

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090046** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.05.19

(22) Дата подачи заявки
2018.06.15

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/55 (2006.01)

(54) **ПРИЦЕЛЬНАЯ БЕЗВИРУСНАЯ ВСТАВКА ДНК**

(31) **62/520,117; 62/552,180**

(32) **2017.06.15; 2017.08.30**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/037919**

(87) **WO 2018/232356 2018.12.20**

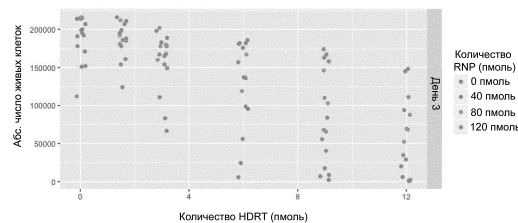
(71) Заявитель:
**ТЕ РИДЖЕНТС ОФ ТЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(72) Изобретатель:
**Рот Теодор Ли, Марсон Александр
(US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Представлены способы и композиции для редактирования генома клетки. В некоторых воплощениях в целевые участки генома клетки вставляют нуклеотидные последовательности длиной по меньшей мере в 200 нуклеотидов.

RNP + дцДНК сохраняет жизнеспособность клеток



202090046

A1

A1

202090046

ПРИЦЕЛЬНАЯ БЕЗВИРУСНАЯ ВСТАВКА ДНК

Предшествующие родственные заявки

Настоящая заявка претендует на приоритет от предварительной заявки США No. 62/520,117, поданной 15 июня 2017 г., и предварительной заявки США No. 62/552,180, поданной 30 августа 2017 г., обе из которых включены в данный документ путем отсылки во всей полноте.

Заявление о правах на изобретения, созданные при федеральной поддержке исследований и разработок

Настоящее изобретение совершалось при правительственной поддержке в виде гранта P50 GM082250 от Национальных институтов здравоохранения. Правительство имеет определенные права на это изобретение.

Уровень техники

Была разработана возможность введения небольших мутаций (инделей) в целевые сайты генома клеток путем электропорации комплекса Cas9-гРНК (RNP) в клетки. Однако, поскольку такие мутации являются случайными и вводятся посредством негомологического соединения концов, они могут вызывать нокаут белка из-за сдвига рамки (Schumann et al., PNAS 112(33): 10437-10442 (2015)). Были разработаны и другие методы введения определенных последовательностей ДНК в заданные целевые сайты в геноме путем электропорации небольших оцДНК олигонуклеотидов (ssODN), полученных путем химического синтеза. Это позволяет встраивать очень небольшие количества экзогенной ДНК (обычно от 1 пары оснований (п.о.) до 30 пар оснований (п.о.)) посредством репарации, направляемой с помощью гомологии (называемой HDR), который менее эффективен, чем негомологическое соединение концов (NHEJ), но позволяет задавать конечную последовательность. Тем не менее, поскольку размер этих олигонуклеотидов ограничен длиной ДНК, которую можно синтезировать химическим путем (примерно <200 п.н.), причем большую часть её занимают плечи для обеспечения гомологии, то этот метод не подходит для многих применений из-за ограниченного размера вставки. Помимо ограничения по размеру, хорошо известно, что электропорация в клетки голой ДНК, в частности голой ДНК размером более 200 п.н., зачастую ведет к массовой гибели клеток вследствие активации внутренних защитных механизмов в клетках (Cornu et al., Nat Med. 23: 415-423 (2017); Hornung and Latz, Nature Reviews Immunology 10: 123-130 (2010); Zhao et al., Mol. Ther. 13(1): 151-159 (2006)). Хотя для доставки больших донорских последовательностей нуклеиновых кислот в клетки применялись и невстраивающиеся

вирусные векторы типа дефектных по интегразе лентивирусных векторов или аденоассоциированных вирусных (AAV) векторов, эти векторы требуют заражения вирусом и вызывают побочные действия.

Следовательно, нужны композиции и способы для направленной вставки больших нуклеотидных последовательностей в геном клетки.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на композиции и способы редактирования генома в клетках. Авторы изобретения обнаружили, что в целевые участки генома клетки могут быть вставлены большие нуклеотидные последовательности, к примеру, последовательности длиной более 200 нуклеотидов. В некоторых способах происходит встраивание последовательностей длиной более 200 нуклеотидов, при этом уменьшаются побочные эффекты и/или снижается потеря жизнеспособности клеток.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предусмотрен способ редактирования генома клетки, который включает: а) получение комплекса рибонуклеопротеинового комплекса Cas9 (RNP) и ДНК-матрицы, включающего: (i) RNP, причем RNP включает нуклеазный домен Cas9 и направляющую РНК, причем направляющая РНК специфически гибридизуется с целевым участком генома клетки, а нуклеазный домен Cas9 расщепляет целевой участок с образованием сайта вставки в геноме клетки; и (ii) двухцепочечную или одноцепочечную ДНК-матрицу, причем размер ДНК-матрицы составляет более 200 нуклеотидов, при этом 5'- и 3'-концы ДНК-матрицы содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки, а молярное соотношение RNP к ДНК матрицы в комплексе составляет от 3:1 до 100:1; и б) введение комплекса RNP-ДНК матрицы в клетки.

В некоторых воплощениях ДНК-матрица представляет собой линейную ДНК-матрицу. В некоторых примерах ДНК-матрица представляет собой одноцепочечную ДНК-матрицу. В некоторых воплощениях одноцепочечная ДНК-матрица представляет собой чистую одноцепочечную ДНК-матрицу.

В некоторых воплощениях комплекс RNP и ДНК-матрицы образуется при инкубации RNP с ДНК-матрицей в течение от одной до тридцати мин при температуре от 20°C до 25°C. В некоторых воплощениях комплекс RNP и ДНК-матрицы и клетку смешивают перед введением комплекса RNP-ДНК матрицы в клетку.

В некоторых воплощениях RNP содержит нуклеазу Cas9. В некоторых воплощениях RNP содержит никазу Cas9. В некоторых воплощениях комплекс RNP и ДНК-матрицы содержит по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP. В некоторых воплощениях по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP содержат

структурно разные нуклеазные домены Cas9. В некоторых воплощениях по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP содержат структурно разные направляющие РНК. В некоторых воплощениях, где по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP содержат структурно разные направляющие РНК, каждый из структурно разных комплексов RNP содержит нишау Cas9, а структурно разные направляющие РНК гибридизуются с противоположными нитями целевого участка.

В некоторых воплощениях введение комплекса RNP и ДНК-матрицы в клетку включает электропорацию. В некоторых воплощениях молярное соотношение RNP к ДНК-матрице составляет от 5:1 до 15:1. В некоторых воплощениях молярное соотношение RNP к ДНК-матрице составляет от 5:1 до 10:1. В некоторых воплощениях молярное соотношение RNP к ДНК-матрице составляет от 8:1 до 12:1. В некоторых воплощениях ДНК-матрица находится в концентрации от 2,5 до 25 пМ. В некоторых воплощениях размер ДНК матрицы составляет более 1 т.н. В некоторых воплощениях количество ДНК-матрицы составляет от 1 мкг до 10 мкг.

В некоторых воплощениях комплекс RNP и ДНК-матрицы вводится в от 1×10^5 до 2×10^6 клеток. В некоторых воплощениях клетки представляют собой первичные гемопоэтические клетки или первичные гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых воплощениях первичные гемопоэтические клетки представляют собой иммунные клетки. В некоторых воплощениях иммунные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD8^+$. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD4^+CD8^+$.

Краткое описание фигур

Настоящая заявка включает в себя следующие фигуры. Фигуры предназначены для иллюстрации определенных воплощений и/или особенностей композиций и способов и в дополнение к какому-либо описанию композиций и способов. Фигуры не ограничивают объем композиций и способов, если только письменно в описании прямо не указано, что это так.

На фиг. 1 представлена низкая жизнеспособность клеток после электропорации высоких концентраций голой ДНК, необходимых для достижения рабочей эффективности редактирования в клетках.

На фиг. 2 показано, что комплексообразование ДНК-матрицы (плазмиды) и RNP при кратковременной инкубации при комнатной температуре перед добавлением клеток при электропорации уменьшает потерю жизнеспособности, которая обычно наблюдается

при электропорации некоторого количества длинной плазмидной дцДНК.

На фиг. 3 показано, что комплексообразование ДНК-матрицы (линейной двухцепочечной ДНК (дцДНК) матрицы)) и RNP при кратковременной инкубации при комнатной температуре перед добавлением клеток при электропорации уменьшает потерю жизнеспособности, которая обычно наблюдается при электропорации длинной линейной двухцепочечной ДНК.

На фиг. 4 показано, что типичное молярное соотношение RNP к ДНК-матрице в 10:1 поддерживает как эффективность встраивания, так и жизнеспособность после электропорации.

На фиг. 5 показано, что типичное молярное соотношение RNP к ДНК-матрице в 10:1 уравнивает эффекты потери жизнеспособности и эффективности и доводит до максимума количество положительных по встраиванию клеток.

На фиг. 6 показано, что типичное молярное соотношение RNP к ДНК-матрице в 10:1 обеспечивает высокую эффективность вставки больших матриц размером более 750 пар оснований.

На фиг. 7 показано, что вставка длинных ДНК-матриц все-таки может приводить к некоторому встраиванию вне мишени.

На фиг. 8 показано, что встраивание вне мишени можно уменьшить путем использования длинной одноцепочечной ДНК (оцДНК) матрицы в качестве донорской.

На фиг. 9 показано, что изложенное здесь невирусное встраивание может проводиться с помощью двух гРНК и нуклеазы Cas9 (D10A), которая предотвращает нецелевые разрывы дцДНК.

На фиг. 10A-F показано, что совместная с CRISPR/Cas9 электропорация RNP снижает вызванную дцДНК потерю жизнеспособности. **(A)** Линейная дцДНК-матрица (матрица для репарации, направляемой с помощью гомологии длиной, ~1350 п.н., нацеленная на слияние GFP с *RAB11A*, фиг. 11A), введенная при электропорации в первичные Т-клетки человека, вызывает заметную потерю жизнеспособности с увеличением количества матрицы. Электропорация такого же количества дцДНК матрицы вместе со 100 пмоль RNP неожиданно повышала жизнеспособность. **(B)** Как для плазмидных, так и для линейных матриц дцДНК добавление RNP повышало жизнеспособность после электропорации. Следует отметить, что потеря жизнеспособности не наблюдалась с короткими донорскими олигонуклеотидами (ssODNs). **(C)** RNP необходимо вводить одновременно с ДНК, чтобы наблюдалось повышение жизнеспособности. Т-клетки от каждого из двух доноров дважды подвергали электропорации с 8-часовым перерывом между электропорациями. Хотя две электропора-

ции с таким коротким промежутком вызывали высокую степень гибели клеток, введение RNP и линейной матрицы дцДНК можно проводить и по-отдельности. Однако первоначальная электропорация с RNP не повышала жизнеспособность, если электропорация ДНК-матрицы проводилась впоследствии, если сравнивать с клетками, которые сначала получали ДНК, а затем RNP. **(D-F)** Учитывая, что RNP и ДНК нужно вводить одновременно, мы проверяли, может ли дополнительная преинкубация их вместе перед электропорацией еще больше повысить жизнеспособность. Не наблюдалось различий в жизнеспособности при увеличении времени преинкубации (от 0 до 15 минут), но неожиданно, если сначала смешивали RNP и клетки, а ДНК матрицы добавляли непосредственно перед электропорацией (RNP + клетки +HDRT), то жизнеспособность повышалась **(E)**. Однако в тех лунках, где RNP и ДНК матрицы для HDR смешивали вместе перед добавлением клеток (RNP + HDRT + клетки), независимо от того, как долго преинкубировали RNP и ДНК матрицы, наблюдалось резкое повышение степени HDR (клетки GFP⁺). Жизнеспособность измеряли через 2 дня после электропорации, а экспрессию GFP – на 4-й день. На графиках **(B, D, F)** представлены данные от 2 здоровых доноров.

На фиг. 11A-F представлена разработка эффективного невирусное нацеливание большого гена. **(A)** Систематический анализ влияния условий культивирования и стимуляции клеток, состава RNP и ДНК-матриц, а также условий электропорации при 96-луночной высокопроизводительной электропорации позволил быстро оптимизировать как жизнеспособность клеток (общее количество живых клеток в культуре), так и эффективность HDR (% GFP-положительных клеток). **(B)** Схема длинной (1350 п.н.) линейной дцДНК-матрицы, кодирующей последовательность GFP, фланкированную участками, гомологичными N-концу хозяйственного гена *RAB11A* (масштаб не соблюдается). Когда возникает разрыв дцДНК на N-конце *RAB11A*, то последовательность GFP легко вводится посредством репарации, направляемой с помощью гомологии (HDR) с образованием эндогенно меченного слитого белка RAB11A-GFP. **(C)** Первичные Т-клетки человека культивировали 2 дня при различных комбинациях стимуляции Т-клеточных рецепторов (TCR) и цитокинами перед нацеленной на *RAB11A* электропорацией RNP и матрицы для HDR с последующим варьированием условий культивирования в течение 5 дней после электропорации. **(D)** Из протестированных концентраций RNP и матрицы для HDR оптимальная вставка GFP в *RAB11A* достигалась при промежуточных концентрациях реагентов. При дальнейшем тестировании (фиг. 16) оптимальные концентрации сужались до 50 пмоль RNP и 4 мкг дцДНК HDRT. **(E)** Массивное тестирование условий импульса при электропорации показало, что в целом условия, обеспечивающие большую

эффективность HDR, снижают жизнеспособность. Для оптимизации HDR был выбран EN115, сохраняя при этом достаточную жизнеспособность. (F) Используя параметры, оптимизированные в C-D, высокоэффективная вставка GFP в эндогенный ген *RAB11A* достигалась при невирусном нацеливании в первичных Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ человека. Жизнеспособность и эффективность оценивали через 3 дня (E) или 5 дней (C, D и F) после электропорации. Отдельные точки представляют индивидуальных доноров крови (C и D) или среднее значение плюс стандартное отклонение по двум отдельным донорам (E). Зеленым цветом выделены условия, выбранные в итоге для протокола невирусного нацеливания генов.

На фиг. 12A-B показано, что невирусное нацеливание генов обеспечивает быструю и эффективную генную инженерию в первичных Т-клетках человека. (A) Диаграмма временной шкалы невирусного нацеливания генов. Примерно 1 неделя требуется для разработки, заказа у коммерческих поставщиков и сборки новых комбинаций геномных реагентов для редактирования генома (гРНК вместе с матрицей для репарации, направляемой с помощью гомологии). За два дня до электропорации стимулируют первичные Т-клетки человека, выделенные из крови или различных других источников (фиг. 15). Матрицы дцДНК для HDR можно легко получить методом ПЦР с последующей очисткой методом SPRI, получая очень концентрированный продукт, пригодный для электропорации. В день электропорации смешивают гРНК, образующую комплекс с RNP, матрицу для HDR и отобранные стимулированные Т-клетки и проводят электропорацию, причем этот процесс занимает примерно полтора часа. После электропорации сконструированные Т-клетки можно без труда размножить в течение дополнительных 2 недель. (B) Жизнеспособность служит для обозначения процента живых клеток относительно эквивалентной популяции, прошедшей все стадии протокола, за исключением фактической электропорации (без контроля на электропорацию). Эмпирически установлено, что нижняя точка количества живых клеток после электропорации наступает через два дня после этого, поэтому все показатели жизнеспособности регистрировали именно в это время, если не указано иначе. Термин “эффективность” служит для обозначения процента живых клеток в культуре, экспрессирующих встроенную экзогенную последовательность (типа GFP). Наконец, общее количество клеток, положительных по требуемой вставке, рассчитывали путем умножения эффективности на абсолютное число клеток. Методологические изменения, максимизирующие эффективность, зачастую были не всегда оптимальными по общему числу положительных клеток и наоборот.

На фиг. 13A-D представлена оптимизация стимуляции первичных Т-клеток человека для невирусного нацеливания генов. (A) В течение двух дней до электропорации при-

меняли альтернативные условия стимуляции перед электропорацией. Стимуляция связанным с шариками CD3/CD28 вместе со стимуляцией коктейлем из цитокинов IL-2, IL-7 и IL-15 обеспечивала большую жизнеспособность, степень редактирования и общее число положительных клеток, чем стимуляция связанными с планшетом антителами. **(B)** Альтернативные соотношения шариков к клеткам показали, что оптимально соотношение 1:1 вместе с удалением шариков перед электропорацией. **(C)** Стимуляция CD3/CD28/CD2 не на шариках давала меньшую эффективность редактирования, чем шарик с CD3/CD28 при оптимальном соотношении. **(D)** Коммерческая среда XVivo15 обеспечивала близкую жизнеспособность, но большую эффективность редактирования по сравнению с RPMI. Интересно, что бессывороточная среда Immucult также обеспечивала высокоэффективное редактирование первичных Т-клеток CD3⁺ человека. Оценку эффективности вставки GFP (дцДНК HDRT RAB11A-GFP) и абсолютного общего количества клеток GFP⁺ проводили через 4 дня после электропорации. Две точки на 1 условие представляют значения, полученные от двух здоровых доноров крови.

На фиг. 14A-D представлена оптимизация обработки первичных Т-клеток человека после электропорации. **(A)** Электропорация Т-клеток CD3⁺ от здоровых доноров через 2 дня или 3 дня после стимуляции обеспечивала эффективное прицельное встраивание GFP. Двойная электропорация в оба дня, хотя и слегка повышала эффективность, но сильно снижала жизнеспособность, если при двух электропорациях включали ДНК матрицы (фиг. 10). **(B)** Дополнительная стимуляция CD3/CD28 после электропорации уменьшала способность к пролиферации. **(C)** Высокие дозы IL-2 после электропорации улучшали и эффективность, и жизнеспособность. Дальнейшее добавление IL-7 и IL-15, в отличие от стимуляции до электропорации (фиг. 13), не способствовало улучшению редактирования. **(D)** Плотность после культивирования почти не влияла на эффективность вставки. Оценку эффективности вставки GFP (дцДНК HDRT RAB11A-GFP) и абсолютного общего количества клеток GFP⁺ проводили через 4 дня после электропорации. Две точки на 1 условие представляют значения, полученные от двух здоровых доноров крови.

На фиг. 15A-B представлен эффективное невирусное нацеливание генов в свежих и замороженных Т-клетках, выделенных из нескольких источников. **(A)** дцДНК матрицу для RAB11A-GFP HDR вставляли как в свежие, так и в замороженные Т-клетки от двух здоровых доноров. В обоих состояниях наблюдались высокие показатели вставки GFP, свидетельствуя о применимости невирусного нацеливания генов к исследовательским или клиническим протоколам, требующим замораживания клеток. **(B)** Аналогичным образом отмечалась высокая эффективность прицельного встраивания GFP в первичных Т-клетках CD3⁺ человека, выделенных из цельной крови, остатков после афереза плазмы, а также

лейкафереза.

