция включает приведение иммунной клетки в контакт с вирусным вектором, содержащим одну или более нуклеиновых кислот, и, кроме того, вирусный вектор выбран из группы, состоящей из ретровирусного вектора, векторов на основе вируса Сендай, аденовирусных векторов, векторов на основе аденоассоциированного вируса и лентивирусных векторов; и/или

(c) каждая из указанных одной или более нуклеиновых кислот, способных подавлять экспрессию, содержит систему редактирования генов, выбранную из группы, состоящей из:

(i) CRISPR-ассоциированной (Cas) (CRISPR-CA) эндонуклеазной системы и направляющей РНК;

(ii) системы редактирования генов TALEN, системы редактирования генов на основе нуклеазы с мотивом "цинковый палец" (ZFN), мегануклеазной системы редактирования генов или системы редактирования генов мега-TALEN; и

(iii) системы сайленсинга генов, выбранной из антисмысловой РНК, антигомерной РНК, РНКи, миРНК или кшРНК.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что :

(a) эндонуклеаза Cas включает Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, Cas9 *S. pyogenes*, Cas9 *Staphylococcus aureus*, MAD7 или любую их комбинацию ; и/или

- (b) система CRISPR-Cas содержит вектор pAd5/F35-CRISPR; и/или
- (c) направляющая РНК содержит направляющую последовательность, комплементарную последовательности в пределах одного или более локусов генов, каждый из которых кодирует иммунологический белок, выбранный из группы, состоящей из CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, СІТА, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP и инвариантной цепи (Ii-цепи); и/или
- (d) направляющая РНК комплементарна последовательности в пределах: (1) одного или более экзонов CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ , или (2) экзона 1 CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 γ ; и/или
- (e) указанная последовательность находится в локусе гена CD3 δ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 53;
- (f) указанная последовательность находится в локусе гена CD3 ϵ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 52;
- (g) указанная последовательность находится в локусе гена CD3 γ , и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 54;
- (h) указанная последовательность находится в локусе гена B2M, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 55;
- (i) указанная последовательность находится в локусе гена СІТА, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 61;
- (j) указанная последовательность находится в локусе гена TAP1, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 56;
- (k) указанная последовательность находится в локусе гена TAP2, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 57;
- (i) указанная последовательность находится в локусе гена TAPBP, и

направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или их комбинацией;

(m) указанная последовательность находится в локусе гена NLRC5, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 60;

(n) указанная последовательность находится в локусе гена HLA-DM, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 62;

(o) указанная последовательность находится в локусе гена RFX5, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 или их комбинацией;

(p) указанная последовательность находится в локусе гена RFXANK, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 65;

(q) указанная последовательность находится в локусе гена RFXAP, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 66, или

(r) указанная последовательность находится в локусе гена Ii-цепи, и направляющая РНК содержит нуклеотидную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или их комбинацией.

23. Способ по любому из пп. 17-22, отличающийся тем, что:

(a) иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызываемым немодифицированной иммунной клеткой, введенной тому же субъекту; и/или

(b) иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта по сравнению с иммунным ответом, вызванным иммунной клеткой, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, способных подавлять экспрессию гена TRAC, B2M и СИТА; и/или

(c) иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта, причем указанный иммунный ответ представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ); и/или

(d) иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта, причем указанный иммунный ответ представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ), и, кроме того, ослабленная РТПХ направлена против клетки с несовпадающим HLA-I или против клетки с несовпадающим HLA-II; и/или

(e) иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта, причем указанный иммунный ответ представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ), причем указанная РТПХ:

(i) ослаблена приблизительно на 10% или более, приблизительно на 20% или более, приблизительно на 30% или более, приблизительно на 40% или более, приблизительно на 50% или более, приблизительно на 60% или более, приблизительно на 70% или более, приблизительно на 80% или более, приблизительно на 90% или более, или приблизительно на 95% или более; или

(ii) ослаблена приблизительно в 1 раз или более, приблизительно в 2 раза или более, приблизительно в 3 раза или более, приблизительно в 4 раза или более, приблизительно в 5 раз или более, приблизительно в 6 раз или более, приблизительно в 7 раз или более, приблизительно в 8 раз или более, приблизительно в 9 раз или более, приблизительно в 10 раз или более, приблизительно в 20 раз или более, приблизительно в 30 раз или более, приблизительно в 50 раз или более, приблизительно в 100 раз или более, приблизительно в 150 раз или более или приблизительно в 200 раз или более; и/или

(f) иммунная клетка при ее введении субъекту вызывает ослабленный иммунный ответ у указанного субъекта, причем указанный иммунный ответ представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ), и, кроме того, ослабление РТПХ за счет модифицированной иммунной клетки сравнивают с действием эквивалентной иммунной клетки, не содержащей делеции и/или инсерции в одном или более локусов генов, или иммунной клетки, содержащей делецию и/или инсерцию в TRAC, B2M и СИТА.