На фиг. 16А-В представлена оптимизация рецептуры RNP и HDR-матрицы для невирусного нацеливания генов. (А) У трех доноров появилась такая устойчивая тенденция, что электропорация возрастающих количеств дцДНК HDR-матрицы (RAB11A-GFP) постепенно снижала жизнеспособность клеток, но одновременно повышала эффективность, а промежуточные концентрации как HDR-матрицы, так и RNP, давали наибольшее общее количество клеток GFP⁺. (В) Дальнейшая серия прицельной оптимизации у трех других доноров дала оптимальную рецептуру в 4 мкг HDR-матрицы, вводимой электропорацией вместе с 50 пмоль RNP. Оценку эффективности вставки GFP и абсолютного общего числа клеток GFP⁺ проводили через 4 дня после электропорации. Множественные точки на графике (В) представляют технические повторы.

На фиг. 17А-С представлена оптимизация параметров электропорации для невирусной доставки больших матриц для HDR. (А) Представленные здесь необработанные данные суммированы на фиг. 11Е. Систематическое варьирование условий электропорации на нуклеофекторе Lonza 4D. В итоге был выбран импульсный код EN115, который постоянно был наиболее эффективным кодом при использовании буфера электропорации Lonza P3. Оптимизировали и другие альтернативные коды типа EO-148 по общему числу положительных клеток. (В) При проверочном тестировании набора условий электропорации также идентифицировали импульсный код EO-155 в буфере OMEM как умеренный по эффективности, но с высоким общим числом положительных комбинаций клеток. (С) Электропорация в общем объеме (RNP + HDRT + клетки) 24 мкл значительно способствовала жизнеспособности клеток и давала высокую эффективность. Объемы свыше 24 мкл при электропорации обычно вызывают сбои электропорации. Оценку эффективности вставки дцДНК RAB11A-GFP (А, С) либо вставки дцДНК BMTF-GFP (В) и абсолютного общего числа клеток GFP⁺ проводили через 4 дня после электропорации.

На фиг. 18А-Д представлены различные применения невирусного нацеливания генов в первичных Т-клетках человека. (А) Высокоэффективный таргетинг генома с помощью слитых с GFP конструкций может осуществляться у многих эндогенных генов в первичных Т-клетках человека с помощью безвирусных HDR-матриц и соответствующих RNP. (В) Конфокальная микроскопия живых первичных Т-клеток человека через 7 дней после электропорации указанной HDR-матрицы подтверждает специфичность таргетинга слитых белков. Отметка масштаба на каждом изображении 5 мкм. (С) Невирусное нацеливание слитых с GFP конструкций в гены *RAB11A* и *CD4* в массе первичных Т-клеток человека. Слияния с RAB11A были GFP-положительными как в клетках CD4⁺, так

и в клетках $CD8^+$, тогда как слияния с $CD4$ были положительными только в Т-клетках $CD4^+$ (репрезентативная проточная цитометрия сверху, количественные значения внизу). (D) Первичные Т-клетки человека обрабатывали для экспрессии GFP, слитого с эндогенным фактором транскрипции BATF. Через 11 дней после электропорации выделяли ядра и проводили CUT&RUN. Идентифицировали сайты взаимодействия GFP-BATF и общего взаимодействия BATF с хроматином с помощью антител против GFP или против BATF. Для оценки жизнеспособности и эффективности проводили проточную цитометрию через 4 дня после электропорации (A, C, D). Представленные данные репрезентативны как минимум для двух разных доноров.

На фиг. 19А-В представлен воспроизводимое невирусное нацеливание генов на целевые локусы. (A) Через 4 дня после электропорации одной из пяти различных матриц для GFP вместе с соответствующим RNP в первичные Т-клетки $CD3^+CD8^+$ от 6 здоровых доноров наблюдается экспрессия GFP по всем матрицам и донорам. Обратите внимание на согласованность уровней экспрессии GFP в GFP-положительных клетках у доноров по каждому из пяти локусов (выше у TUBA1B и ACTB, ниже у RAB11A и FBL с метками). (B) Графическая сводка по процентам вставки GFP в (A).

На фиг. 20А-В представлен воспроизводимое невирусное нацеливание генов у когорты здоровых доноров. (A) Проводили электропорацию дцДНК-матрицы для постоянной RAB11A-GFP HDR и RNP в оптимизированных условиях, разработанных для невирусного нацеливания генов в клетках, полученных от когорты из двенадцати здоровых доноров. Несмотря на значительную вариабельность процента вставки GFP по отдельным донорам, все достигали надежного встраивания GFP (от 22% до 57% в Т-клетках $CD8^+$). Отмечалась и некоторая экспрессия GFP в клетках при электропорации дцДНК-матрицы RAB11A-GFP HDR с нецелевым RNP для нацеливания *CXCR4* по сравнению с контролями без электропорации. (B) Сводный график процента вставки GFP из (A). У всей когорты из 12 здоровых доноров наблюдались несколько более высокие показатели экспрессии GFP в Т-клетках $CD3^+CD8^+$ (в среднем 42,0%) по сравнению с Т-клетками $CD3^+CD4^+$ (в среднем 35,2%).

На фиг. 21 представлено эндогенное маркирование транскрипционного фактора BATF для анализа охвата хроматина. Тепловые карты антител против BATF, против GFP и без антител по данным CUT&RUN, полученным из первичных популяций Т-клеток человека при электропорации слитой HDR-матрицы GFP-BATF (немаркированные клетки не подвергали электропорации). Совмещенные профили связывания CUT&RUN для каждого образца центрировали по пикам BATF из CUT&RUN в немаркированных клетках и упорядочивали по интенсивности пика BATF в немаркированных клетках.

На фиг. 22A-E представлен комбинаторное невирусное нацеливание генов. **(A)** Одновременная электропорация HDR-матриц для получения слияний RAB11A-GFP и/или RAB11A-mCherry в первичных Т-клетках человека. При одновременном введении обеих матриц выявляется отдельная популяция двойных клеток GFP⁺ mCherry⁺, что согласуется с биаллельным нацеливанием. **(B)** Потенциальные генотипы для индивидуальных клеток в квадрантах определяются по экспрессии двух флуорофоров. Наблюдаемый уровень биаллельного встраивания выше в клетках, получающих по крайней мере одно встраивание, чем ожидается случайно (фиг. 23). Отдельные точки представляют повторы, в которых варьировалась комбинация генов, кодирующих флуоресцентные белки (GFP + mCherry, GFP + BFP, mCherry + BFP), а также количество HDR-матрицы (от 3 до 6 мкг). **(C-D)** Мультиплексное встраивание HDR-матриц по двум отдельным геномным локусам в одних и тех же первичных Т-клетках человека. Проводили электропорацию 2 мкг каждой матрицы (итого 4 мкг на электропорацию) вместе с 25 пмоль каждого RNP (итого 50 пмоль). Клетки, положительные по встраиванию на одном сайте (напр., GFP⁺), имели гораздо большую вероятность встраивания на втором сайте (напр., также и mCherry⁺), чем клетки без первого встраивания. **(E)** Одновременный невирусное нацеливание генов в крупных вставках в три разных геномных локуса. Проводили электропорацию 1,5 мкг каждой матрицы (итого 4,5 мкг) вместе с 20 пмоль каждого соответствующего RNP (итого 60 пмоль). Аналогично мультиплексированию по двум сайтам, клетки, положительные по одному встраиванию (mCherry⁺ в Q-II и GFP⁺ в Q-III), имели большую вероятность второго встраивания (BFP⁺) по сравнению с клетками без него (Q-I). Клетки, положительные по двум встраиваниям (GFP⁺ и mCherry⁺, Q-IV), имели еще большую вероятность встраивания третьего гена (BFP⁺). Ниже приведена гистограмма количества клеток, положительных по одному, двум и трем флуорофорам. Все оценки флуоресценции проводили через 4 дня после электропорации. Представленные данные репрезентативны как минимум для двух разных доноров, за исключением панели E (один донор).

На фиг. 23A-G представлено моделирование и анализ биаллельного встраивания за счет HDR путем вставки нескольких флуоресцентных белков в один и тот же локус. **(A)** Возможные клеточные фенотипы при введении двух флуоресцентных белков в один и тот же локус. **(B)** Генотипы двух из этих фенотипических популяций прямо узнаваемы. Клетки без каких-либо функциональных вставок (нижний левый квадрант, генотип A) должны иметь генотип NA/NA (где NA означает аллель без HDR, включая аллели дикого типа WT и отредактированные с помощью NHEJ аллели). Двойные флуоресцентные клетки (верхний правый квадрант, генотип E) должны получить одну копию каждой матрицы (при условии аутосомного целевого локуса и без нецелевого встраивания) и иметь генотип

GFP/RFP. Однако две одиночные положительные популяции будут смешанными между клетками, гетерозиготными по HDR-вставке (генотипы В и С), или гомозиготными, но с двумя копиями одной и той же флуоресцентной матрицы (генотипы D и F). (С) Общий процент клеток с биаллельными HDR-вставками должен представлять сумму генотипов D, E и F. Хотя прямо из фенотипов определяется доля клеток с генотипом E (положительных по двум флуорофорам), но не с генотипами D и F. С применением простой вероятностной модели можно провести деконволюцию нескольких генотипов на отдельные флуоресцентные фенотипы и тем самым получить оценку истинного процента клеток, гомозиготных по HDR. (D) Анализ биаллельной HDR при перестановке различных флуорофоров, вставленных в локус RAB11A. (E-F) При биаллельном встраивании отмечалась двойная флуоресценция по целевым локусам. Хотя общий процент клеток со вставкой варьировался в зависимости от эффективности каждого целевого сайта, однако степень возрастания наблюдаемого процента гомозиготных клеток по сравнению с предсказанным случайным образом была постоянной по всем локусам. (G) Попытка встраивания трех разных флуорофоров по HDR в один и тот же локус. Поскольку возможны максимум две целевые вставки (по двум аллелям локуса; предполагая, что геном диплоидный), то не должно наблюдаться клеток, положительных по всем трем локусам (тройных положительных). Действительно, хотя наблюдается большое число встраивания одиночных флуорофоров (однократно положительных), а также клеток, положительных по различным перестановкам двух флуорофоров (двойных положительных), однако количество тройных положительных клеток было в 30 раз меньше, чем двойных положительных. Весь анализ экспрессии флуоресцентных белков методом проточной цитометрии проводили через 4 дня после электропорации. Представлено по несколько репрезентативных технических повторов от одного (E, F) или двух (D, G) здоровых доноров. На гистограммах приведено среднее значение + стандартное отклонение.

На фиг. 24A-B представлено мультиплексное встраивание, показывающее, что при встраивании по HDR в одном локусе повышается вероятность HDR в других локусах. (A) Две перестановки HDR-матриц из набора из шести дцДНК-матриц для HDR (нацеленных на RAB11A, CD4 и CLTA; каждый сайт с GFP или RFP) подвергали электропорации в T-клетки CD3⁺, выделенные от здоровых доноров. Через 4 дня после электропорации данных двух HDR-матриц вместе с двумя соответствующими им RNP по мишени определяли процент клеток, положительных для каждой матрицы, при стробировании по клеткам, положительным или отрицательным для другой матрицы. Мультиплексирование по двум матрицам не только было возможно при различных комбинациях матриц, но отсекание клеток, положительных для одной матрицы (матрица 1 + клетки), давало обогащенную

популяцию клеток, с большой вероятностью положительных для второй матрицы по сравнению с клетками, отрицательными для первой (матрица 1 – клетки, черные). По 2 мкг каждой матрицы вместе с 30 пмоль каждого ассоциированного RNP подвергали электропорации для экспериментов по двойному мультиплексированию. **(B)** Электропорация дополнительной матрицы позволяет мультиплексировать по 3 сайтам, используя различные комбинации HDR-матриц. Клетки, положительные для третьей матрицы, могут быть дополнительно обогащены путем пропускания клеток, положительных для обеих других матриц по сравнению с однократно положительными клетками. Представлены данные в виде среднего значения + стандартное отклонение от нескольких технических повторов от двух здоровых доноров.

На фиг. 25A-F показано, что никаза D10A и оцДНК HDR-матрицы уменьшают встраивание вне мишени. **(A)** Комбинации RNP Cas9 и дцДНК HDR-матрицы RAB11A-GFP подвергали электропорации в первичные Т-клетки человека. ДцДНК-матрица сама по себе или с RNP, содержащим разупорядоченную гРНК, не соответствующую никакой последовательности в геноме человека, давала небольшой, но ощутимый уровень экспрессии GFP, который заметно повышался при электропорации дцДНК матрицы вместе с гРНК, нацеленной на сайт, отличный от целевого сайта встраивания RAB11A-GFP (“нецелевой RNP” нацелен на экзон 1 *CXCR4*). **(B)** Нецелевое встраивание последовательно присутствовало в клетках от разных доноров при электропорации дцДНК-матрицы RAB11A-GFP HDR с нецелевым RNP, причем происходило меньше встраиваний вне мишени при электропорации одной лишь дцДНК-матрицы для HDR. **(C)** Варианты нуклеазы D10A (никазы) Cas9 и неактивный dCas9 значительно снижали встраивание вне мишени при использовании одной лишь внецелевой гРНК *CXCR4*, но никаза D10A (с “целевой” парой гРНК в ориентации PAM-out) приводила к эффективному встраиванию на мишени дцДНК-матрицы для HDR *RAB11A*. **(D)** Электропорация оцДНК HDR-матрицы снижала встраивание вне мишени до предела обнаружения (сравнимого с уровнем без электропорации матрицы) как без добавления нуклеазы, так и при индуцированных разрывах дцДНК вне мишени (внецелевая гРНК + Cas9). **(E-F)**. При встраивании слитого GFP на сайте RAB11A использование никазы D10A с оцДНК-матрицы HDR уменьшало HDR на мишени (встраивание GFP с целевой гРНК) по сравнению с Cas9 с дцДНК матрицы, но сильно снижало встраивание вне мишени до неощутимого уровня. Все оценки флуоресценции проводили через 4 дня после электропорации. Представленные данные репрезентативны как минимум для двух разных доноров (A и E) либо это средние значения от двух разных доноров (C, D и F) с приведенными стандартными отклонениями.

На фиг. 26A-D представлена оценка флуоресценции и количественное измерение событий встраивания вне мишени по нескольким HDR-матрицам. **(А)** Диаграмма HDR-опосредованной вставки на N-конце целевого локуса (масштаб не соблюдается). Гомологичные плечи определяют именно ту последовательность, в которую будет вставлена вставка (в данном случае GFP-метка), что способствует плавному встраиванию экзогенных последовательностей. При образовании слитого с GFP белка будет наблюдаться флуоресценция GFP в результате этого встраивания в мишень, которое зависит от того, что RNP сделает разрез рядом с сайтом встраивания. **(В)** Двухцепочечная ДНК может встраиваться через независимые от гомологии механизмы репарации в нецелевых сайтах путем случайного встраивания по возникающим разрывам в дцДНК или же по индуцированным двухцепочечным разрывам вроде сайтов нецелевых разрезов RNP. Этот эффект можно использовать для обеспечения прицельного встраивания последовательности дцДНК по желательному индуцированному разрыву дцДНК (НТИ) в стареющих типах клеток, не обладающих способностью к HDR, но важно то, чтобы встроилась вся дцДНК-матрица, включая потенциальные гомологичные плечи. В том случае, когда гомологичные плечи содержат последовательность промотора (типа для N-концевого слияния меток), эти нецелевые встраивания могут вызывать заметную экспрессию вставленной последовательности без нужной правильной вставки по HDR. **(С)** Столбики представляют реальные проценты GFP⁺ при электропорации Т-клеток CD3⁺ человека указанными компонентами. Для быстрой оценки функционального нецелевого встраивания при экспрессии флуоресцентного белка можно использовать проточную цитометрию. Повышение процента флуоресцентных клеток сверх предела обнаружения при электропорации одной лишь матрицы, вероятно, представляет собой случайное встраивание по естественным разрывам дцДНК. Не каждое встраивание вне мишени будет давать экспрессию флуоресцентного белка, но можно измерить относительные различия в функциональной нецелевой экспрессии между различными матрицами. Включение RNP, нацеленного на *CXCR4*, сильно повышает наблюдаемое нецелевое и независимое от гомологии встраивание, вероятно, через события вставки типа НТИ. Наибольшее повышение (от 1% до >30% у этого донора) происходит при электропорации правильного RNP и опосредованной HDR вставке. **(D)** Сравнение целевой экспрессии GFP (правый столбец) с функциональным нецелевым встраиванием (средний столбец) по пяти матрицам. На графике представлены средние значения экспрессии (столбики) у двух биологических доноров (точки).

На фиг. 27A-B представлена экспрессия GFP по HDR-матрицам в зависимости от матрицы гРНК. **(А)** Анализировали экспрессию GFP в первичных Т-клетках CD3⁺CD4⁺

человека от здорового донора через 7 дней после электропорации образцов дцДНК-матриц для HDR и соответствующих им гРНК, наряду с гРНК CXCR4 и контролем без RNP. Как и ожидалось с дцДНК-матрицами, при всех комбинациях наблюдалось нецелевое встраивание, но для всех гРНК и HDR-матриц самая высокая экспрессия GFP наблюдалась при целевом встраивании. **(В)** Сводка тепловых карт по данным проточной цитометрии в **(А)**. Одна HDR-матрица, а именно С-концевая метка GFP, слитая с ядерным фактором FBL, стабильно давала наибольшую внецелевую экспрессию при всех гРНК.

На фиг. 28A-D представлена эффективная HDR в первичных Т-клетках человека с использованием никазы Cas9. **(А)** Диаграмма геномного локуса, содержащего первый экзон *RAB11A*. При использовании spCas9 с одной направляющей РНК (гРНК-1) вместе с дцДНК-матрицы для HDR, встраивающей GFP в одной рамке с RAB11A сразу после старт-кодона, происходит эффективная экспрессия GFP (фиг. 11F). При использовании никазы Cas9 (вариант D10A) с двумя гРНК уменьшаются шансы разреза вне мишени. **(В-С)** Тестировали ряд одиночных гРНК, а также комбинаций двойных гРНК на эффективность вставки GFP в N-концевом локусе RAB11A. Как и ожидалось, ни одна из гРНК не проявляла заметного уровня вставки GFP при использовании Cas9 с мертвой нуклеазой (dCas9). Множество одиночных гРНК, прилегающие к разрезам у сайта вставки проявляли встраивание GFP при использовании Cas9, но не так эффективно, как гРНК-1. Никаза D10A почти не проявляла встраивания GFP с одиночными гРНК, но с несколькими комбинациями из двух гРНК проявляла эффективное встраивание GFP. Встраивание GFP наблюдалось только при тех комбинациях гРНК, в которых две последовательности PAM были направлены друг от друга (PAM-out). **(D)** Необработанные данные, представленные на фиг. 25C, свидетельствуют о меньшем уровне функционального встраивания вне мишени при электропорации нецелевой гРНК (нацеленной на CXCR4), вероятно, из-за того, что никазе D10A требуется связывание двух гРНК в непосредственной близости, чтобы вызвать разрыв дцДНК. Точки на всех панелях **(В-D)** представляют технические повторы у двух отмеченных здоровых доноров.