24. Способ по любому из пп. 17-23, отличающийся тем, что:

(a) экзогенная нуклеиновая кислота кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), причем указанный CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный

сигнальный домен; и/или

(b) экзогенная нуклеиновая кислота кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), причем указанный CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный сигнальный домен, и, кроме того, мишенью указанного антигенсвязывающего домена является опухолевый антиген:

(i) ассоциированный с гематологическим злокачественным заболеванием;

(ii) ассоциированный с солидной опухолью; и/или

(iii) выбранный из группы, состоящей из ROR1, мезотелина, c-Met, PSMA, PSCA, альфа-рецептора фолата, бета-рецептора фолата, EGFR, EGFRvIII, GPC2, GPC2, муцина 1 (MUC1), Tn-антигена ((Tn-Ag) или (GalNAc-Ser/Thr)), TnMUC1, альфа-4-рецептора семейства GDNF (GFRa4), белка активации фибробластов (FAP) и альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (ИЛ-13Ra2 или CD213A2); и/или

(c) экзогенная нуклеиновая кислота кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), причем указанный CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и внутриклеточный сигнальный домен, и, кроме того, указанный CAR содержит:

(i) антигенсвязывающий домен PSMA, костимулирующий домен CD2 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета;

(ii) антигенсвязывающий домен мезотелина, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета; или

(iii) антигенсвязывающий домен TnMUC1, костимулирующий домен CD2 и сигнальный домен CD3-дзета; и/или

(d) переключающий рецептор содержит:

(i) внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным сигналом, выбранного из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, VISG3, VSIG8, TGFβRII, VTLA и TIM-3,

(ii) трансмембранный домен, и

(iii) внутриклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с позитивным сигналом, выбранного из группы, состоящей из CD28, 4-1BB, IL12Rβ1,

IL12R β 2, CD2, ICOS и CD27; и/или

(e) доминантно-негативный рецептор содержит:

(i) укороченный вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом,

(ii) вариант белка дикого типа, ассоциированного с негативным сигналом, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и по существу не содержащий внутриклеточного сигнального домена; или

(iii) внеклеточный домен сигнального белка, ассоциированного с негативным сигналом, и трансмембранный домен; и/или

(f) переключающий рецептор выбран из группы, состоящей из PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1 и TGF β RII-IL12R β 2; и/или

(d) доминантно-негативный рецептор представляет собой доминантно-негативный рецептор PD1, VSIG3, VSIG8 или TGF β R; и/или

(h) трансмембранный домен:

(i) выбран из трансмембранного домена белка, выбранного из группы, состоящей из CTLA4, PD-1, BTLA, TGF β RII, BTLA, TIM-3, CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS и CD27; или

(ii) выбран из трансмембранного белка, ассоциированного с негативным сигналом, или трансмембранного домена белка, ассоциированного с негативным сигналом.

25. Способ по любому из пп. 17-24:

(a) отличающийся тем, что размножение модифицированной иммунной клетки включает культивирование Т-клетки с фактором, выбранным из группы, состоящей из flt3-L, ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21, TGF-бета, ИЛ-10 и лиганда c-kit; и/или

(b) дополнительно включающий введение полипептида и/или нуклеиновой

кислоты, кодирующей Klf4, Oct3/4 и Sox2, в иммунную клетку для индукции плюрипотентности иммунной клетки; и/или

(с) отличающийся тем, что иммунную клетку получают из образца крови, образца цельной крови, образца мононуклеара периферической крови (МПК) или образца для афереза; и/или

(d) отличающийся тем, что иммунную клетку получают из образца для афереза и, кроме того, образец для афереза представляет собой криоконсервированный образец; и/или

(e) отличающийся тем, что иммунную клетку получают из образца для афереза и, кроме того, образец для афереза представляет собой свежий образец; и/или

(f) отличающийся тем, что иммунную клетку получают из организма субъекта-человека.

26. Популяция модифицированных иммунных клеток, полученных способом по любому из пп. 17-25.

27. Композиция, содержащая модифицированную иммунную клетку или модифицированную Т-клетку по любому из пп. 1-16 или популяцию модифицированных иммунных клеток по п. 26 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

28. Способ лечения заболевания или патологического состояния, ассоциированного с повышенным иммунитетом, у субъекта, включающий введение эффективного количества композиции по п. 27 нуждающемуся в этом субъекту.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что:

(a) указанное состояние представляет собой рак; и/или

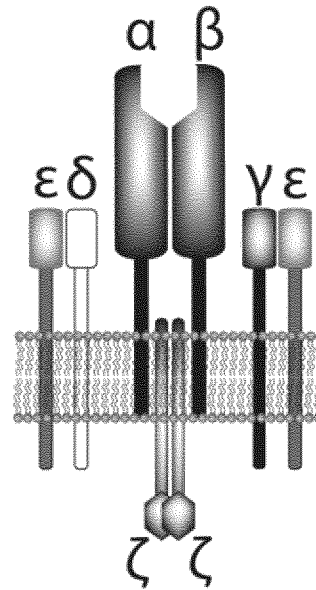
(b) указанное состояние представляет собой рак и, кроме того, указанный рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака кожи, рака поджелудочной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака почки, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака легких и любой их комбинации; и/или

(с) указанное состояние представляет собой рак, и указанный рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное заболевание.