На фиг. 29A-H представлено снижение частоты T_{reg} и дефектная способность к подавлению T_{reg} у субъектов с двумя мутациями *IL2RA*, ведущими к потере функции. **(А)** Анализировали Т-клетки $CD3^+CD4^+$ от здорового донора и всех членов семьи, включая гетерозиготы *IL2RA* (с.530 het 1, с.800 hets 1-3), а также составные гетерозиготы у детей (Comp. Hets 1-3) с мутациями *IL2RA*, приводящими к потере функции, методом проточной цитометрии для оценки присутствия T_{reg} $CD25^{hi}CD127^{lo}$. **(В)** У здоровых доноров и одинарных гетерозигот Т-клетки $CD4^+FoxP3^+$ преимущественно представлены $CD25^{hi}CD127^{lo}$. У составных гетерозигот присутствует популяция $CD4^+FoxP3^+CD127^{lo}$, но

она не экспрессирует IL2RA. (C) Клиническое фенотипирование, проведенное по двум отдельным сайтам, подтверждает, что составные гетерозиготы имеют нормальную частоту клеток FoxP3⁺ CD127^{lo}. (D) Недостаточность поверхностной экспрессии IL2RA у составной гетерозиготы 3 привела к нарушению нисходящей сигнализации при измерении по экспрессии pStat5 после стимуляции с помощью IL-2, но не IL-7 или IL-15. (E) Вследствие неспособности отделить T_{reg} CD25^{hi} у дефектных по CD25 составных гетерозигот была установлена альтернативная стратегия стробирования для обогащения клеток FoxP3⁺ из Т-клеток CD3⁺CD4⁺ с использованием поверхностных маркеров CD127^{lo}CD45RO⁺TIGIT⁺. Представлено внутриклеточное окрашивание FoxP3 у данной популяции. (F) Хотя эти потенциальные “Tregs” CD3⁺CD4⁺CD127^{lo}CD45RO⁺TIGIT⁺ были сильно обогащены по FoxP3 и проявляли некоторую способность к подавлению при культивировании с помеченными CFSE стимулированными восприимчивыми Т-клетками (респондерами, T_{resp}) от здоровых доноров, однако клетки CD3⁺CD4⁺CD127^{lo}CD45RO⁺TIGIT⁺ от составных гетерозигот не проявляли способности к подавлению. Популяция стимулированных T_{resp} (сплошные кривые), нестимулированных T_{resp} (пунктирная кривая). (G) Коррекция любой мутации CD25 у составных гетерозигот все же оставляла бы другую мутацию, оставляя клетки в виде одинарных гетерозигот. Чтобы проверить, что такая потенциальная коррекция привела бы к некоторой степени функционального подавления, у членов семей одинарных гетерозигот с.530 и с.800 выделяли T_{regS} CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} и проверяли их способность к подавлению, как в (F). (H) На точечных графиках представлена способность к подавлению T_{reg} у клеток от здорового донора, дефектных по CD25 составных гетерозигот (F) и гетерозигот CD25^{+/-} с.530 или с.800 (G). Хотя “Tregs” CD3⁺CD4⁺CD127^{lo}CD45RO⁺TIGIT⁺ от составных гетерозигот не проявляли способности к подавлению, обычные T_{regS} CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} от одинарных гетерозиготных членов семьи проявляли некоторую способность к подавлению, что согласуется с отсутствием у них выраженного клинического фенотипа по сравнению с составными гетерозиготами.

На фиг. 30А-Е представлена коррекция моногенной аутоиммунной мутации путем невирусного нацеливания гена в первичных Т-клетках человека. (A) Трое детей в семье несут две разные мутации (с.530A>G, создающая стоп-кодон в экзоне 4 *IL2RA*; с.800delA, создающая мутацию сдвига рамки в экзоне 8 *IL2RA*, что вызывает набегание почти 100 аминокислот) *IL2RA* (кодирует высокоаффинный рецептор IL-2, CD25). (B) Эти три составные гетерозиготные потомка проявляют значительное, но не совсем полное снижение экспрессии IL2RA на клеточной поверхности своих первичных Т-клеток. Невирусное нацеливание гена при мутации с.530 путем электропорации RNP Cas9 и

дцДНК-матрицы для HDR, содержащей правильную последовательность *IL2RA* (вместе с глушащей мутацией в целевой последовательности PAM), успешно спасало экспрессию *IL2RA* на клеточной поверхности у части Т-клеток от каждого составного гетерозиготного потомка через 2 дня после электропорации. **(C)** Через 7 дней после невирусного нацеливания гена данные Т-клетки проявляли повышение уровня фосфорилирования Stat5 при стимуляции IL-2 по сравнению с нецелевым контролем. **(D)** Через 9 дней после невирусного нацеливания гена для коррекции мутации с.530, Т-клетки *IL2RA*⁺ от трех составных гетерозиготных доноров имеют повышенный уровень клеток FoxP3⁺ по сравнению с нецелевыми клетками или клетками здоровых доноров. **(E)** Невирусное нацеливание гена и коррекция мутации с.530 возможны и эффективны при использовании оптимизированного набора терапевтических реагентов (никаза D10A вместе с оцДНК-матрицы для HDR). Т-клетки от одного составного гетерозиготного донора окрашивали на поверхностную экспрессию *IL2RA* после 9-дневной экспансии *ex vivo* после электропорации (через 2 дня после повторной стимуляции).

На фиг. 31A-D представлена идентификация составных гетерозиготных мутаций в *IL2RA* и разработка нацеленных на геном корректирующих реагентов CRISPR-Cas9. **(A)** Первоначальное генетическое тестирование пробанда с использованием своей собственной мультигенной панели из более чем 40 генов, задействованных в моногенных формах диабета, для прицельного секвенирования методами следующего поколения было отрицательным. Последующее секвенирование экзона у троицы из пробанда и родителей выявило две вызывающие его мутации в гене *IL2RA*. У матери была одна гетерозиготная мутация (с.530G>A) в экзоне 4 *IL2RA* (SEQ ID NO: 1) (AGACAAGGTRGACCCAGCC), создающая преждевременный стоп-кодон. **(B)** У отца была одна гетерозиготная мутация (с.800delA) в экзоне 8 *IL2RA* (SEQ ID NO: 2) (ACAGGAGGARRRKWRRARAA), которая образует мутацию со сдвигом рамки, что вызывает набегание 95 аминокислот. Секвенирование по Сэнгеру подтвердило, что пробанд является составной гетерозиготой по обеим мутациям. **(C)** Линейное изображение белка *IL2RA*, аннотированное приблизительной локализацией двух идентифицированных мутаций *IL2RA*. SD1, домен sushi-1; SD2, домен sushi-2; TM, трансмембранный; C, цитоплазматический. **(D)** Для разработки нацеленных на геном реагентов CRISPR-Cas9 для коррекции этих двух мутаций *IL2RA* использовали геномные последовательности, содержащие указанные мутации ((SEQ ID NO: 3 (CAAAA TGACCCACGGGAAGACAAGGTAGACCC) для аллеля с.530G>A и SEQ ID NO: 4 (GACT TTGTTACACCACTACAGGAGGAGAGTA) для аллеля с.800delA)). Разработали гРНК для получения разреза рядом с сайтом каждой мутации, на расстоянии 8 п.н. для мутации с.530 и 7 п.н. для с.800. Разработали HDR-матрицы для каждой мутации ((SEQ ID NO: 5

(ACAAGATGGACCC) для мутации с.530 и SEQ ID NO: 6 (AGGAGAAAGAGTA) для с.800)), содержащие исправленную последовательность, а также молчащую мутацию в вырожденном основании для разрушения последовательности PAM (“NGG”) для каждой направляющей РНК. Представлена исправленная аллель + молчащие разрушающие PAM последовательности для с.530 (CAAAATGACCCACGGGAAGACAAGATGGACCC) (SEQ ID NO: 7) и с.800 (SEQ ID NO: 8) (GACTTTGTTACACCACTACAGGAGAAAGAGTA). Приведены области генома (масштаб не соблюдается) для сайта мутации с.530 (hg38 ch10:6021526-6021557) и сайта мутации с.800 (hg38 ch10: 6012886-6012917). Использовали как HDR-матрицы типа ssODN (оцДНК с гомологическими плечами в 60 п.н.), так и HDR-матрицы типа дцДНК или оцДНК большого размера (как показано, с гомологическими плечами в ~300 п.н.).

На фиг. 32А-С представлена опосредованная HDR коррекция мутации с.530A>G, приводящая к потере функции IL2RA. **(А)** В отличие от гРНК, нацеленной на мутацию с.800delA на С-конце IL2RA, гРНК, нацеленная на мутацию с.530A>G (вызывающую стоп-кодон во внутреннем экзоне), приводит к существенному (~90%) нокдауну IL2RA у здорового донора и одинарных гетерозигот (с.800, Het 2 и 3) через 2 дня после электропорации одного лишь RNP (синие) в Т-клетки CD3⁺. Хотя нокдаун начинался с очень небольшого процента IL2RA⁺, он также наблюдался у всех трех составных гетерозигот, возможно, потому что какое-то небольшое количество белка может экспрессироваться на поверхности из аллеля с.800delA. Это снижение экспрессии CD25 может частично устраняться при включении HDR-матрицы типа ssODN и еще более существенно с помощью большой дцДНК-матрицы HDR. Оба типа матриц содержали исправленную последовательность, глушащую мутацию для удаления последовательности PAM из гРНК, а также гомологические плечи длиной в 60 п.н. (ssODN) или ~300 п.н. (большая дцДНК) (фиг. 32). В отличие от воздействия на мутацию с.800delA для коррекции, поверхностная экспрессия CD25 в Т-клетках от составных гетерозигот наблюдается только при включении HDR-матрицы. У всех трех составных гетерозигот HDR-матрица из дцДНК давала больший процент клеток CD25⁺. **(В)** Усиление сигнализации pStat5 в ответ на стимуляцию IL-2 (200 ед./мл) через 7 дней после электропорации в Т-клетках CD3⁺ от составных гетерозиготных пациентов, проходящих опосредованную HDR коррекцию мутаций, по сравнению с контролями без электропорации или только с RNP. **(С)** Также наблюдается возрастание доли клеток CD25⁺ FoxP3⁺ через 9 дней после электропорации в условиях HDR-коррекции у составных гетерозиготных пациентов. Меньший процент коррекции наблюдался при нацеливании на мутацию с.530 для HDR-коррекции у составной гетерозиготы 3, возможно, вследствие

измененного состояния клеток в связи с заболеванием пациента или с режимом иммунодепрессивного препарата пациента. Электропорацию проводили в соответствии с оптимизированным протоколом невирусного нацеливания генома, изложенным в примерах. Для электропорации ssODN подвергали электропорации 100 пмоль в 1 мкл H₂O.

На фиг. 33А-С представлена не опосредованная HDR коррекция мутации со сдвигом рамки с.800delA с потерей функции IL2RA. (А) Гистограммы поверхностной экспрессии CD25 в Т-клетках CD3⁺ у всех детей из семьи, несущей две мутации *IL2RA* с потерей функции, включая три составных гетерозиготы, экспрессирующие минимальное количество IL2RA на своей поверхности (без электропорации, серые). Через 2 дня после электропорации RNP, содержащего гРНК против сайта одной из двух мутаций – делеции одной пары оснований в последнем экзоне IL2RA (с.800delA), вызывающей пробегание после нормального стоп-кодона, Т-клетки CD3⁺ от здорового донора и одинарных гетерозигот (с.800, Het 2 и 3) проявляют небольшое увеличение клеток CD25⁻ (только RNP, синие). Низкий нокаут может быть обусловлен нацеливанием гРНК на С-конец белка, где небольшие индели могут вызывать менее выраженную потерю поверхностной экспрессии белка. Неожиданно RNP сам по себе вызывал поверхностную экспрессию CD25 почти у 50% прошедших редактирование Т-клеток у всех трех составных гетерозигот. Повышение процента клеток с коррекцией CD25 по сравнению с одним лишь RNP может достигаться путем включения последовательности ssODN HDR-матрицы с коррекцией мутации (RNP +ssODN, пурпурные) и еще больше повышаться при использовании более длинной дцДНК-матрицы для HDR для коррекции мутации (RNP + дцДНК HDRT, зеленые) (фиг. 32). (В) Сигнализация фосфо-Stat5 в ответ на стимуляцию высокой дозой IL-2 (200 ед./мл) в прошедших редактирование Т-клетках CD3⁺ после 7-дневной экспансии после электропорации. Возрастание числа клеток pStat5⁺ коррелирует с усилением поверхностной экспрессии CD25 в (А). (С) После 9-дневной экспансии после электропорации внутриклеточное окрашивание на FoxP3 выявляет резкое возрастание доли клеток CD25⁺ FoxP3⁺ среди Т-клеток CD3⁺ по сравнению с контролем без электропорации, приближаясь к доли клеток CD25⁺ FoxP3⁺ у здорового донора при аналогичном культивировании. Электропорацию проводили в соответствии с оптимизированным протоколом невирусного нацеливания на геном (Примеры). Для электропорации ssODN электропорировали 100 пмоль в 1 мкл H₂O.

На фиг. 34А-В представлено снижение потенциала HDR и изменение клинического фенотипа у пациента типа составной гетерозиготы с потерей функции IL2RA, получающего иммунодепрессанты. (А) Проточнотометрический анализ экспрессии GFP через 6 дней после электропорации в Т-клетки CD3⁺ от указанных пациентов дцДНК-

матрицы RAB11A-GFP HDR в качестве положительного контроля показал снижение экспрессии GFP у трех составных гетерозигот по сравнению с их двумя гетерозиготными потомками с.800. По сравнению с когортой из 12 здоровых доноров, отредактированных таким же образом (фиг. 20), гетерозиготы с.800, равно как и составные гетерозиготы 1 и 2 попадали в общий диапазон, наблюдаемый у здоровых доноров, тогда как у составной гетерозиготы 3 была более низкая экспрессия GFP, чем у любого здорового донора. Отметим, что хотя у составной гетерозиготы 3 опосредованная HDR коррекция мутации с.530 была существенно ниже, чем у двух других составных гетерозигот (фиг. 31A), поверхностная экспрессия CD25 после электропорации одного лишь RNP, нацеленного на с.800delA, была похожей. В отличие от опосредованной HDR репарации, опосредованная NHEJ коррекция сдвига рамки при с.800delA может и не требовать пролиферации клеток, согласуясь с тем, что составная гетерозигота 3 была единственным пациентом из составных гетерозигот на активных иммунодепрессантах во время взятия крови и выделения Т-клеток. **(В)** Измененное состояние клеток в связи с болезнью пациента также могло способствовать снижению показателей HDR. В нередктированных Т-клетках CD4⁺, выделенных от каждого указанного пациента, измеряли уровни экспрессии TIGIT и CTLA4 методом проточной цитометрии. Согласуясь с изменением состояния активации, клетки от составной гетерозиготы 3 имели особый фенотип с повышенной экспрессией TIGIT и CTLA4 по сравнению как со здоровыми донорами, гетерозиготными членами семейства, так и с двумя другими составными гетерозиготными потомками.

На фиг. 35A-B представлено несколько способов получения длинных оцДНК-матриц для HDR. **(А)** Если можно получить достаточно большое количество длинной одноцепочечной последовательности ДНК для электропорации, то встраивание вне мишени можно уменьшить без чрезмерного снижения эффективности попадания в мишень. Один способ включает избирательное расщепление экзонуклеазой в две стадии, при котором специфически разрушается одна нить продукта ПЦР, помеченного путем 5'-фосфорилирования, которая легко добавляется на праймер для ПЦР перед амплификацией. **(В)** Также применим и второй способ получения оцДНК, основанный на последовательной реакции транскрипции *in vitro* (IVT) и обратной транскрипции (RT). Продукт ПЦР с добавленным коротким промотором T7 служит матрицей для IVT и получения продукта оцРНК. После отжига RT-праймера и обратной транскрипции образуется гибрид РНК/ДНК, который можно легко трансформировать в длинную матрицу оцДНК путем инкубации в гидроксиде натрия (избирательно разрушает нить РНК). **(С)** Через 2 дня после электропорации жизнеспособность Т-клеток CD3⁺ при электропорации только матрицей из оцДНК была выше, чем при электропорации только матрицей из дцДНК (фиг. 11). **(D)** HDR-матрица

оцДНК RAB11A-GFP проявляла высокую эффективность встраивания GFP, близкую к матрицам из дцДНК, и сохраняла высокую эффективность встраивания и при более высоких молярных количествах матрицы, возможно, вследствие повышенной жизнеспособности (С), а также меньшей массы на 1 моль ДНК матрицы. Индивидуальные точки представляют как минимум двух здоровых доноров (С, D).

Определения

В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и значения множественного числа, если из контекста четко не следует иначе.

Термин “нуклеиновая кислота” или “нуклеотид” относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Если нет особых ограничений, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают такими же свойствами связывания, как и эталонная нуклеиновая кислота, и подвергаются метаболизму таким же образом, как и встречающиеся в природе нуклеотиды. Если не указано иначе, определенная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно охватывает и её консервативно модифицированные варианты (напр., вырожденные замены кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также явно указанные последовательности. В частности, вырожденные замены кодонов могут быть получены путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменено на остатки смешанных оснований и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). Термин нуклеиновая кислота применяется взаимозаменяемо с геном, кДНК и мРНК, кодируемой геном.

Термин “ген” может относиться к сегменту ДНК, задействованному в выработке или кодировании полипептидной цепи. Он может включать участки, предшествующие и следующие за кодирующей областью (лидерные и трейлерные), а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами). С другой стороны, термин “ген” может относиться к сегменту ДНК, задействованному в выработке или кодировании нетранслируемой РНК типа рРНК, тРНК, направляющей РНК (напр., небольшой направляющей РНК) или микроРНК.