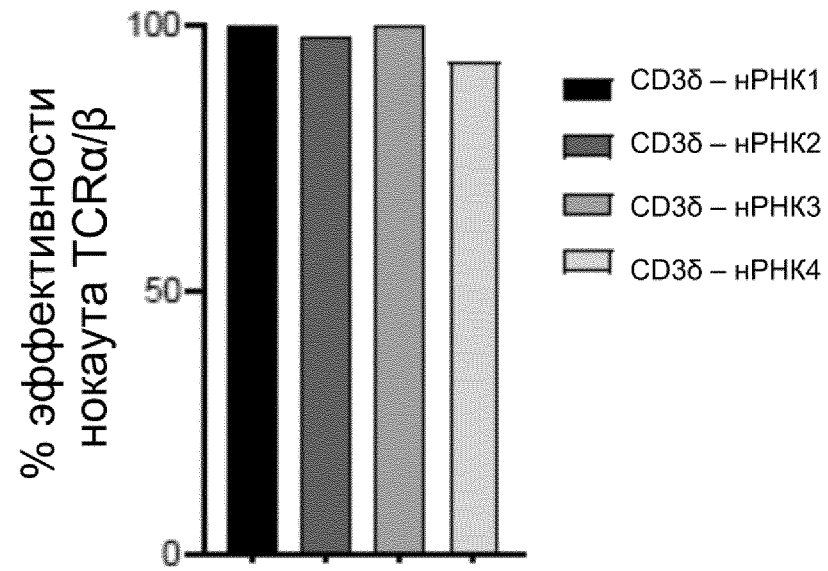
30. Способ лечения рака, включающий введение субъекту модифицированных иммунных клеток или модифицированных Т-клеток по любому из пп. 1-16, популяции модифицированных иммунных клеток по п. 26 или композиции по п. 27.
31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное заболевание.
32. Способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа по отношению к клетке-мишени или ткани-мишени у субъекта, причем указанному субъекту вводят эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей модифицированную иммунную клетку или модифицированную Т-клетку по любому из пп. 1-16, популяцию модифицированных иммунных клеток по п. 26 или композицию по п. 27.
33. Набор, содержащий модифицированные иммунные клетки по любому из пп. 1-16, популяцию модифицированных Т-клеток по п. 26 или композицию по п. 27, необязательно содержащий инструкцию по применению.