“Лечение” относится к любым признакам успеха в лечении или улучшении или предотвращении заболевания, состояния или расстройства, включая любые объективные или субъективные параметры типа ослабления; ремиссии; уменьшения симптомов или

улучшения состояния заболевания для пациента; замедления скорости дегенерации или ухудшения; или делаая конечную точку дегенерации менее изнурительной. Лечение или улучшение симптомов может основываться на объективных или субъективных параметрах, включая результаты обследования у врача. Соответственно, термин “лечение” включает введение соединений или агентов по настоящему изобретению для предотвращения или замедления, облегчения или остановки или торможения развития симптомов или состояний, связанных с заболеванием, состоянием или расстройством, как описано здесь. Термин “терапевтический эффект” относится к уменьшению, устранению или предотвращению заболевания, симптомов заболевания или побочных эффектов заболевания у субъекта. “Лечить” или “лечение” с помощью способов настоящего изобретения включает предотвращение возникновения симптомов у субъекта, который может подвергаться повышенному риску заболевания или расстройства, связанного с заболеванием, состоянием или расстройством, как описано здесь, но еще не испытывает или не проявляет симптомов, торможение симптомов заболевания или расстройства (замедление или остановка его развития), обеспечение облегчения симптомов или побочных эффектов заболевания (включая паллиативное лечение) и снятие симптомов заболевания (вызывая регрессию). Лечение может быть профилактическим (для предотвращения или замедления возникновения заболевания или для предотвращения проявления его клинических или субклинических симптомов) или терапевтическим подавлением или ослаблением симптомов после проявления заболевания или состояния. Термин “лечение” в настоящем изобретении включает превентивное (напр., профилактическое), лечебное или паллиативное лечение.

“Промотор” определяется как одна или несколько контрольных последовательностей нуклеиновой кислоты, направляющих транскрипцию нуклеиновой кислоты. В настоящем изобретении промотор включает необходимые последовательности нуклеиновой кислоты возле сайта начала транскрипции типа, в случае промотора полимеразы II типа, элемента ТАТА. Промотор необязательно также включает дистальные элементы – энхансеры или репрессоры, которые могут находиться на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции.

“Полипептид”, “пептид” и “белок” применяются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимеров из аминокислотных остатков. В настоящем изобретении эти термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая полноразмерные белки, причем аминокислотные остатки соединяются ковалентными пептидными связями.

В настоящем изобретении термин “комплементарный” или “комплементарность” относится к специфическому спариванию оснований между нуклеотидами или нуклеиновыми кислотами. Комплементарными нуклеотидами являются, как правило, А и Т (либо А

и U), G и C.

В настоящем изобретении под субъектом подразумевается индивид. Например, субъектами являются млекопитающие типа приматов, в частности, человек. Субъектами являются и другие приматы. Термин субъект включает домашних животных, таких как кошки, собаки и т.д., домашний скот (к примеру, крупный рогатый скот, лошади, свиньи, овцы, козы и т.д.) и лабораторных животных (к примеру, хорьки, шиншиллы, мыши, кролики, крысы, песчанки, морские свинки и др.). Так, при этом предусмотрены ветеринарные применения и медицинские применения и лекарственные формы. Термин не обозначает определенный возраст или пол. Так, он охватывает взрослых и новорожденных субъектов, будь то мужчин или женщин. В настоящем изобретении пациент или субъект может применяться взаимозаменяемо и может относиться к субъекту, страдающему заболеванием или расстройством.

Система “CRISPR/Cas” относится к широко распространенному классу бактериальных систем для защиты от чужеродной нуклеиновой кислоты. Системы CRISPR/Cas встречаются у широкого круга зубактериальных и архейных организмов. Системы CRISPR/Cas включают подтипы I, II и III типа. Системы CRISPR/Cas типа II дикого типа используют РНК-зависимую нуклеазу Cas9 в комплексе с направляющей и активирующей РНК для распознавания и расщепления чужеродной нуклеиновой кислоты. В данной области также известны направляющие РНК, обладающие активностью как направляющей, так и активирующей РНК. В некоторых случаях такие направляющие РНК двойного действия называют малой направляющей РНК (sgRNA).

Гомологи Cas9 встречаются у широкого круга зубактерий, включая, без ограничения, бактерии следующих таксономических групп: *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes-Chlorobi*, *Chlamydiae-Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* и *Thermotogae*. Типичным белком Cas9 является белок Cas9 *Streptococcus pyogenes*. Описаны и другие белки Cas9 и их гомологи, напр., в Chylinski et al., RNA Biol. 2013 May 1, 10(5): 726-737; Nat. Rev. Microbiol. 2011 June, 9(6): 467-477; Hou et al., Proc Natl Acad Sci. USA. 2013 Sep 24, 110(39):15644-9; Sampson et al., Nature 2013 May 9, 497(7448):254-7; и Jinek et al., Science 2012 Aug 17, 337(6096):816-21. Нуклеазный домен Cas9 может быть оптимизирован для эффективной активности или повышенной стабильности в клетках хозяина.

В настоящем изобретении термин “Cas9” относится к РНК-опосредованной нуклеазе (напр., бактериального или архейного происхождения либо их производным). Типичные РНК-опосредованные нуклеазы включают вышеупомянутые белки Cas9 и их гомологи, включая, без ограничения, CPF1 (напр., см. Zetsche et al., Cell, Volume 163, Issue

3, p759-771, 22 October 2015). Точно так же в настоящем изобретении термин “рибонуклеопротеиновый комплекс Cas9” и подобные относятся к комплексам между белком Cas9 и crРНК (напр., направляющей РНК или малой направляющей РНК), белком Cas9 и транс-активирующей crРНК (tracrРНК), белком Cas9 и небольшой направляющей РНК либо их комбинациям (напр., комплексам, содержащим белок Cas9, tracrРНК и гидовую crРНК).

В настоящем изобретении выражение “редактирование” в контексте редактирования генома клетки означает индуцирование структурного изменения в последовательности генома в целевом участке генома. Например, редактирование может принимать форму вставки нуклеотидной последовательности в геном клетки. Нуклеотидная последовательность может кодировать полипептид или его фрагмент. Такое редактирование может проводиться путем индуцирования двухцепочечного разрыва в целевом участке генома или пары одноцепочечных надрезов на противоположных нитях и фланкирования целевого участка генома. Способы индуцирования одно- или двухцепочечных разрывов в целевом участке генома или внутри него включают использование нуклеазного домена Cas9 или его производного и направляющей РНК либо пары направляющих РНК, направленных на целевой участок генома.

В настоящем изобретении выражение “введение” в контексте введения комплекса RNP и ДНК-матрицы означает транслокацию комплекса RNP и ДНК-матрицы извне клетки внутрь клетки. В некоторых случаях введение означает транслокацию комплекса RNP и ДНК-матрицы извне клетки внутрь ядра клетки. Предусмотрены различные способы такой транслокации, включая, без ограничения, электропорацию, контакт с помощью нанопроволоки или нанотрубок, опосредованную рецепторами интернализацию, транслокацию при помощи проникающих в клетку пептидов, опосредованную липосомами транслокацию и т.п.

В настоящем изобретении выражение “гетерологичный” означает то, что обычно не встречается в природе. Термин “гетерологичная последовательность” означает последовательность, которая обычно не встречается в данной клетке в природе. При этом гетерологичная нуклеотидная или белковая последовательность может быть: (а) чужеродной для клетки своего хозяина (т.е. экзогенной для клетки); (b) встречаться естественным образом в клетках хозяина (т.е. быть эндогенной), но присутствовать в неестественном количестве в клетке (т.е. в большем или меньшем количестве, чем в естественном состоянии в клетках хозяина); или (с) встречаться естественным образом в клетках хозяина, но располагаться вне своего естественного локуса.

В настоящем изобретении выражение “первичные” в контексте первичных клеток

или первичных стволовых клеток относится к клеткам, которые не были трансформированы или иммортализованы. Такие первичные клетки можно культивировать, субкультивировать или пассировать ограниченное количество раз (напр., культивировать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз). В некоторых случаях первичные клетки адаптированы к условиям культивирования *in vitro*. В некоторых случаях первичные клетки выделены из организма, системы, органа или ткани, необязательно сортированы и используются непосредственно без культивирования или субкультивирования. В некоторых случаях первичные клетки стимулируются, активируются или подвергаются дифференцировке. Например, первичные Т-клетки могут активироваться при контакте с (напр., при культивировании в присутствии) CD3, агонистами CD28, IL-2, IFN- γ либо их комбинацией.

В настоящем изобретении выражение “гемопозитические стволовые клетки” относится к типу стволовых клеток, которые могут образовывать клетки крови. Гемопозитические стволовые клетки могут давать начало клеткам миелоидных или лимфоидных линий либо их комбинациям. Гемопозитические стволовые клетки преимущественно встречаются в костном мозге, хотя их можно выделить из периферической крови либо её фракции. Для идентификации, сортировки или очистки гемопозитических стволовых клеток можно использовать различные маркеры клеточной поверхности. В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки идентифицируют как kit^+ и lin^- . В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки человека идентифицируют как $CD34^+$, $CD59^+$, $Thy1/CD90^+$, $CD38^{lo/-}$, $C-kit/CD117^+$, lin^- . В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки человека идентифицируют как $CD34^-$, $CD59^+$, $Thy1/CD90^+$, $CD38^{lo/-}$, $C-kit/CD117^+$, lin^- . В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки человека идентифицируют как $CD133^+$, $CD59^+$, $Thy1/CD90^+$, $CD38^{lo/-}$, $C-kit/CD117^+$, lin^- . В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки мыши идентифицируют как $CD34^{lo/-}$, $SCA-1^+$, $Thy1^{+/lo}$, $CD38^+$, $C-kit^+$, lin^- . В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки представляют собой $CD150^+CD48^-CD244^-$.

В настоящем изобретении выражение “гемопозитические клетки” относится к клеткам, происходящим из гемопозитических стволовых клеток. Гемопозитические клетки могут быть получены путем выделения из организма, системы, органа или ткани (напр., крови или её фракции). С другой стороны, можно выделить гемопозитические стволовые клетки и получить гемопозитические клетки путем дифференцировки стволовых клеток. Гемопозитические клетки включают клетки с ограниченным потенциалом к дифференцировке в другие типы клеток. Такие гемопозитические клетки включают, без ограничения, мультипотентные клетки-предшественники, линейно-специфические клетки-

предшественники, общие предшественники миелоидных клеток, предшественники гранулоцитов-макрофагов или предшественники мегакариоцитов-эритроидных клеток. Гемопозэтические клетки включают клетки лимфоидных и миелоидных линий, как-то лимфоциты, эритроциты, гранулоциты, моноциты и тромбоциты. В некоторых воплощениях гемопозэтические клетки представляют собой иммунные клетки, как-то Т-клетки, В-клетки, макрофаги, клетки природных киллеров (NK) или дендритные клетки. В некоторых воплощениях клетки представляют собой врожденные иммунные клетки.

В настоящем изобретении выражение “Т-клетки” относится к лимфоидным клеткам, экспрессирующим молекулы Т-клеточных рецепторов. Т-клетки включают, без ограничения, наивные Т-клетки, стимулированные Т-клетки, первичные Т-клетки (напр., некультивируемые), культивируемые Т-клетки, иммортализованные Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки, природные Т-клетки-киллеры, их комбинации или субпопуляции. Т-клетки могут быть $CD4^+$, $CD8^+$ либо $CD4^+$ и $CD8^+$. Т-клетки могут быть хелперными, напр., клетки-хелперы типа T_H1 , T_H2 , T_H3 , T_H9 , T_H17 или T_{FH} . Т-клетки могут представлять собой цитотоксические Т-клетки. Регуляторные Т-клетки могут быть $FoxP3^+$ или $FoxP3^-$. Т-клетки могут представлять собой Т-клетки α/β или Т-клетки γ/δ . В некоторых случаях Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$. В некоторых случаях Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, выбранные из группы, состоящей из Т-клеток $Tr1$, T_H3 , $CD8^+CD28^-$, T_{reg17} и рестриктированных по Qa-1 либо их комбинации или субпопуляции. В некоторых случаях Т-клетки представляют собой Т-клетки $FoxP3^+$. В некоторых случаях Т-клетки представляют собой эффекторные Т-клетки $CD4^+CD25^{lo}CD127^{hi}$. В некоторых случаях Т-клетки представляют собой наивные Т-клетки $CD4^+CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}CD45RO^-$.

Т-клетки могут представлять собой рекомбинантные Т-клетки, которые подвергались генетическим манипуляциям. В некоторых случаях рекомбинантные Т-клетки содержат рекомбинантный (напр., мутированный или гетерологичный) Т-клеточный рецептор или химерный антигеновый рецептор (CAR). Например, Т-клеточный рецептор может содержать одну или несколько мутаций в определяющем комплементарность участке Т-клеточного рецептора для изменения специфичности к антигену. В другом примере Т-клеточный рецептор может быть мутирован (напр., в эндодомене) для усиления или ослабления передачи сигналов. Еще в одном примере Т-клеточный рецептор может быть заменен гетерологичным Т-клеточным рецептором. Еще в одном примере Т-клеточный рецептор может быть заменен полипептидом, содержащим домен другого рецептора типа антитела или фрагмента антитела. В некоторых случаях Т-клеточный рецептор представ-

ляет собой химерный рецептор, содержащий наводящий домен (напр., фрагмент антитела), трансмембранный домен и внутриклеточный домен или эндодомен. Эндодомен может содержать один или несколько сигнальных доменов и/или адаптерных доменов для обеспечения надежной активации Т-клеток и активности против антигена.

В настоящем изобретении термин “негомологичное соединение концов” или NHEJ относится к клеточному процессу, в котором разрезанные или надрезанные концы нити ДНК лигируются непосредственно без необходимости в гомологичной матричной нуклеиновой кислоте. NHEJ может привести к добавлению, удалению, замене либо их комбинации одного или нескольких нуклеотидов в месте репарации.

В настоящем изобретении термин “репарация с помощью гомологичной рекомбинации” (HDR) относится к клеточному процессу, в котором разрезанные или надрезанные концы нити ДНК репарируются путем полимеризации на гомологичной матричной нуклеиновой кислоте. При этом исходная последовательность заменяется последовательностью матрицы. Гомологичная матричная нуклеиновая кислота может быть представлена гомологичными последовательностями из различных мест в геноме (сестринских хроматидах, гомологичных хромосомах или повторяющихся участках в одной и той же или разных хромосомах). С другой стороны, для получения специфического HDR-индуцированного изменения последовательности в целевом сайте может вводиться экзогенная матричная нуклеиновая кислота. При этом могут вводиться специфические мутации по месту разреза.

В настоящем изобретении одноцепочечная ДНК-матрица или двухцепочечная ДНК-матрица относится к таким ДНК-олигонуклеотидам, которые могут использоваться клеткой в качестве матрицы для HDR. Обычно одноцепочечная ДНК-матрица или двухцепочечная ДНК-матрица имеет по меньшей мере один участок гомологии с целевым сайтом. В некоторых случаях одноцепочечная ДНК-матрица или двухцепочечная ДНК-матрица имеет два гомологичных участка, фланкирующие область, содержащую гетерологичную последовательность для вставки в целевой сайт разреза.

Раскрытие сущности изобретения

В дальнейшем описании приводятся различные аспекты и воплощения настоящих композиций и способов. Ни одно конкретное воплощение не должно определять объем композиций и способов. Скорее, эти воплощения просто представляют неограничительные примеры различных композиций и способов, которые по крайней мере входят в объем раскрытых композиций и способов. Описание следует читать с точки зрения рядового специалиста в данной области; поэтому не всегда информация, хорошо известная специалистам в данной области, включена.

Предусмотрены композиции и способы для редактирования генома клетки. Авторы изобретения неожиданно открыли, что крупные нуклеотидные последовательности, к примеру, нуклеотидные последовательности длиной более 200 нуклеотидов или пар оснований, могут быть вставлены в геном клетки в отсутствие вирусного вектора. В некоторых воплощениях нуклеотидные последовательности длиной более 200 нуклеотидов или пар оснований могут быть вставлены в геном первичных иммунцитов в отсутствие вирусного вектора.

Встраивание в клетки больших нуклеиновых кислот, к примеру, нуклеиновых кислот размером более 200 нуклеотидов может ограничиваться низкой эффективностью встраивания, эффектами попадания вне мишени и/или потерей жизнеспособности клеток. Здесь описаны способы и композиции для достижения встраивания в геном клетки нуклеотидных последовательностей, к примеру, нуклеотидных последовательностей размером более 200 нуклеотидов. В некоторых способах повышается эффективность встраивания, уменьшаются побочные эффекты и/или снижается потеря жизнеспособности клеток.

Способы

Способы редактирования генома клетки могут включать: а) получение комплекса рибонуклеопротеинового комплекса Cas9 (RNP) и ДНК-матрицы, включающего: (i) RNP, причем RNP содержит нуклеазный домен Cas9 и направляющую РНК, причем направляющая РНК специфически гибридизуется с целевым участком генома клетки, при этом нуклеазный домен Cas9 расщепляет целевой участок и создает сайт вставки в геноме клетки; и (ii) двухцепочечной или одноцепочечной ДНК-матрицы, причем размер ДНК матрицы составляет более 200 нуклеотидов, при этом 5'- и 3'-концы ДНК-матрицы содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки, а молярное соотношение RNP к ДНК-матрице в комплексе составляет от 3:1 до 100:1; и б) введение комплекса RNP и ДНК-матрицы в клетку.

В некоторых воплощениях описанные здесь способы обеспечивают эффективность доставки комплекса RNP и ДНК-матрицы по меньшей мере в 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, 99,5%, 99% или выше. В некоторых случаях эффективность определяется по отношению к клеткам, остающимся жизнеспособными после введения RNP-ДНК матрицы в клетки. В некоторых случаях эффективность определяется по отношению к общему числу клеток (жизнеспособных или нежизнеспособных), в которых RNP-ДНК матрицы вводится в клетки.

В другом примере эффективность доставки можно определять путем определения

количества клеток с отредактированным геномом в популяции клеток (по сравнению с общим числом клеток или жизнеспособных клеток, полученных после стадии введения). Можно использовать различные методы количественной оценки редактирования генома. Эти методы включают, без ограничения, использование специфичной для несовпадений нуклеазы типа эндонуклеазы I T7; секвенирование одного или нескольких целевых локусов (напр., секвенированием по Sanger клонированных амплифицированных фрагментов целевого локуса); и высокопроизводительное глубокое секвенирование.

В некоторых воплощениях снижается потеря жизнеспособности клеток по сравнению с потерей жизнеспособности клеток после введения голый ДНК в клетки или введения ДНК в клетки с помощью вирусного вектора. Снижение может составлять по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или любой процент между этими процентами. В некоторых воплощениях снижаются эффекты нецелевого встраивания по сравнению с нецелевым встраиванием после введения голый ДНК в клетки или введения ДНК в клетки с помощью вирусного вектора. Снижение может составлять по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или любой процент между этими процентами.

В некоторых случаях описанные здесь способы обеспечивают высокую жизнеспособность клеток, в которые была введена RNP-ДНК матрицы. В некоторых случаях жизнеспособность клеток, в которые была введена RNP-ДНК матрицы, составляет по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, 99,5%, 99% или выше. В некоторых случаях жизнеспособность клеток, в которые была введена RNP-ДНК матрицы, составляет от 20% до 99%, от 30% до 90%, от 35% до 85% или 90% либо выше, от 40% до 85% или 90% либо выше, от 50% до 85% или 90% либо выше, от 50% до 85% или 90% либо выше, от 60% до 85% или 90% либо выше или же от 70% до 85% или 90% либо выше.

В предусмотренных здесь способах молярное соотношение RNP к ДНК-матрице может составлять от 3:1 до 100:1. Например, молярное соотношение может составлять от 5:1 до 10:1, от 5:1 до 15:1, от 5:1 до 20:1; от 5:1 до 25:1; от 8:1 до 12:1; от 8:1 до 15:1, от 8:1 до 20:1 или от 8:1 до 25:1.

В некоторых воплощениях ДНК-матрица находится в концентрации от 2,5 пМ до 25 пМ. Например, концентрация ДНК матрицы может составлять 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5 25 пМ или любые концентрации между этими концентрациями. В некоторых воплощениях размер или длина ДНК матрицы составляет более 200 п.н., 250 п.н., 300 п.н., 350 п.н., 400 п.н., 450

п.н., 500 п.н., 550 п.н., 600 п.н., 650 п.н., 700 п.н., 750 п.н., 800 п.н., 850 п.н., 900 п.н., 1 т.н., 1,1 т.н., 1,2 т.н., 1,3 т.н., 1,4 т.н., 1,5 т.н., 1,6 т.н., 1,7 т.н., 1,8 т.н., 1,9 т.н., 2,0 т.н., 2,1 т.н., 2,2 т.н., 2,3 т.н., 2,4 т.н., 2,5 т.н., 2,6 т.н., 2,7 т.н., 2,8 т.н., 2,9 т.н., 3 т.н., 3,1 т.н., 3,2 т.н., 3,3 т.н., 3,4 т.н., 3,5 т.н., 3,6 т.н., 3,7 т.н., 3,8 т.н., 3,9 т.н., 4,0 т.н., 4,1 т.н., 4,2 т.н., 4,3 т.н., 4,4 т.н., 4,5 т.н., 4,6 т.н., 4,7 т.н., 4,8 т.н., 4,9 т.н., 5,0 т.н. или любой размер ДНК матрицы между этими размерами. Например, размер ДНК матрицы может составлять от 200 п.н. до 500 п.н., от 200 п.н. до 750 п.н., от 200 п.н. до 1 т.н., от 200 п.н. до 1,5 т.н., от 200 п.н. до 2,0 т.н., от 200 п.н. до 2,5 т.н., от 200 п.н. до 3,0 т.н., от 200 п.н. до 3,5 т.н., от 200 п.н. до 4,0 т.н., от 200 п.н. до 4,5 т.н., от 200 п.н. до 5,0 т.н. В некоторых воплощениях количество ДНК матрицы составляет от 1 мкг до 10 мкг. Например, количество ДНК матрицы может составлять от 1 мкг до 2 мкг, от 1 мкг до 3 мкг, от 1 мкг до 4 мкг, от 1 мкг до 5 мкг, от 1 мкг до 6 мкг, от 1 мкг до 7 мкг, от 1 мкг до 8 мкг, от 1 мкг до 9 мкг, от 1 мкг до 10 мкг. В некоторых воплощениях количество ДНК матрицы составляет от 2 мкг до 3 мкг, от 2 мкг до 4 мкг, от 2 мкг до 5 мкг, от 2 мкг до 6 мкг, от 2 мкг до 7 мкг, от 2 мкг до 8 мкг, от 2 мкг до 9 мкг или от 2 мкг до 10 мкг. В некоторых воплощениях количество ДНК матрицы составляет от 3 мкг до 4 мкг, от 3 мкг до 5 мкг, от 3 мкг до 6 мкг, от 3 мкг до 7 мкг, от 3 мкг до 8 мкг, от 3 мкг до 9 мкг или от 3 мкг до 10 мкг. В некоторых воплощениях количество ДНК матрицы составляет от 4 мкг до 5 мкг, от 4 мкг до 6 мкг, от 4 мкг до 7 мкг, от 4 мкг до 8 мкг, от 4 мкг до 9 мкг или от 4 мкг до 10 мкг. В некоторых воплощениях количество ДНК матрицы составляет от 5 мкг до 6 мкг, от 5 мкг до 7 мкг, от 5 мкг до 8 мкг, от 5 мкг до 9 мкг или от 5 мкг до 10 мкг. В некоторых воплощениях количество ДНК матрицы составляет от 6 мкг до 7 мкг, от 6 мкг до 8 мкг, от 6 мкг до 9 мкг или от 6 мкг до 10 мкг. В некоторых воплощениях количество ДНК матрицы составляет от 7 мкг до 8 мкг, от 7 мкг до 9 мкг или от 7 мкг до 10 мкг. В некоторых воплощениях количество ДНК матрицы составляет от 8 мкг до 9 мкг или от 8 мкг до 10 мкг. В некоторых воплощениях количество ДНК матрицы составляет от 9 до 10 мкг. В некоторых случаях размер ДНК матрицы достаточно велик и он достаточен для того, чтобы быть летальным в виде голой ДНК. В некоторых воплощениях ДНК-матрица кодирует гетерологичный белок либо его фрагмент. В некоторых воплощениях ДНК-матрица содержит регуляторные последовательности, к примеру, последовательность промотора и/или последовательность энхансера для регуляции экспрессии гетерологичного белка или его фрагмента после вставки в геном клетки.

В некоторых случаях ДНК-матрица представляет собой линейную ДНК-матрицу. В некоторых случаях ДНК-матрица представляет собой одноцепочечную ДНК-матрицу. В некоторых случаях одноцепочечная ДНК-матрица представляет собой чистую одноцепочечную

чечную ДНК-матрицу. В настоящем изобретении термин “чистая одноцепочечная ДНК” означает такую одноцепочечную ДНК, которая практически лишена другой или противоположной нити ДНК. “Практически лишена” означает, что в чистой одноцепочечной ДНК по меньшей мере в 100 раз больше одной нити, чем другой нити ДНК.

В некоторых случаях комплекс RNP и ДНК-матрицы образуется путем инкубации RNP с ДНК-матрицей в течение от менее 1 мин до 30 мин при температуре от 20°C до 25°C. Например, RNP можно инкубировать с ДНК-матрицей в течение 5 сек, 10 сек, 15 сек, 20 сек, 25 сек, 30 сек, 35 сек, 40 сек, 45 сек, 50 сек, 55 сек, 1 мин, 2 мин, 3 мин, 4 мин, 5 мин, 6 мин, 7 мин, 8 мин, 9 мин, 10 мин, 11 мин, 12 мин, 13 мин, 14 мин, 15 мин, 16 мин, 17 мин, 18 мин, 19 мин, 20 мин, 21 мин, 22 мин, 23 мин, 24 мин, 25 мин, 26 мин, 27 мин, 28 мин, 29 мин или 30 мин или в течение любого другого времени между этими временами при температуре около 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C или 25°C. В другом примере RNP можно инкубировать с ДНК-матрицей в течение от менее 1 мин до 1 мин, от менее 1 мин до 5 мин, от менее 1 мин до 10 мин, от 5 мин до 10 мин, от 5 мин до 15 мин, от 10 до 15 мин, от 10 мин до 20 мин или от 10 мин до 30 мин при температуре от 20°C до 25°C. В некоторых воплощениях комплекс RNP и ДНК-матрицы смешивают с клетками перед введением комплекса RNP и ДНК-матрицы в клетки.

В некоторых воплощениях введение комплекса RNP и ДНК-матрицы включает электропорацию. Методы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса RNP и ДНК-матрицы могут включать описанные в приведенных здесь примерах. Другие или альтернативные методы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса RNP и ДНК-матрицы могут включать описанные в WO 2006/001614 или в Kim J.A. et al., *Biosens. Bioelectron.* 23, 1353-1360 (2008). Другие или альтернативные методы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса RNP и ДНК-матрицы могут включать описанные в U.S. Patent Appl. Pub. Nos. 2006/0094095; 2005/0064596; или 2006/0087522. Другие или альтернативные методы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса RNP и ДНК-матрицы могут включать описанные в Li L.H. et al., *Cancer Res. Treat.* 1, 341-350 (2002); U.S. Patent Nos.: 6,773,669; 7,186,559; 7,771,984; 7,991,559; 6485961; 7029916; и U.S. Patent Appl. Pub. Nos. 2014/0017213; и 2012/0088842. Другие или альтернативные методы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса RNP и ДНК-матрицы могут включать описанные в Geng T. et al., *J. Control. Release* 144, 91-100 (2010); и Wang J. et al., *Lab. Chip* 10, 2057-2061 (2010).

В некоторых воплощениях белок Cas9 может находиться в виде активной эндонуклеазы, так что при связывании с целевой нуклеиновой кислотой в составе комплекса с

направляющей РНК или комплекса с ДНК-матрицей в целевую нуклеиновую кислоту вводится двухцепочечный разрыв. Двухцепочечный разрыв может репарироваться посредством NHEJ для введения случайных мутаций или HDR для введения специфических мутаций. В описанных здесь способах можно использовать различные нуклеазы Cas9. Например, можно использовать такую нуклеазу Cas9, которой требуется прилегающий к протоспейсеру мотив (PAM) NGG сразу в положении 3' от участка, на который нацелена гидовая РНК. Такие нуклеазы Cas9 могут быть нацелены на любой участок генома, содержащий последовательность NGG. В качестве другого примера можно использовать белки Cas9, требующие ортогональные мотивы PAM, для нацеливания на последовательности, не имеющих прилегающей последовательности PAM NGG. Типичные белки Cas9 со специфичностью к ортогональным последовательностям PAM включают, без ограничения, CFP1, белки, описанные в *Nature Methods* 10, 1116-1121 (2013), и белки, описанные в Zetsche et al., *Cell*, Volume 163, Issue 3, p759-771, 22 October 2015.

В некоторых случаях белок Cas9 представляет собой нуклеазу, так что при связывании с целевой нуклеиновой кислотой в составе комплекса с направляющей РНК в целевую нуклеиновую кислоту вводится одноцепочечный разрыв или надрез. Пара нуклеаз Cas9, из которых каждая связана с отличной по структуре направляющей РНК, может быть нацелена на два проксимальных участка целевой области генома и тем самым вводить пару проксимальных одноцепочечных разрывов в целевую область генома. Пары нуклеаз могут обеспечить повышенную специфичность, так как нецелевые эффекты, скорее всего, приведут к появлению одиночных надрезов, которые обычно репарируются, не создавая повреждений по механизмам репарации с вырезанием оснований. Типичные нуклеазы Cas9 включают нуклеазы Cas9 с мутацией D10A или H840A.

В некоторых воплощениях RNP содержит нуклеазу Cas9. В некоторых воплощениях RNP содержит нуклеазу Cas9. В некоторых воплощениях комплекс RNP и ДНК-матрицы содержит по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP. В некоторых воплощениях по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP содержат структурно разные нуклеазные домены Cas9. В некоторых воплощениях по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP содержат структурно разные направляющие РНК. В некоторых воплощениях, в которых по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP содержат структурно разные направляющие РНК, каждый из структурно разных комплексов RNP содержит нуклеазу Cas9, а структурно разные направляющие РНК гибридизуются с противоположными нитями целевой области.

В некоторых случаях в клетки вводится несколько комплексов RNP-ДНК матриц,

содержащих структурно различные рибонуклеопротеиновые комплексы. Например, белок Cas9 может образовывать комплексы со множеством (напр., 2, 3, 4, 5 и более, напр., 2-10, 5-100, 20-100) структурно различных направляющих РНК для наведения вставки ДНК-матрицы во множество структурно различных целевых областей генома.

В предусмотренных здесь способах и композициях клетки включают, без ограничения, эукариотические клетки, прокариотические клетки, клетки животных, клетки растений, клетки грибов и т.п. Необязательно клетки являются клетками млекопитающих, к примеру, клетками человека. Клетки могут быть *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Клетки также могут представлять собой первичные клетки, зародышевые клетки, стволовые клетки или клетки-предшественники. Клетки-предшественники могут представлять собой, к примеру, плюрипотентные стволовые клетки или гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых воплощениях клетки представляют собой первичные гемопоэтические клетки или первичные гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых воплощениях первичные гемопоэтические клетки представлены иммунocyтами. В некоторых воплощениях иммунные клетки представляет собой Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки CD4⁺. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки CD8⁺. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки CD4⁺CD8⁺. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки CD4⁻CD8⁻. Также предусмотрены популяции любых клеток, модифицированных любым из описанных здесь способов. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают размножение популяции модифицированных клеток.

В некоторых случаях клетки извлекают из субъекта, модифицируют любым из описанных здесь способов и вводят пациенту. В других случаях пациенту вводится любая из описанных здесь конструкций *in vivo*. Напр., см. U.S. Patent No. 9737604 и Zhang et al. "Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy", NPG Asia Materials Volume 9, page e441 (2017).

В некоторых воплощениях комплекс RNP и ДНК-матрицы вводится в от 1×10^5 до 2×10^6 клеток. Например, комплекс RNP и ДНК-матрицы может вводиться в количестве от 1×10^5 до 5×10^5 клеток, от 1×10^5 до 1×10^6 , от 1×10^5 до $1,5 \times 10^6$, от 1×10^5 до 2×10^6 , от 1×10^6 до $1,5 \times 10^6$ или от 1×10^6 до 2×10^6 клеток.

В некоторых случаях описанные здесь способы и композиции можно использовать для создания, модификации, применения или контроля рекомбинантных Т-клеток типа Т-клеток с химерными антигеновыми рецепторами (Т-клеток CAR). Такие Т-клетки CAR

могут применяться для лечения или профилактики рака, инфекционных заболеваний или аутоиммунных заболеваний у субъектов. Например, в некоторых воплощениях один или несколько генных продуктов вставляют или внедряют в Т-клетки для экспрессии гетерологичного белка (напр., химерного антигенового рецептора (CAR)).

Композиции

Также предусмотрено множество клеток, причем геном по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% и более клеток содержит прицельную вставку гетерологичной ДНК матрицы, причем ДНК-матрица имеет размер по меньшей мере 200 пар оснований. В некоторых воплощениях множество клеток включает первичные гемопоэтические клетки или первичные гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых воплощениях первичные гемопоэтические клетки представлены иммунocyтами. В некоторых воплощениях иммунные клетки представляет собой Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки CD8⁺. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки CD4⁺CD8⁺.

Раскрыты материалы, композиции и компоненты, которые могут применяться, могут применяться в сочетании с ними, могут применяться для получения или являются продуктами раскрытых способов и композиций. Здесь раскрыты эти и другие материалы, и подразумевается, что при описании комбинаций, подмножеств, взаимодействий, групп и т.д. этих материалов каждые из них специально предусмотрены и описаны здесь, хотя конкретные ссылки на различные индивидуальные и коллективные комбинации и перестановки этих соединений могут и не быть раскрыты в явном виде. Например, если раскрыт и обсужден способ и обсуждаются некоторые модификации, которые могут быть сделаны в отношении одной или нескольких молекул, включенных в способ, то конкретно предусмотрены всевозможные комбинации и перестановки в методе и модификации, если специально не указано иначе. Точно так же специально предусмотрены и раскрыты любые подмножества или комбинации таковых. Эта концепция применима ко всем аспектам этого описания, включая, без ограничения, стадии способов с использованием раскрытых композиций. Так, если существуют различные дополнительные стадии, которые могут выполняться, то подразумевается, что каждая из этих дополнительных стадий может выполняться с любыми конкретными стадиями способа или комбинацией стадий способа из раскрытых способов, причем каждая такая комбинация или подмножество комбинаций специально предусмотрены и должны рассматриваться как раскрытые.

Приведенные здесь публикации и материалы, по поводу которых они приведены,

тем самым специально включены сюда путем отсылки во всей полноте.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приводятся только для иллюстрации, а не для ограничения. Специалисты в данной области смогут легко распознать различные некритические параметры, которые могут быть изменены или модифицированы с получением практически таких же или близких результатов.

Пример 1

Представленные в Примере 1 данные получали так, как изложено в приведенном ниже протоколе.

- Утверждение клинических протоколов/согласия доноров.
- Выделение РВМСs с помощью SepMate по методике производителя.
- Выделение общих Т-клеток с помощью EasySep с по методике производителя.
- Замораживание в среде Vambanker по методике производителя:
 - 20 млн. клеток на мл.
- Оттаивание:
 - добавляли 1 мл среды Roswell Park Memorial Institute (RPMI) поверх оттаявших клеток, которые затем объединяли и промывали в среде;
 - клетки оставляли в среде на ночь только до стимуляции.

Первичные культуры Т-клеток

- Среда:
 - RPMI + 10% FBS;
 - XVivo15 + 5% FBS; или
 - Immunocult (бессывороточная):
 - применима для культивирования клеток в бессывороточной среде.
- Стимуляция:
 - магнитные шарики Dynabeads с CD3/CD28 1:1,
 - можно использовать соотношения от 0,25:1 до 2:1;
 - удаление магнитных шариков перед электропорацией может улучшить эффективность.
- Цитокины:
 - перед электропорацией:
 - IL-2 при 200 ед./мл (обязательно)
 - IL-7 при 5 нг/мл (необязательно)
 - IL-15 при 5 нг/мл (необязательно);
 - после электропорации:

- IL-2 при 500 ед./мл (обязательно).
- Плотность культуры:
 - перед электропорацией:
 - 1×10^6 клеток на 1 мл культуральной среды, обычно по 1 мл в 24-луночные планшеты, 30 мл в колбы T75 или 70 мл в колбы T175;
 - после электропорации:
 - день 0: по $0,25 \times 10^6$ электропорированных клеток в 1 лунку 96-луночного круглодонного планшета в 200 мкл среды;
 - день 2: добавляли в лунки по 100 мкл свежей среды (с цитокинами после электропорации в 3X концентрации);
 - день 4: переносили в 48-луночные планшеты в 500 мкл среды со свежими цитокинами для дальнейшего размножения, а затем разбавляли каждые 2-3 дня для поддержания на уровне $\sim 1 \times 10^6$ клеток на 1 мл культуры, каждый раз добавляя свежие цитокины.