Фигура 1

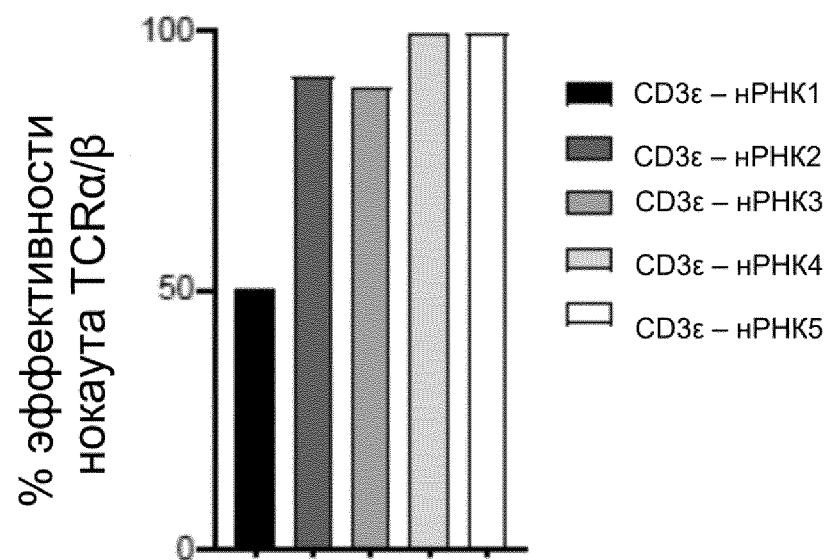
Комплекс
Т-клеточного
рецептора



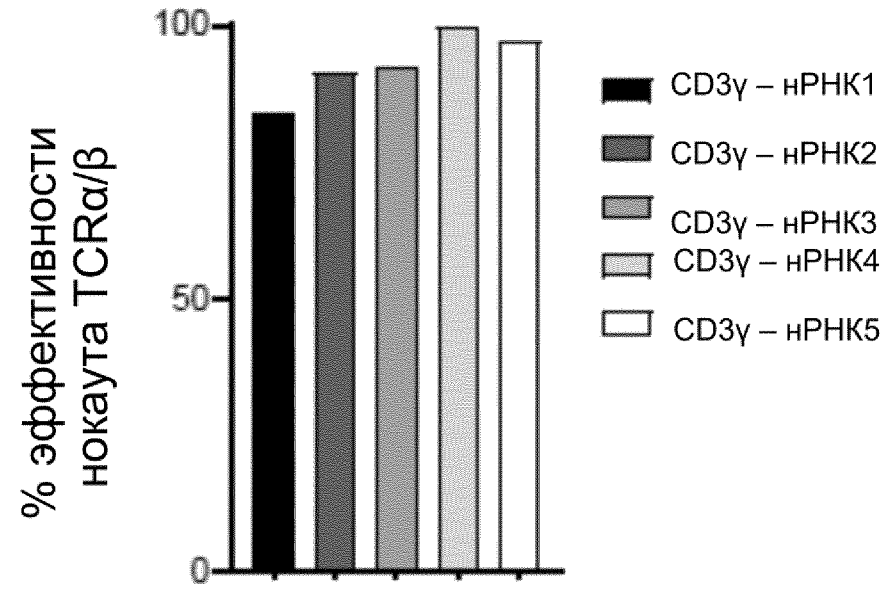
Фигура 2А



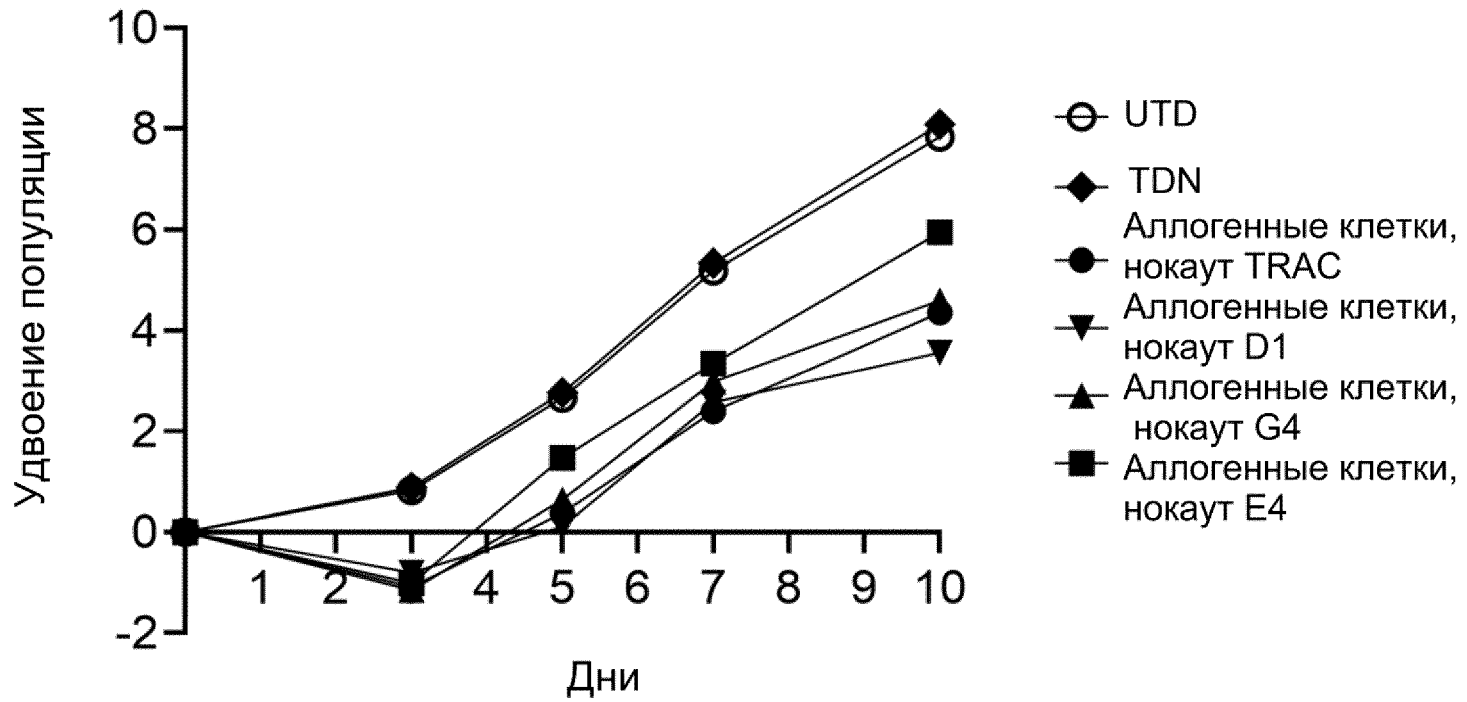
Фигура 2В



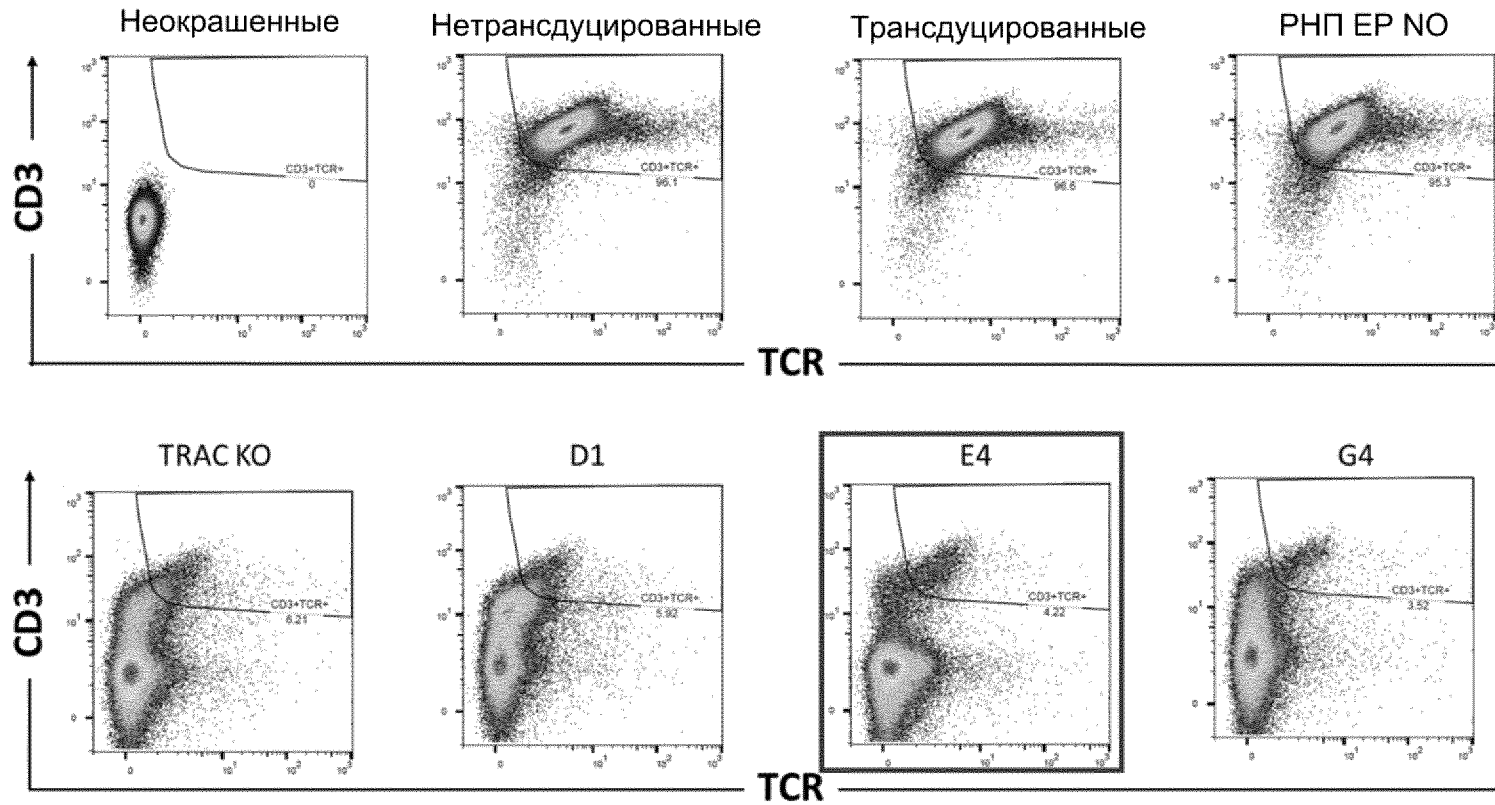
Фигура 2С



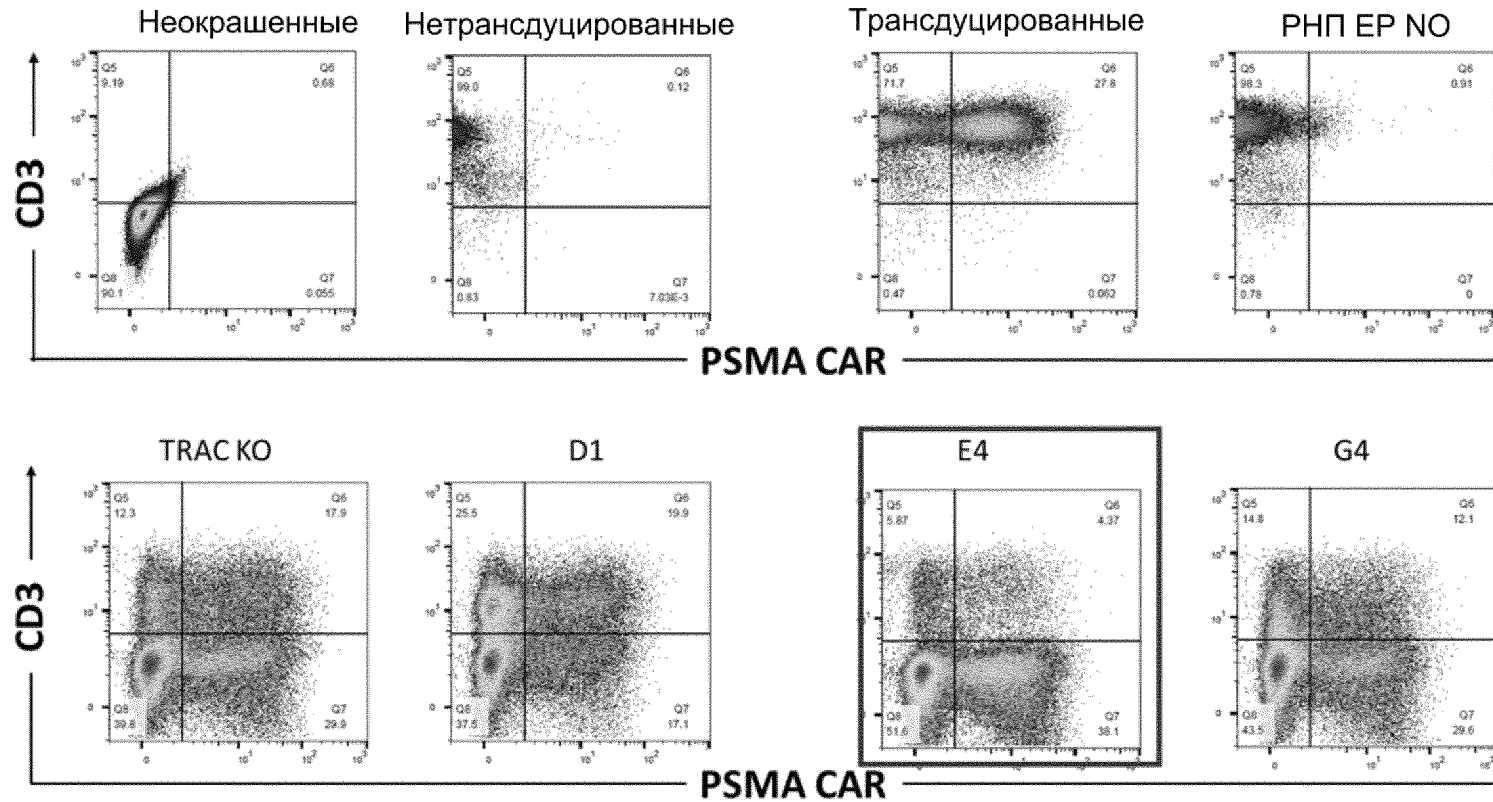
Фигура 3



Фигура 4А

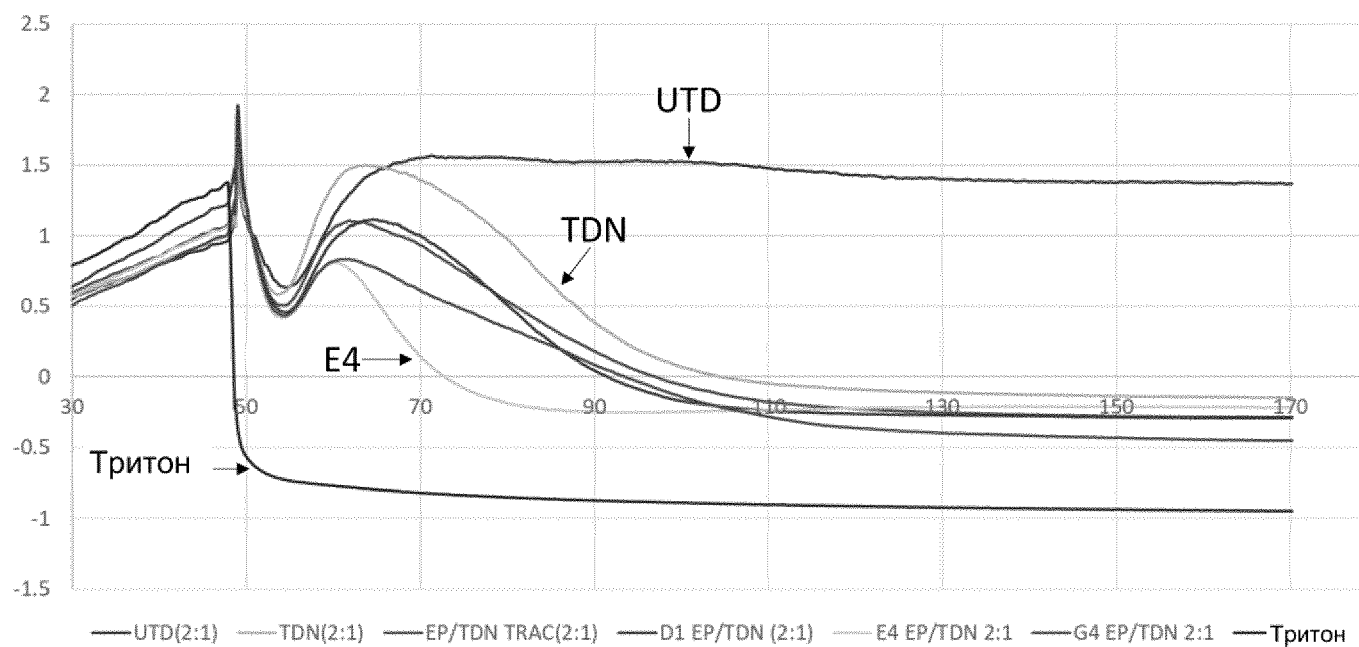


Фигура 4В