Получение RNP

- Смешивали 160 мкМ crPНК 1:1 с 160 мкМ tracrPНК,
 - разделяли на аликвоты и хранили при -80°C ;
 - лиофилизованную РНК ресуспендировали в трис-НСl (рН 7,4) с 150 мМ MgCl₂,
 - crPНК и tracrPНК приобретали у фирмы Dharmascon или IDT, причем всегда использовали tracrPНК от соответствующего производителя вместе с его crPНК.
- Инкубировали 30 мин при 37°C :
 - получали 80 мкМ гРНК.
- Смешивали 80 мкМ гРНК 1:1 с 40 мкМ Cas9,
 - пробирку перемешивали постукиванием до перехода осадка Cas9 в раствор.
- Инкубировали 15 мин при 37°C :
 - получали 20 мкМ RNP.
- RNP можно использовать сразу же, хранить кратковременно при 4°C до использования или же хранить длительное время при -80°C и использовать после оттаивания.

Получение матрицы для репарации, направляемой с помощью гомологии (HDR)

- Конструирование:

- последовательности HDRT конструировали из продуктов ПЦР и GeneBlocks (IDT) с помощью Gibson Assemblies, помещая конечные HDRT, содержащие 5'- и 3'-гомологичные плечи и требуемые вставки, в клонирующий вектор для дальнейшего размножения.

• Получение:

- получали линейные последовательности дцДНК HDRT методом высокопроизводительной ПЦР-амплификации (полимераза Капа Hotstart);
- выделяли ПЦР-ампликоны методом SPRI и концентрировали до конечного объема в 4 мкл H₂O на 100 мкл исходной реакции ПЦР;
- определяли концентрации HDRT методом Nanodrop в разведении 1:20;
- определяли чистоту методом гель-электрофореза.

Электропорация первичных Т-клеток

• Параметры электропорации:

- количество клеток – 1 000 000 (подходит не менее 200 000 или не более 2 000 000);
- Объем клеток – 20 мкл (может варьироваться от 10 мкл до 20 мкл)
 - клетки центрифугировали 10 мин при 90g, отсасывали и ресуспендировали в буфере для электропорации непосредственно перед электропорацией.
- Буфер для электропорации – P3
 - подходят и другие буферы, включая P2 и OMEM, но у них будут другие оптимальные импульсные коды;
 - буфер P2 дает большую жизнеспособность при меньшей эффективности, но с близким общим количеством положительных клеток;
 - буфер OMEM с оптимальным импульсным кодом (EO155) дает такую же жизнеспособность и эффективность, что и P3 со своим оптимальным импульсным кодом.
- Объем RNP – около 5 мкл (50 пмоль)
 - подходит не менее 1 мкл (20 пмоль) и не более 5 мкл (100 пмоль);
 - оптимальное количество RNP зависит от количества HDRT, однако подходит типичное молярное отношение RNP к HDRT = 10:1.
- Объем HDRT – около 1 мкл
 - объем может варьироваться от 0,5 мкл до 2 мкл.
- Общее количество HDRT – около 5 пмоль

- возможно меньшее или большее количество с различной эффективностью.
- Общий объем электропорации – около 24 мкл.
- Импульсный код – E0155
 - возможны многие другие импульсные коды, но EН115 оказался наиболее эффективным.
- Протокол электропорации:
 - Сначала вносили HDRT в лунки 96-луночного полипропиленового планшета с V-образным дном, соответствующие лункам 96-луночного планшета для электропорации.
 - Затем таким же образом вносили указанные RNP в 96-луночный полипропиленовый планшет с V-образным дном.
 - HDRT и RNP инкубировали вместе при комнатной температуре в течение 5 минут:
 - по меньшей мере 30 сек не дают различия в эффективности,
 - важно, чтобы HDRT и RNP инкубировались вместе перед добавлением клеток.
 - Наконец, ресуспендировали клетки в буфере для электропорации, и по 20 мкл клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного полипропиленового планшета с V-образным дном и перемешивали пропуская через пипетку три раза с HDRT и RNP уже в лунках;
 - по 24 мкл смеси клетки + RNP + HDRT переносили из каждой лунки в соответствующие лунки 96-луночного планшета для электропорации для проведения электропорации.
- Обработка после электропорации:
 - Сразу после электропорации в каждую лунку планшета для электропорации добавляли 80 мкл предварительно подогретой среды.
 - Планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 15 мин:
 - отсутствие инкубации после электропорации было несколько менее эффективным, возможна инкубация от 15 мин до 60 мин без потери эффективности.
 - Клетки переносили из планшета для электропорации в планшеты для культивирования при описанных выше плотностях:
 - обычно планшет для электропорации разбивали на 4 идентичных 96-луночных круглодонных планшета, предварительно заполненных средой и

цитокинами.

Результаты

Было бы полезно создавать более длинные конструкции ДНК, к примеру, при помощи ПЦР, чтобы получать линейные конструкции дцДНК, допускающие большие размеры вставки (>1 т.н.). Это можно сделать с высокой производительностью, однако до настоящего изобретения это было невозможно, так как введение ДНК является сильно токсичным и ведет к массовой гибели клеток. Как видно из фиг. 1, при концентрациях голой ДНК, необходимых для достижения работоспособной эффективности редактирования, жизнеспособность клеток настолько низка, что метод не работает.

Образование комплекса длинных ДНК-матриц с RNP сохраняет жизнеспособность клеток

При электропорации такого количества длинной дцДНК (плазмидной либо линейной дцДНК), которое вызывает большой уровень гибели клеток, авторы изобретения обнаружили, что комплексообразование ДНК с RNP с образованием комплекса RNP и ДНК-матрицы (путем кратковременной инкубации при комнатной температуре, перед добавлением клеток при электропорации) снижает потерю жизнеспособности. Это было верно и для плазмидных матриц (фиг. 2), и для линейных матриц дцДНК (фиг. 3). По мере повышения количества ДНК при электропорации для поддержания жизнеспособности количество RNP также повышается (фиг. 3).

Соотношение Cas9 и ДНК матрицы для жизнеспособности и эффективности встраивания

Молярное соотношение RNP к ДНК-матрице 10:1 поддерживало как эффективность встраивания, так и жизнеспособность после электропорации (фиг. 4). Однако соотношения в пределах от 3:1 до 100:1 также подходят. При соотношении RNP к ДНК-матрице 10:1 уравнивались эффекты потери жизнеспособности и эффективности и достигалось максимальное количество положительных по встраиванию клеток (фиг. 5). Это соотношение также способствует высокой эффективности вставки больших матриц (>750 п.н.) (фиг. 6).

Матрицы дцДНК дают некоторое нецелевое встраивание, которое уменьшается при использовании матриц оцДНК

Вставка длинных ДНК-матриц может приводить к небольшому уровню встраивания вне мишени (фиг. 7), который близок к нецелевому встраиванию при использовании AAV в качестве донорской матрицы. Однако в некоторых из приведенных здесь способов используются длинные матрицы оцДНК в качестве донора, что приводит к уменьшению нецелевого встраивания (фиг. 8).

Использование никазы Cas9 предотвращает нецелевые разрывы дцДНК

Другая проблема наряду со встраиванием вне мишени – нецелевые разрывы дцДНК (которые могут репарироваться посредством NHEJ в качестве мутаций), вводимые Cas9. Как показано здесь, высокоэффективное невирусное встраивание, раскрытое здесь, может проводиться с использованием двух гРНК и никазы Cas9 (D10A) (фиг. 9), что предотвращает нецелевые разрывы дцДНК.

Пример 2

Выделение первичных Т-клеток человека для введения генов

Первичные Т-клетки человека брали у здоровых доноров из свежих образцов цельной крови, остатков из лейкоредукционных камер после афереза Trima (Blood Centers of the Pacific) либо из продуктов лейкофереза (StemCell). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из образцов цельной крови центрифугированием в фиколле, используя пробирки SepMate (StemCell, согласно инструкциям производителя). Т-клетки выделяли из PBMC из всех источников клеток методом магнитно-негативного отбора с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep (StemCell, согласно инструкциям производителя). Если не указано иначе, выделенные Т-клетки стимулировали и использовали напрямую (свежими). При использовании замороженных клеток оттаивали ранее выделенные Т-клетки, которые были заморожены в замораживающей среде Vambanker (Bulldog Bio) согласно инструкциям производителя, культивировали в среде без стимуляции в течение 1 дня, а затем стимулировали и обрабатывали, как описано для свежесвыделенных образцов. Здоровые доноры свежей человеческой крови давали согласие в соответствии с протоколом, утвержденным Комитетом по исследованиям на людях (CHR) UCSF. Образцы пациентов для редактирования генов получали в соответствии с протоколом, утвержденным Внутренним комитетом по надзору (IRB) Йеля.

Первичная культура Т-клеток

Если не указано иначе, общие Т-клетки культивировали в среде XVivo15 (STEMCELL) с 5% фетальной телячьей сыворотки, 50 мМ 2-меркаптоэтанола и 10 мМ N-ацетил-L-цистина. В отмеченных экспериментах использовалась бессывороточная среда (среда для размножения Т-клеток ImmunoCult XF, StemCell) без добавок, а также RPMI + 10% FBS (фиг. 15). Сразу после выделения Т-клетки стимулировали 2 дня магнитными шариками Dynabeads против CD3/CD28 человека (ThermoFisher) при соотношении шариков и клеток 1:1 вместе с коктейлем из цитокинов IL-2 при 200 ед./мл (UCSF Pharmacy), IL-7 при 5 нг/мл (ThermoFisher) и IL-15 при 5 нг/мл (Life Tech). После электропорации Т-клетки культивировали в среде с IL-2 при 500 ед./мл. На протяжении

всего культивирования Т-клетки поддерживали при плотности примерно 1 млн. клеток на мл среды. Через каждые 2-3 дня после электропорации добавляли дополнительную среду вместе с дополнительным свежим IL-2 до конечной концентрации в 500 ед./мл и по мере необходимости переносили клетки в более крупные культуральные сосуды, чтобы поддерживать плотность в 1 млн. клеток на мл.

Получение RNP

RNP получали путем отжига двухкомпонентной гРНК с Cas9, как описано ранее (7, 16). Вкратце, crРНК и tracrРНК синтезировали химически (Dharmacon, IDT), а рекомбинантный Cas9-NLS, D10A-NLS или dCas9-NLS получали и очищали рекомбинантным способом (QB3 Macrolab). Лиофилизованную РНК ресуспендировали в трис-HCl (pH 7,4) с 150 mM KCl в концентрации 160 мкМ и хранили порциями при -80°C. Аликвоты crРНК и tracrРНК оттаивали, смешивали 1:1 по объему и инкубировали при 37°C в течение 30 мин, получая раствор 80 мкМ гРНК. Затем рекомбинантный Cas9 и варианты, хранящиеся при 40 мкМ в 20 mM HEPES-KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 10% глицерина, 1 mM DTT, смешивали 1:1 по объему с 80 мкМ гРНК (молярное соотношение гРНК и Cas9 = 2:1) при 37°C в течение 15 мин, получая RNP при 20 мкМ. Обычно RNP пускали на электропорацию сразу после образования комплекса.

Получение дцДНК HDRT

Последовательности двухцепочечной ДНК HDRT получали из продуктов ПЦР. Новые последовательности для HDR конструировали с помощью Gibson Assemblies для вставки последовательности HDR-матрицы, состоящей из гомологичных плечей (которые обычно синтезировали в виде gBlocks фирмы IDT) и требуемой вставки (типа GFP), в клонирующий вектор для проверки последовательности и дальнейшего размножения. Эти плазмиды использовали в качестве матриц для высокоэффективной ПЦР-амплификации (полимераза Капа Hotstart). ПЦР-ампликоны выделяли методом SPRI (1,0X) и элюировали до конечного объема в 3 мкл H₂O на 100 мкл исходной реакции ПЦР. Определяли концентрации HDRT методом Nanodrop в разведении 1:20. Размеры амплифицированных HDRT проверяли методом гель-электрофореза в 1,0% агарозном геле.

Получение оцДНК HDRT путем расщепления экзонуклеазой

Для получения длинной оцДНК в качестве донора для HDR нужную ДНК амплифицировали методом ПЦР, используя один обычный немодифицированный праймер для ПЦР и второй фосфорилированный праймер для ПЦР. Нить ДНК, которая будет амплифицироваться с помощью фосфорилированного праймера, и будет той нитью, которая будет разрушаться при этом методе. Это позволяет получать либо одноцепочечную смысловую, либо одноцепочечную антисмысловую ДНК с помощью соответствующего фосфорили-

рованного праймера для ПЦР. Для получения нужной нити оцДНК фосфорилированную нить продукта ПЦР разрушали при последующей обработке двумя ферментами, Strandase Mix A и Strandase Mix B, в течение 5 мин (на 1 т.н.) при 37°C, соответственно. Ферменты дезактивировали путем 5-минутной инкубации при 80°C. Полученные HDR-матрицы из оцДНК очищали методом SPRI (1,0X) и элюировали в H₂O. Более подробный протокол для системы получения длинной оцДНК Guide-it™ (Takara Bio USA, Inc. #632644) можно найти на веб-сайте производителя.

Получение оцДНК HDRT путем обратного синтеза

Доноры оцДНК синтезировали путем обратной транскрипции промежуточного соединения РНК с последующим гидролизом нити РНК в полученном гибридном продукте РНК:ДНК, как описано (28). Вкратце, требуемых доноров для HDR сначала клонировали по нисходящей от промотора T7 и амплифицировали последовательность T7 с донором для HDR методом ПЦР. Синтезировали РНК путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы HiScribe T7 (New England Biolabs) и обратной транскрипции с помощью TGIRT-III (InGex). После обратной транскрипции добавляли NaOH и ЭДТА до 0,2 М и 0,1 М, соответственно, и проводили гидролиз РНК при 95°C в течение 10 мин. Реакцию гасили с помощью HCl, очищали конечный продукт оцДНК с помощью магнитных шариков Ampure XP (Beckman Coulter) и элюировали в стерильной, свободной от РНКазы H₂O. Качество оцДНК анализировали методом капиллярного электрофореза (Bioanalyzer, Agilent).

Электропорация первичных Т-клеток

RNP и HDR-матрицы подвергали электропорации через 2 дня после начальной стимуляции Т-клеток. Т-клетки собирали из культуральных сосудов и удаляли магнитные шарики CD3/CD28, помещая клетки на магнит на 2 минуты. Непосредственно перед электропорацией клетки без шариков центрифугировали 10 мин при 90g, отсасывали и ресуспендировали в буфере для электропорации Р3 фирмы Lonza по 20 мкл буфера на 1 млн. клеток. Для оптимального редактирования электропорировали 1 млн. Т-клеток на лунку, используя 96-луночную систему электропорации Lonza 4D с импульсным кодом EN115. Другие концентрации клеток от 200 000 до 2 млн. клеток на лунку проявляли меньшую эффективность. Использовали и другие буферы для электропорации, как указано, но они имели другие оптимальные настройки импульсов (EO155 для буфера OMEM). Если не указано иначе, подвергали электропорации по 2,5 мкл RNP (50 пмоль) вместе с 2 мкл HDR-матрицы при 2 мкг/мкл (всего 4 мкг HDR-матрицы).

Как оказалось, порядок добавления клеток, RNP и HDRT имеет значение (фиг. 10). Для 96-луночных экспериментов сначала вносили HDRT в лунки 96-луночного поли-

пропиленового планшета с V-образным дном. Затем к HDRT добавляли RNP и оставляли инкубироваться вместе при комнатной температуре по меньшей мере на 30 сек. Наконец, добавляли клетки, ресуспендированные в буфере для электропорации, быстро перемешивали пипеткой с HDRT и RNP, и переносили 24 мкл общего объема (клетки + RNP + HDRT) в 96-луночный планшет типа кюветы для электропорации. Сразу после электропорации в каждую лунку добавляли 80 мкл предварительно нагретой среды (без цитокинов) и оставляли клетки на 15 мин при 37°C в инкубаторе для клеточных культур прямо в кюветах для электропорации. Через 15 мин клетки переносили в конечные сосуды для культивирования.

Проточная цитометрия

Анализ методом проточной цитометрии проводили на цитометре с акустическим фокусированием Attune NxT (ThermoFisher). Поверхностное окрашивание на CD3-APC-eFluor 780 (SK7, eBiosciences), CD4-PerCP (SK3, Tonbo), CD8-PE-Cy7 (SK1, BD), IL2RA/CD25-APC (BC96, Tonbo). Внутриклеточное окрашивание на фосфорилирование проводили с помощью pStat5(Y694)-PacBlue (клон 47, BD). Внутриклеточное окрашивание на цитокины по FoxP3 проводили с помощью FoxP3-AF488 (206D, Biolegend).

Конфокальная микроскопия

Образцы готовили путем нанесения капли раствора в 10 мкл суспендированных живых Т-клеток на предметное стекло микроскопа 3×1", на которое помещали покровное стекло в 25 мм². Снимки получали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Nikon A1r в вертикальной конфигурации. Возбуждение осуществляли с помощью лазера OBIS (когерентного) при 488 нм. Использовали водоиммерсионный объектив с большим рабочим расстоянием (LWD) 60x Plan Apo 1.20 NA с дополнительным цифровым увеличением при помощи программы NIS-Elements. Изображения снимали при настройке зеркал "Galvano" с включенным 2-кратным усреднением линий и экспортировали в виде TIFF для анализа в FIJI (ImageJ, NIH).

CUT&RUN

CUT&RUN проводили на помеченных по эпитопам первичных Т-клетках человека через 11 дней после электропорации и 4 дня после повторной стимуляции шариками с анти-CD3/анти-CD28 (немаркированные клетки не подвергали электропорации). Примерно 20% и 10% подвергнутых электропорации клеток проявляли экспрессию GFP-BATF при определении методом проточной цитометрии в образцах донора 1 и донора 2, соответственно. CUT&RUN проводили, как описано (18), используя антитела против GFP (ab290), против BATF (sc-100974) и кроличьи антитела против мыши (ab46540). Вкратце, собирали и промывали 6 млн. клеток (30 млн. клеток для CUT&RUN против GFP в

содержащих GFP-BATF клетках). Выделяли ядра и инкубировали с вращением с первичным антителом (против GFP или BATF) в течение 2 часов при 4°C. Образцы для CUT&RUN на BATF инкубировали еще 1 час с кроличьим антителом против мыши. Затем ядра инкубировали с микрококковой нуклеазой-белком A (любезно предоставленными лабораторией Henikoff) 1 час при 4°C. Ядра выдерживали при 0°C и проводили расщепление MNазой в течение 30 мин. Выделяли и очищали солюбилизированные при CUT&RUN фрагменты хроматина. Готовили библиотеки с парными концами для секвенирования и прогоняли на машинах Illumina Nextseq, а данные по секвенированию обрабатывали, как описано в Skene and Henikoff “An efficient targeted nuclease strategy for high resolution mapping of DNA binding sites”, *Elife* 6 (2017) doi: 10.7554/eLife.21856. Для характеристики пиков и составления тепловых карт отфильтровывали показания по ридам, происходящим, как определено картированием, из центромеров.

Секвенирование и анализ TLA

Секвенирование TLA проводили на фирме Sergentis, как описано ранее (16). Так же и анализ данных по сайтам встраивания и слиянию трансгенов проводили на фирме Sergentis, как описано ранее (16). Секвенирование TLA проводили у двух здоровых доноров, каждый из которых подвергался редактированию по локусу *RAB11A* с помощью HDR-матрицы дцДНК или оцДНК для встраивания слитого GFP. Удаляли секвенированные риды, свидетельствующие о наличии димеров праймеров или смещенности праймеров (т.е. более 99% наблюдаемых прочтений происходят из одного набора праймеров).

Анализ подавления T_{reg} in vitro

T-клетки CD4⁺ обогащали с помощью набора для обогащения T-клеток Easy Sep Human CD4⁺ (StemCell Technologies). Обогащенные T_{reg} CD3⁺CD4⁺CD127^{lo}CD45RO⁺TIGIT⁺ клетки от субъектов с дефицитом IL2RA и HD, а также T_{regS} CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} от индивидов CD25^{+/-} сортировали методом проточной цитометрии. Восприимчивые T-клетки (респондеры, T_{resp}) CD3⁺CD4⁺CD25⁻CD127⁺ метили с помощью CellTrace CFSE (Invitrogen) при 5 мкМ. Клетки T_{reg} и T_{resp} HD культивировали совместно в соотношении 1:1 в присутствии шариков, нагруженных антителами против CD2, против CD3 и против CD28 (Treg Suppression Inspector; Miltenyi Biotec) при соотношении шарики:клетки = 1:1. В дни от 3,5 до 4,5 совместные культуры анализировали методом FACS на разведение CFSE. Рассчитывали % ингибирования по следующей формуле: $1 - (\% \text{ пролиферации с T}_{reg} / \% \text{ пролиферации стимулированных T}_{resp} \text{ без T}_{reg})$.

Сортировка и анализ TSDR у исправленных T_{reg}

Оттаивали размноженные ex-vivo клетки T_{reg} и эффекторные T-клетки от здорового

контроля и пациента с составными гетерозиготными мутациями *IL2RA* (D6) и проводили окрашивание. Живые клетки сортировали по экспрессии маркеров CD25 и CD62L прямо в буфере М для расщепления ZymoResearch ($\times 2$) (кат. № D5021-9) с добавлением протеиназы К. Лизат инкубировали при 65°C более 2 часов, а затем замораживали. Проводили конверсию бисульфитом и пиросеквенирование образцов на фирме EpigenDx (ID анализа ADS783-FS2), чтобы выяснить статус метилирования 9 сайтов CpG интрона 1 гена *FOXP3*, охватывающих от -2330 до -2263 от ATG.

Модель прогнозирования гетерозиготного/гомозиготного встраивания

Можно провести оценку процента клеток с биаллельными вставками по одному аутосомному геномному локусу (два возможных аллеля) только по флуоресцентным фенотипам, если ввести в клетку (при электропорации) две HDR-матрицы, встраивающие разные флуоресцентные белки в один и тот же сайт. Простая вероятностная модель требует лишь два допущения.

Предположение 1. Нет нецелевого встраивания на других сайтах, кроме целевого локуса, которые вносят вклад в флуоресцентные фенотипы.

Предположение 2. Встраивание определенного второго флуоресцентного белка (т.е. RFP) не зависит от того, какой флуоресцентный белок встроился в другой аллель клетки (т.е. при встраивании GFP или RFP в одном первом аллеле с равной вероятностью будет встраивание RFP во втором).

Согласно маркировке на фиг. 26А-С, известны доли четырех различных фенотипических популяций:

- % GFP⁻RFP⁻
- % GFP⁺RFP⁻
- % GFP⁻RFP⁺
- % GFP⁺RFP⁺.

Из этого сразу же известны два генотипа:

- 1) генотип А = NA/NA = % GFP⁻RFP⁻
- 2) генотип Е = GFP/RFP = % GFP⁺RFP⁺.

Четыре остальных генотипа сводятся к двум оставшимся отдельным флуоресцентным фенотипам:

- 3) генотип В + генотип D = GFP/NA + GFP/GFP = % GFP⁺RFP⁻
- 4) генотип С + генотип F = RFP/NA + RFP/RFP = % GFP⁻RFP⁺.

Вероятности того, что клетка RFP⁺ также будет и GFP⁺, и наоборот, тоже известны из фенотипов:

- 5) вероятность того, что GFP⁺ также будет и RFP⁺ = P(GFP|RFP) = (%)

$GFP^+RFP^+)$

$(\% RFP^+ + \% GFP^+RFP^+)$,

6) вероятность того, что RFP^+ также будет и $GFP^+ = P(RFP|GFP) = (\% GFP^+RFP^+)$

$(\% GFP^+ + \% GFP^+RFP^+)$.

Из предположения 2 следует, что если вероятность того, что клетка получит встраивание GFP в своем втором аллеле, не зависит от того, было ли первым встраивание GFP или RFP, то можно определить взаимосвязь между отдельными положительными генотипами (фиг. 26):

$$7) \quad D = P(GFP|RFP) \times B$$

$$8) \quad F = P(RFP|GFP) \times C.$$

Подстановка уравнений 7 и 8 в уравнения 3 и 4, соответственно, и упрощение дает решения для остальных генотипов в терминах известных фенотипов:

$$9) \quad B = \% GFP^+RFP^- / (1 + (\% GFP^+RFP^+) / (\% RFP^+ + \% GFP^+RFP^+))$$

$$10) \quad C = \% GFP^-RFP^+ / (1 + (\% GFP^+RFP^+) / (\% GFP^+ + \% GFP^+RFP^+))$$

$$11) \quad D = \% GFP^+RFP^- - B$$

$$12) \quad F = \% GFP^-RFP^+ - C.$$

Из известных генотипов можно легко рассчитать наблюдаемый % клеток, содержащих моноаллельные или биаллельные вставки, а также другие статистические данные:

- наблюдаемый % гетерозиготных клеток = $B + C$

- наблюдаемый % гомозиготных клеток = $D + E + F$

- наблюдаемый % клеток с по меньшей мере 1 вставкой = $B + C + D + E + F = 1 - A = 1 - \% GFP^-RFP^-$

- наблюдаемый % аллелей, содержащих GFP = $(B + E + 2D)/2$

- наблюдаемый % аллелей, содержащих RFP = $(C + E + 2F)/2$

- наблюдаемый % аллелей со вставкой = % аллелей с GFP + % аллелей с RFP

Ожидаемый % гомозиготных клеток, если бы аллели с HDR распределялись случайным образом (в основном по закону Харди-Вайнберга), можно рассчитать по наблюдаемому % клеток с по меньшей мере одной вставкой (HDR):

- p = аллель с HDR (GFP или RFP)

- q = аллель без HDR (NA)

- X = % клеток, у которых отмечена хотя бы одна HDR

$$13) \quad p + q = 1$$

$$14) \quad p^2 + 2pq + q^2 = 1.$$

Поскольку любая клетка, содержащая аллель с HDR (GFP или RFP), будет про-

являть этот фенотип (в данном случае GFP^+ или RFP^+), то:

$$15) \quad X = p^2 + 2pq.$$

Подставляем X в уравнение 14 и упрощаем:

$$16) \quad q = (1 - X)^{1/2}$$

$$17) \quad p = 1 - q$$

$$18) \quad p = 1 - (1 - X)^{1/2}$$

тогда p^2 даст ожидаемый % клеток, гомозиготных по встраиванию по HDR, если вставка HDR-матрицы была случайной среди заданных аллелей:

$$19) \quad p^2 = 2 - 2(1 - X)^{1/2} - X.$$

Поскольку X известно, то ожидаемый % гомозиготных клеток можно рассчитать прямо из наблюдаемого общего % клеток с по меньшей мере одной HDR, а затем можно сравнить с наблюдаемым % гомозиготных клеток, рассчитанным с учетом полученной информации по встраиванию двух отдельных флуорофоров.

Клиническая история семьи с аутоиммунитетом/дисрегуляцией иммунитета

Обследуемым является европеоидный младенец, которого в 15-недельном возрасте после рвоты, беспокойства и тахипноэ привели на медицинский осмотр, который выявил сильный диабетический кетоацидоз и уровень глюкозы в сыворотке 920 мг/дл. Через неделю после диагноза анализы на GAD65, IA-2 и аутоантитела к инсулину были отрицательными; однако аутоиммунный диабет подтвердился, когда повторные анализы на антитела в возрасте 5-7 месяцев в трех разных лабораториях показали положительные результаты на IA-2 и аутоантитела к инсулину, а также очень высокие уровни антител к GAD65 в двух лабораториях [42,8 нмоль/л (<0,02) в Mayo Laboratories и 896 МЕ/мл (0,0-5,0) в Barbara Davis Centre]. Тестирование на дисфункцию щитовидной железы и целиакию было отрицательным, но умеренно низкие уровни IgA свидетельствуют о частичном дефиците IgA. С-пептид при повторных анализах совсем не обнаруживался, в том числе в возрасте 7 месяцев при измерении через 90 минут после кормления при уровне глюкозы в сыворотке 202 мг/дл, в то же время проинсулин также не обнаруживался. После лечения первоначального ДКА инсулином внутривенно его выписали на многократных ежедневных подкожных инъекциях инсулина (glargin и lispro), а затем перевели на инсулиновую помпу с постоянным мониторингом глюкозы. Ему постоянно требовалась высокая заместительная доза инсулина в пределах 0,8-0,9 ед./кг/день (48% базальной дозы в возрасте 7 месяцев). Он родился путем повторного кесарева сечения на 37-й неделе беременности с массой тела при рождении 3,629 кг (75-й перцентиль) без каких-либо осложнений, и не было никаких опасений по поводу его развития, а его история болезни в остальном была ничем не примечательна. Его родители имеют различное европеоидное происхождение и

лишены кровного родства.

Клиническая информация о членах семьи представлена в табл. 1. Более подробная информация имеет следующий вид:

1. Мать (37)
 - a) пневмония в детском возрасте – считается вирусной,
 - b) ушные инфекции в детстве лечили антибиотиками,
 - c) проблемы с зубами (возможно, связанные с антибиотиками),
 - d) у её отца возник инсулинозависимый диабет в возрасте за 30; у него был низкий уровень лейкоцитов, а также монетовидный дерматит кожи головы,
 - e) у её матери была волчанка.
2. Отец (44):
 - a) марокканец по происхождению,
 - b) не было серьезных медицинских проблем,
 - c) возможны некоторые опасения, что у него может быть увеличено время реакции на распространенные вирусные инфекции.
3. Пораженный ребенок (14):
 - a) иммунная тромбоцитопеническая пурпура (+ антитела против тромбоцитов),
 - b) нейтропения (антитела против нейтрофилов),
 - c) аутоиммунная гемолитическая анемия (DAT⁺, т.е. прямая проба Coombs⁺),
 - d) монетовидный дерматит кожи головы,
 - e) гиперцеллюлярный костный мозг: обратное соотношение CD4/CD8 (0,36),
 - f) язвы во рту,
 - g) ушные инфекции лечили с помощью трубок,
 - h) диарея в детском возрасте,
 - i) 46XX – нет известных хромосомных аномалий,
 - j) проточная цитометрия периферической крови: 82,7% клеток CD45⁺ представлены CD3⁺, а 5,9% – CD19⁺; клетки CD19⁺CD5⁺ являются дефектными В-клетками; 43,6% клеток CD45⁺ представлены CD8⁺ с обратным соотношением CD4/CD8 (0,6); относительное повышение Т-лимфоцитов TCR(α,β)⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (26% клеток TCR(α,β)⁺CD3⁺ и 5% лейкоцитов CD45⁺),
 - k) проводилась иммуносупрессия, включая преднизон (20 мг), IgG-pro-IgA, спрей для носа Flonase, местные стероиды и Symbicort; также получал

Neurogen.

4. Пораженный ребенок:
 - a) диабетические аутоантитела 3+ (против GAD, MIAA, ICA, отрицательный ZnT8 и ICA512/IA-2), нормальный OGTT,
 - b) ушные инфекции лечили с помощью трубок в 1 год,
 - c) экзема в зимнее время.
5. Непораженная дочь (15):
 - a) аллергии, но в остальном здорова.
6. Пораженный сын (4):
 - a) экзема в зимнее время,
 - b) положительный тест на HSV,
 - c) инсулинозависимый диабет в пределах первого года жизни, С-пептид <0,1 при обращении, Ab⁺ против GAD (> 30 (nl <1 ед./мл) через 1 год после диагноза, но отрицательный при диагностике, Ab⁺ к ICA512 (1,3 (nl <1,0)) через 1 год после диагноза, но отрицательный при диагностике.
7. Непораженная дочь (9):
 - a) астма.

Генетическое тестирование для идентификации мутаций *IL2RA*

Первоначальное генетическое тестирование исследуемого с использованием своего собственного мультигенного комплекта для прицельного секвенирования следующего поколения из более 40 генов, явно задействованных в моногенных формах диабета, было отрицательным. Последующее секвенирование экзема у тройки из исследуемого и родителей выявило вызывающие заболевание составные гетерозиготные мутации в гене *IL2RA*. Два потомка несут только одну мутацию, но два других с обеими мутациями свидетельствуют об аутоиммунитете: у старшего мужского потомка (в возрасте 4 или 5 лет) обнаружены положительные диабетические аутоантитела в отсутствие гипергликемии, а у старшего женского потомка диагностирована аутоиммунная опосредованная панцитопения в возрасте 11 лет. У трех детей с составными гетерозиготами была заметно снижена экспрессия CD25.

Клиническое фенотипирование пациентов по *IL2RA*

У детей с дефицитом CD25 имеется почти полная потеря экспрессии IL2-RA на клеточной поверхности Т-клеток, поэтому в их крови практически не обнаруживаются клетки T_{reg} CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}, тогда как у родственников, несущих гетерозиготную мутацию *IL2RA*, проявляется снижение экспрессии CD25 на клетках T_{reg} (фиг. 34). Однако частота Т-клеток CD3⁺CD4⁺CD127^{lo}FOXP3⁺ у субъектов с дефицитом CD25 близка к та-

ковой у здоровых доноров и индивида $CD25^{+/-}$, позволяя предположить, что клетки T_{reg} могут развиваться и в отсутствие функции IL2-Ra (фиг. 34). Используя стратегию выделения клеток T_{reg} без экспрессии CD25, мы обнаружили, что клетки, обогащенные T_{reg} $CD3^+CD4^+CD127^{lo}CD45RO^+TIGIT^+$ от субъектов с дефицитом CD25, проявляют нарушение способности к подавлению пролиферации восприимчивых Т-клеток (респондеров, T_{resp}) по сравнению с таковыми от здоровых доноров (HD) (фиг. 34). Напротив, клетки T_{reg} от родственников с одной гетерозиготной мутацией IL2RA могут ингибировать пролиферацию T_{resp} , хотя и с субоптимальной способностью (фиг. 34). Поэтому коррекция функциональной экспрессии IL2-Ra на поверхности Т-клеток FoxP3⁺ у этих пациентов может представлять собой ценный подход для разработки генной терапии *ex vivo*.

Результаты

Т-клетки человека можно выделить из крови, подвергнуть инженерии *ex vivo*, а затем вернуть в кровотоки посредством аутологической трансплантации. Сконструированные Т-клетки разрабатываются для лечения рака и инфекционных заболеваний (Fesnak et al. “Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy”, *Nat. Rev. Cancer* 16, 566-581 (2016); и Esensten et al. “Engineering Therapeutic T Cells: From Synthetic Biology to Clinical Trials”, *Annu. Rev. Pathol.* 12, 305–330 (2017)).

Эти клеточные методы лечения зависят от возможности генетического перепрограммирования Т-клеток, к примеру, чтобы повысить у них способность к распознаванию и атаке определенных антигенов (Roybal et al. “Synthetic Immunology: Hacking Immune Cells to Expand Their Therapeutic Capabilities”, *Annu Rev. Immunol.* 35, 229-253 (2017)). Разрабатываются клеточные методы лечения для аутоиммунных заболеваний и трансплантации органов, включающие модифицированные регуляторные Т-клетки (T_{reg}), предназначенные для подавления воспаления (Bluestone et al. “Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells”, *Sci. Transl. Med.* 7, 315ra189 (2015)).

Для модификации генома первичных Т-клеток человека применяются различные подходы. Можно вставлять длинные последовательности ДНК (несколько т.н.) с помощью лентивирусных векторов, но сайты встраивания не являются адресными (Verhoeven et al., in: *Methods in Molecular Biology* (2009), pp. 97-114). Основным средством для введения генных конструкций типа химерных антигеновых рецепторов (CAR) были лентивирусы (Kalos et al. “T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia”, *Sci. Transl. Med.* 3, 95ra73 (2011)). Для того, чтобы выбить определенные эндогенные гены, в Т-клетки можно электропорировать специфичные к последовательности нуклеазы типа Cas9, TALEN или нуклеаз типа

«цинковых пальцев» (ZFN), (Schumann et al. “Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 10437-10442 (2015); и Perez et al. “Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases”, *Nat. Biotechnol.* 26, 808-816 (2008)), порождая двухцепочечные разрывы, приводящие к неслучайному спектру мутаций типа вставок и делеций посредством негомологичного соединения концов (NHEJ) (van Overbeek et al. “DNA repair profiling reveals nonrandom outcomes at Cas9-mediated breaks”, *Mol. Cell.* 63, 633-646 (2016)). Для модификации коротких последовательностей ДНК посредством репарации, направляемой с помощью гомологии (Schumann et al. (2015)) применялась совместная доставка небольших (<200 п.н.) химически синтезированных олигонуклеотидов оцДНК (ssODNs), имеющих гомологию к последовательностям, фланкирующим определенным сайтам расщепления нуклеазой.

Прицельное встраивание гораздо более длинных последовательностей ДНК способствовало бы более разнообразным применениям. Недавно это было достигнуто путем электропорации нуклеазы, специфичной к последовательности, с последующим инфицированием лишенным интегразы аденоассоциированным вектором (AAV), содержащим HDR-матрицу (Sather et al. “Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template”, *Sci. Transl. Med.* 7, 307ra156 (2015); и Hubbard et al. “Targeted gene editing restores regulated CD40L function in X-linked hyper-IgM syndrome”, *Blood* 127, 2513-2522 (2016)). Такой подход с электропорацией и инфицированием способствовал новым терапевтическим стратегиям инженерии Т-клеток (Eyquem et al. “Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection”, *Nature* 543, 113-117 (2017)), но он вызывает нецелевое встраивание, требует потенциально нежелательного инфицирования вирусом и имеет ограниченную производительность из-за трудностей в продукции вируса.