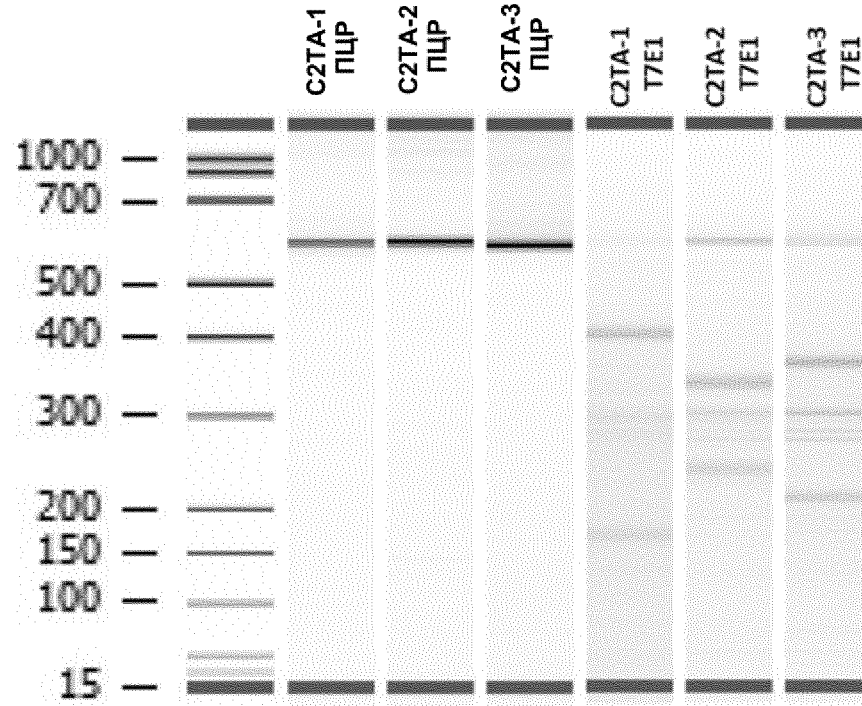


Фигура 5

Отношение эфektor-мишень 2:1

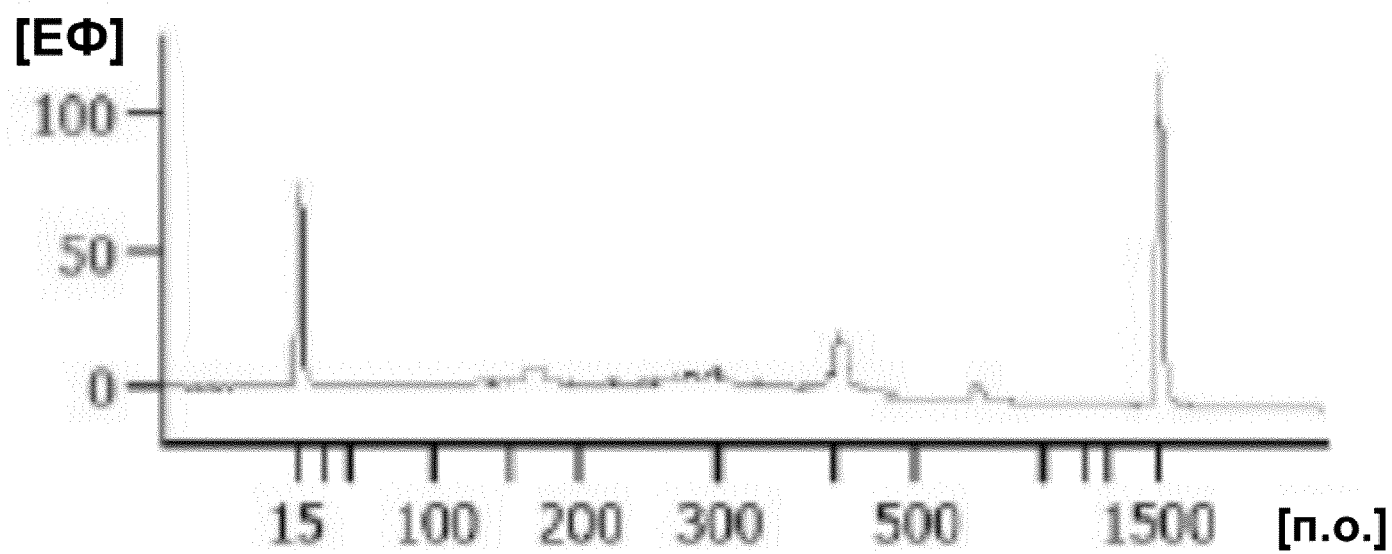


Фигура 6А



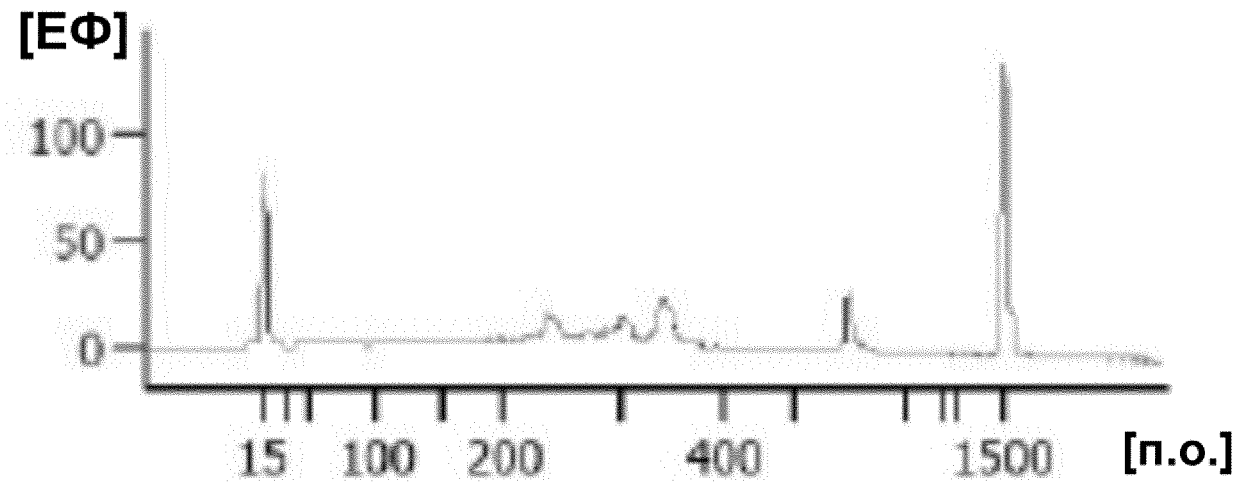
Фигура 6В

C2TA-1-T7E1



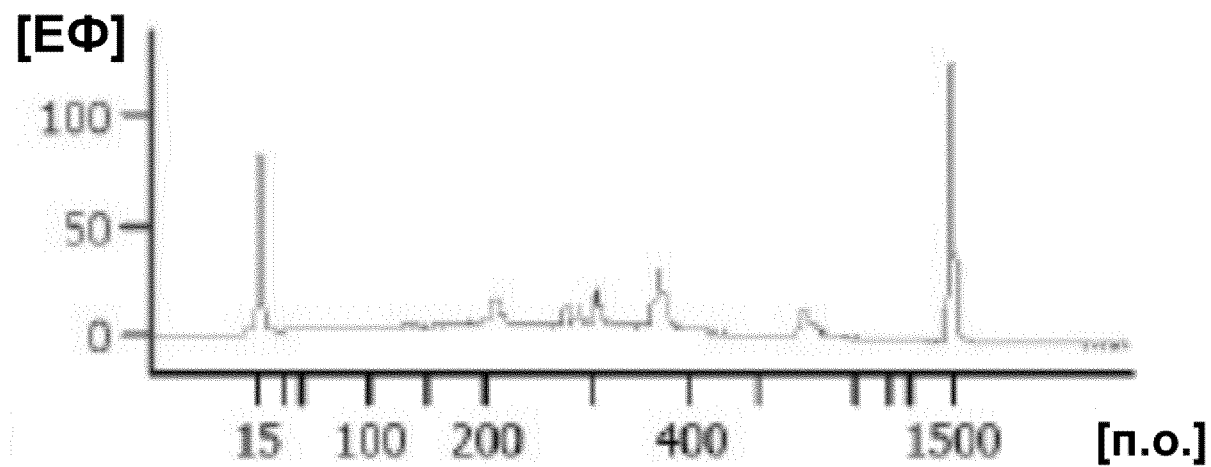
Фигура 6С

C2TA-2-T7E1

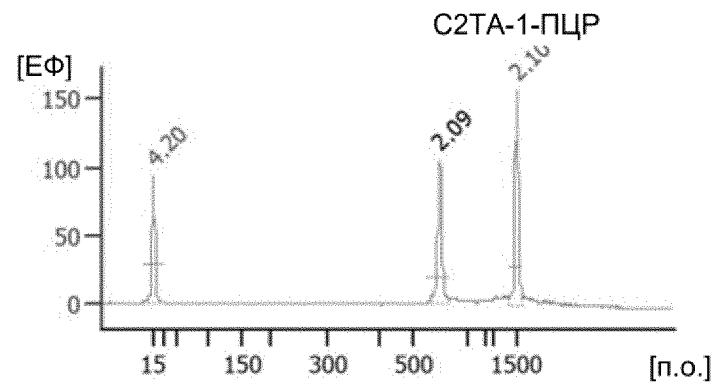


Фигура 6D

C2TA-3-T7E1



Фигура 7А



Итоги для образца 8:

C2TA-1-PCR

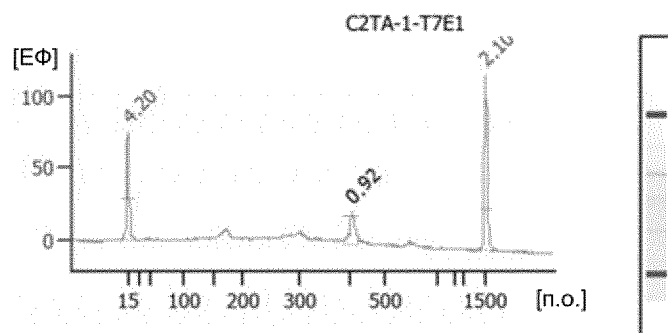
Количество найденных пиков: 1

Таблица пиков для образца 8:

C2TA-1-PCR

Пик	Размер [п.о.]	Конц. [нг/мкл]	Молярность [нмоль/л]	Наблюдения
1	15	4.20	424.2	Нижний маркер
2	598	2.09	5.3	
3	1,500	2.10	2.1	Верхний маркер

Фигура 7В



Итоги для образца 1:

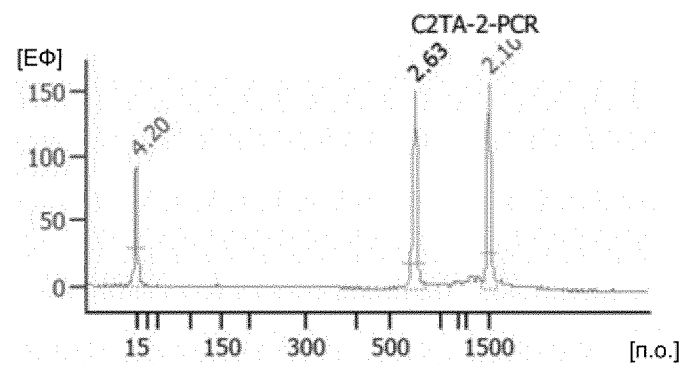
C2TA-1-T7E1

Количество найденных пиков: 1

Таблица пиков для образца 1: **C2TA-1-T7E1**

Пик	Размер [п.о.]	Конц. [нг/мкл]	Молярность [нмоль/л]	Наблюдения ns
1	15	4.20	424.2	Нижний маркер
2	405	0.92	3.4	
3	1,500	2.10	2.1	Верхний маркер

Фигура 7С



Итоги для образца 9:

C2TA-2-PCR

Количество найденных пиков:

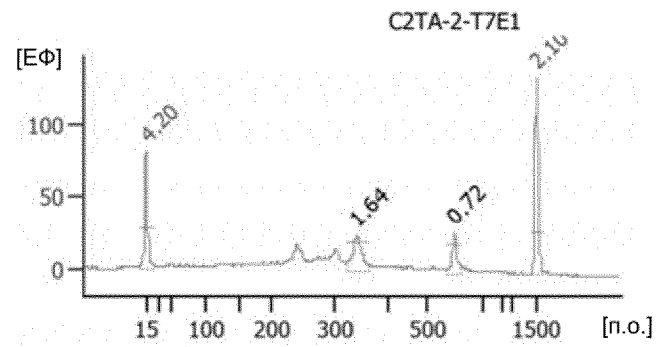
1

Таблица пиков для образца 9:

C2TA-2-PCR

Пик	Размер [п.о.]	Конц. [нг/мкл]	Молярность [нмоль/л]	Наблюдения
1	15	4.20	424.2	Нижний маркер
2	601	2.63	6.6	
3	1,500	2.10	2.1	Верхний маркер

Фигура 7D



Итоги для образца 2 :

C2TA-2-T7E1

Количество найденных пиков: 2

Таблица пиков для образца 2: **C2TA-2-T7E1**

Пик	Размер [п.о.]	Конц. [нг/мкл]	Молярность [нмоль/л]	Наблюдения
1	15	4.20	424.2	Нижний маркер
2	341	1.64	7.3	
3	598	0.72	1.8	
4	1,500	2.10	2.1	Верхний маркер

Фигура 8