Для разработки способов высокоэффективного невирусного нацеливания в геноме тестировали условия культивирования клеток, концентрации RNP Cas9 и HDR-матриц и параметры электропорации. Были идентифицированы условия, при которых можно было совместно вводить RNP Cas9 и длинные ДНК-матрицы (> 1 т.н.) в высоких концентрациях в несколько локусов в первичных Т-клетках человека с ограниченным влиянием на жизнеспособность клеток.

Невирусное нацеливание могло бы применяться для коррекции патогенных мутаций, вызывающих дисфункцию T_{reg} и моногенные аутоиммунные заболевания. Здесь описана семья, в которой у двух детей возникли ранние стадии аутоиммунных заболеваний, а у третьего были аутоантитела, свидетельствующие об очень высоком риске

диабета 1 типа (T1D), и идентифицированы вызывающие потерю функции мутации в IL2RA посредством секвенирования генома. IL2RA критически важен для функции регуляторных Т-клеток и иммунного гомеостаза. С помощью представленных здесь безвирусных способов CRISPR-нацеливания в геноме достигалась эффективная коррекция мутаций, которая восстанавливала экспрессию IL2RA на клеточной поверхности вместе с функциональностью нисходящего сигнального пути. Невирусное нацеливание генома в первичных иммунocyтах человека делает возможными функциональные исследования и коррекцию мутаций в клетках пациентов. Клеточная терапия вкупе с усовершенствованием нацеливания генов (безвирусные матрицы, высокая эффективность и специфичность и длинные конструкции для нацеливания) имеют огромные перспективы для лечения аутоиммунных заболеваний, а также иммунодефицитов, инфекционных заболеваний, трансплантации органов и иммунотерапии рака.

Разработка невирусного нацеливания в геном Т-клеток человека

Главным ограничением для нацеливания в геном в Т-клетках человека было то, что введение ДНК ведет к гибели клеток (Cornu et al. "Refining strategies to translate genome editing to the clinic" *Nat. Med.* 23, 415-423 (2017)). Хотя введение коротких одноцепочечных олигодезоксинуклеотидных (ssODN) HDR-матриц не вызывало значительной потери жизнеспособности Т-клеток, более крупные линейные матрицы дцДНК приводили к обширной токсичности (Y. Zhao et al. "High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation", *Mol. Ther.* 13, 151-159 (2006); и Hornung et al. "Intracellular DNA recognition", *Immunity* 10, 123-130 (2000)).

Как показано здесь, длинные (> 1 т.н.) линейные матрицы из дцДНК были менее токсичными при совместной электропорации с рибонуклеопротеином CRISPR-Cas9 (RNP Cas9) (фиг. 10). Это говорит о том, что совместная доставка подходящей смеси RNP Cas9 и длинной дцДНК делает возможным HDR и сохраняет жизнеспособность клеток.

Невирусное нацеливание генома оптимизировали в первичных Т-клетках человека. Протокол корректировали по эффективности целевого встраивания, жизнеспособности клеток и общему числу положительных по встраиванию клеток (фиг. 11А и фиг. 12). Проводили электропорацию RNP Cas9 вместе с дцДНК-матрицы для HDR, предназначенной для введения N-концевого слияния GFP с геном «домашнего хозяйства» RAB11A (фиг. 11В). Через 3-5 дней после электропорации проводили высокопроизводительную проточную цитометрию для мониторинга встраивания и жизнеспособности клеток. Сначала идентифицировали условия стимуляции и обработки цитокинами как до, так и после электропорации, которые заметно повышали показатели нацеливания на ген (фиг. 11С и фиг. 13 и 14). Эти условия позволили эффективное нацеливание в свежих или

замороженных первичных Т-клетках, выделенных из различных источников (фиг. 15). В этих простимулированных Т-клетках тестировали различные соотношения концентраций RNP Cas9 и HDR-матриц в различных количествах (фиг. 11D и фиг. 16), и были установлены соответствующие концентрации, обеспечивающие эффективное нацеливание на ген. Наконец, проверяли условия электропорации для максимального нацеливания на ген при сохранении высокого уровня жизнеспособности клеток (фиг. 11E и фиг. 17). Невирусное нацеливание на ген обеспечивало введение слитого GFP с эндогенным геном «домашнего хозяйства» RAB11A у более чем 50% клеток в первичных Т-клетках человека и CD4⁺, и CD8⁺ (фиг. 11F).

Режимы быстрого и комбинаторного нацеливания на гены

Простота и быстрота применения невирусного нацеливания генов приведенными здесь способами по геномным сайтам и донорам крови человека (фиг. 18 и фиг. 12). Конструкции, кодирующие слитые конструкции GFP с гомологичными фланкирующими последовательностями, эффективно и воспроизводимо попадали на различные сайты по всему геному (фиг. 18A и фиг. 19). Эти нацеленные слитые конструкции GFP метили различные субклеточные структуры (Leonetti et al. “A scalable strategy for high-throughput GFP tagging of endogenous human proteins”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113, E3501-8 (2016)). Конфокальная микроскопия подтвердила специфичность слитых белков, полученных при нацеливании на различные генов, а также показала, что нацеливание на эндогенные гены с помощью GFP позволило визуализировать локализацию белка в живых Т-клетках человека (фиг. 18B). В клетках от когорты из дюжины здоровых доноров прицельное встраивание GFP в различные гены оказалось очень воспроизводимым в первичных Т-клетках человека (фиг. 19 и 20). Специфичность прицельного встраивания и специфичный для типа клеток профиль экспрессии помеченных генов дополнительно проверяли путем мечения с помощью GFP поверхностного рецептора CD4, кодируемого эндогенно. Линейная зависимость между экспрессией CD4 и GFP наблюдалась именно в помеченных Т-клетках CD4⁺, но не в Т-клетках CD8⁺ (фиг. 18C). В целом эти результаты доказывают, что невирусное нацеливание генома может применяться для модификации эндогенных генов путем вставки больших последовательностей ДНК в целевые сайты в геноме.

Слияние с меткой не только позволяло визуализировать эндогенные белки, но и могло применяться для биохимического нацеливания конкретных белков. Например, для картирования сайтов связывания факторов транскрипции широко применяется ChIP-Seq, а в последнее время и CUT&RUN (Skene and Henikoff “An efficient targeted nuclease strategy for high resolution mapping of DNA binding sites”, Elife 6(2017), doi:10.7554/eLife.21856), однако эти методы часто ограничиваются доступностью эффективных и специфических

антител. В качестве доказательства принципа использовали антитела против GFP для проведения CUT&RUN в первичных Т-клетках, где имело место нацеливание на эндогенный ген, кодирующий BATF, важнейший фактор транскрипции (TF), чтобы создать гибрид с GFP. Сайты связывания, идентифицированные при CUT&RUN против GFP, значительно соответствовали сайтам, идентифицированным с помощью антитела против BATF (фиг. 18D и фиг. 21).

Нацеливание на два аллеля одного и того же гена с помощью двух различных флуорофоров должно обеспечить способ определения и обогащения клеток биаллельными модификациями генов. Вводили два отдельных флуоресцентных белка, нацеленных на один и тот же сайт у гена RAB11A (фиг. 22A и фиг. 23), и показали, что у >5% клеток было успешное биаллельное встраивание. Важно отметить, что количество клеток, экспрессирующих оба флуоресцентных белка, не позволяет точно оценить содержание клеток с биаллельным встраиванием, так как некоторые клетки должны были получить либо GFP, либо mCherry на обоих аллелях. Была построена модель для учета гомозиготных встраиваний одного и того же флуоресцентного белка (фиг. 22B, фиг. 23). Эта модель показывает, что биаллельные встраивания в гене RAB11A были у ~10% клеток. Это говорит о том, что клетки с одним встраиванием в RAB11A с большей вероятностью подвергались и второму прицельному встраиванию, и этот эффект наблюдался по трем геномным локусам (фиг. 23). Совместное введение трех флуоресцентных меток, нацеленных на локус RAB11A, показало очень низкую долю клеток, экспрессирующих все три флуорофора, что согласуется с низким уровнем нецелевого встраивания в этих экспериментах (фиг. 23G). Итак, при использовании нескольких безвирусных конструкций для нацеливания на один и тот же локус можно идентифицировать биаллельное редактирование генома в Т-клетках человека.

Мультиплексное редактирование комбинаторных наборов геномных сайтов должно способствовать расширению исследований и терапевтических применений. Проверили, можно ли при совместном введении нескольких безвирусных HDR-матриц с несколькими RNP получить первичные клетки с более чем одним модифицированным локусом. Оказалось, что не только возможен мультиплексное нацеливание на гены (фиг. 22C), но и обогащение клеток двумя модификациями при стробировании по клеткам, имеющим одну модификацию (фиг. 22D и фиг. 24) (Agudelo et al. "Marker-free coselection for CRISPR-driven genome editing in human cells", *Nat. Methods* 14, 615-620 (2017)). Также проводился тройное нацеливание на гены, при этом значительно обогащались клетки, имеющие третью модификацию, при стробировании по клеткам с двумя прицельными вставками (фиг. 22E и фиг. 24). В общем, невирусное нацеливание на гены может применяться для

обеспечения комплексных генетических модификаций первичных Т-клеток, которые могли бы применяться для различных исследовательских и терапевтических целей.

Никаза D10A и HDR-матрицы оцДНК уменьшают нецелевое встраивание

Одной из главных проблем при использовании HDR-матриц, особенно для терапевтического применения, является возможность нецелевого встраивания. Это наблюдалось даже при использовании AAV с дефицитом интегразы в качестве донора матриц (Dever et al., “CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells”, *Nature* 539, 384-389 (2016)). Такие же свидетельства функционального встраивания вне мишени обнаружались здесь и при использовании линейной матрицы дцДНК для невирусного нацеливания генов. Матрицы из двухцепочечной ДНК могут встраиваться независимо от HDR образом по сайтам естественно возникающих разрывов дцДНК (Murnane et al. “Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells”, *Nucleic Acids Res.* 18, 2733-2738 (1990)), а также по специфическим разрывам дцДНК, вызванным прицельными нуклеазами типа Cas9, что называется независимым от гомологии прицельным встраиванием ((Auer et al. “Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair,” *Genome Res.* 24, 142-153 (2014); и Suzuki et al. “In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration”, *Nature* 540, 144-149 (2016)). Искали непредусмотренные негомологичные встраивания, используя слитую N-концевую конструкцию GFP с RAB11A, которая содержала последовательность эндогенного промотора RAB11A в пределах 5'-гомологичного плеча, причем эта конструкция может управлять экспрессией GFP в сайтах нецелевого встраивания (фиг. 25A и фиг. 26). Как оказалось, функциональное нецелевое встраивание встречается в клетках от разных биологических доноров (фиг. 25B) и наблюдается в экспериментах с различными последовательностями мишени и HDR-матрицами (фиг. 26 и 27). Нецелевое встраивание должно быть сведено к минимуму в клетках, предназначенных для терапевтического применения, гарантируя, что встроившиеся последовательности останутся под надлежащей эндогенной регуляцией, а нецелевые сайты не разрушатся.

Для уменьшения нецелевого встраивания, вызванного нецелевым разрезанием Cas9, проводили невирусное нацеливание генов с использованием варианта D10A никазы Cas9. Для этого варианта требуется, чтобы связывались две гРНК и расщепляли в непосредственной близости, образуя двухцепочечный разрыв, таким образом снижая количество внецелевых разрывов дцДНК (Miyaoaka et al., “Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing”, *Sci. Rep.* 6 (2016), doi:10.1038/srep23549; Vriend et al., “Distinct genetic control of homologous

recombination repair of Cas9-induced double-strand breaks, nicks and paired nicks”, *Nucleic Acids Res.* 44, 5204-5217 (2016); и Bothmer et al., “Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus”, *Nat. Commun.* 8, 13905 (2017)). Проверили ряд комбинаций гРНК в локусе RAB11A на встраивание GFP и обнаружили ряд нацеливаний “PAM-Out”, проявляющих эффективное встраивание GFP при использовании никазы D10A (фиг. 28). Как и ожидалось, при использовании D10A с одной нецелевой направляющей проявлялось заметное уменьшение функционального нецелевого встраивания по сравнению с Cas9, которое было эквивалентно уровню, наблюдавшемуся при использовании dCas9 с неактивной нуклеазой (фиг. 25C).

Даже при использовании никазы D10A дцДНК-матрицы для HDR все-таки происходило редкое, но заметное нецелевое встраивание (сравнимое с уровнем, наблюдавшимся без нуклеазы Cas9), возможно, по естественным разрывам дцДНК (фиг. 25A и C). Считается, что оставшиеся нецелевые встраивания можно устранить путем замены HDR-матриц из дцДНК на HDR-матрицы из длинных оцДНК, которые не могут встраиваться неспецифически по двухцепочечным разрывам (Quadros et al., “Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins”, *Genome Biol.* 18, 92 (2017); и Leonetti et al., <http://www.biorxiv.org/content/early/2017/08/21/178905>).

Для проверки этой гипотезы создавали HDR-матрицы оцДНК двумя способами, которые давали большое количество длинной оцДНК, необходимой для электропорации (фиг. 35). HDR-матрицы оцДНК уменьшали функциональное нецелевое встраивание примерно в 100 раз, сохраняя при этом эффективное встраивание на мишени (фиг. 25D). Можно было использовать никазу Cas9 D10A с матрицами оцДНК. В этих экспериментах, хотя и снижался уровень встраивания на мишени, неспецифическое встраивание снижалось до фонового уровня, наблюдаемого без матрицы (фиг. 25E и F). Для тех сайтов, где вызывает озабоченность возможная нецелевая активность, можно использовать никазу Cas9 D10A и HDR-матрицы оцДНК для снижения степени встраивания, возникающего из-за попадания в двухцепочечные разрывы и естественные разрывы вне мишени, соответственно, что может сделать этот способ привлекательным для терапевтической модификации Т-клеток пациентов.

Терапевтическая коррекция мутаций путем невирусного нацеливания генов

Проверяли применение невирусного нацеливания генов для коррекции мутаций, вызывающих моногенную иммунную дисрегуляцию в Т-клетках от пациентов. Выявлена семья с моногенной первичной иммунной дисрегуляцией с аутоиммунным заболеванием, вызванным рецессивными мутациями с потерей функции у гена, кодирующего α -рецептор

IL-2 (IL2RA), также известный как CD25 (Sharfe et al. “Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3168-3171 (1997); Caudy et al. “CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes”, J. Allergy Clin. Immunol. 119, 482-487 (2007); и Goudy et al., “Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity”, Clin. Immunol. 146, 248-261 (2013)). IL2RA необходим для клеток T_{reg} и иммунного гомеостаза (Sakaguchi et al. “Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases”, J. Immunol. 155, 1151-1164 (1995); и Rudensky et al. “Regulatory T cells and Foxp3”, Immunol. Rev. 241, 260-268 (2011)), а дети в семье, которые являются составными гетерозиготами. с двумя мутациями потери функции, имеют плейотропные аутоиммунные проявления (табл. 1). Один из них от рождения болеет диабетом 1-го типа (T1D), а у другого возникла стойкая аутоиммунная цитопения в детстве. У всех трех дефектных по IL2RA членов семьи отмечались патологические аутоантитела в сыворотке. У дефектных по IL2RA детей имеется почти полная потеря экспрессии IL2RA на клеточной поверхности, поэтому у них практически не обнаруживаются клетки T_{reg} $CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$ в крови, тогда как у их родственников, несущих гетерозиготные мутации IL2RA, проявляется снижение экспрессии IL2RA на клетках T_{reg} (фиг. 30). Однако частота Т-клеток $CD3^+CD4^+CD127^{lo}FoxP3^+$ у субъектов с дефицитом IL2RA близка к таковой у здоровых доноров (HD) и гетерозиготных членов семьи, свидетельствуя о том, что T_{reg} -подобные клетки развиваются и сохраняются, несмотря на мутации IL2RA. Используя стратегию выделения клеток T_{reg} без экспрессии CD25, обнаружили, что клетки, обогащенные T_{reg} $CD3^+CD4^+CD127^{lo}CD45RO^+TIGIT^+$ от дефектных по CD25 субъектов проявляют нарушение способности к подавлению пролиферации восприимчивых Т-клеток (респондеров, T_{resp}) по сравнению с таковыми от здоровых доноров (HD) (фиг. 29). Напротив, клетки T_{reg} от родственников с одной гетерозиготной мутацией IL2RA могут ингибировать пролиферацию T_{resp} , хотя и с субоптимальной способностью (фиг. 29). Поэтому коррекция функциональной экспрессии IL2RA на поверхности Т-клеток $FoxP3^+$ у этих пациентов может представлять собой ценный подход для разработки генной терапии *ex vivo*.

Таблица 1

Пациент	Пол	Статус мутации IL2RA	Фенотип аутоиммунного заболевания	Клиническая история	Ауто-антитела
Гет. 1 с.530 (мать)	ж	с.530A>G/дикий тип	нет	ушные инфекции в детстве	нет
Гет. 1 с.800 (отец)	м	с.800delA/ дикий тип	нет	медицинских проблем нет	нет
Гет. 2 с.800	ж	с.800delA/ дикий тип	нет	аллергии	нет
Гет. 3 с.800	ж	с.800delA/ дикий тип	нет	медицинских проблем нет	нет
Сост. гет. 1	м	с.530A>G/с.800delA	диабет 1 типа	инсулинозависимый диабет в первый год жизни	против GAD, ICA512
Сост. гет. 2	м	с.530A>G/с.800delA	диабетические аутоантитела	ушные инфекции; экзема	против GAD, MIAA, ICA
Сост. гет. 3	ж	с.530A>G/с.800delA	иммунная тромбоцитопеническая пурпура; аутоиммунная нейтропения	ушные инфекции; гемолитическая анемия; монетовидный дерматит; гиперцеллюлярный костный мозг с обратным соотношением CD4/CD8; язвы во рту	против тромбоцитов

Полноэкзомное секвенирование показало, что дети с дефектом по IL2RA несут составные гетерозиготные мутации в IL2RA (фиг. 30А и фиг. 31). Одна мутация по с.530 A>G создает преждевременный стоп-кодон. Улучшения в методологии культивирования клеток и электропорации дали возможность эффективно скорректировать мутацию, используя химически синтезированные HDR-матрицы оцДНК в ~120 п.н. (фиг. 32). Показатели были еще выше при использовании более длинной матрицы дцДНК (фиг. 30В и фиг. 32 и 33). Исправленные Т-клетки от пациента экспрессировали IL2RA на своей поверхности. Хотя коррекция была успешной у всех трех потомков, более низкие показатели экспрессии IL2RA наблюдались у составной гетерозиготы het 3, что могло быть вызвано измененным состоянием клеток в связи с заболеванием пациента или с тем, что она была единственным потомком, проходившим лечение с иммуносупрессией (табл. 1 и фиг. 34). Вторая мутация, с.800delA, вызывает сдвиг рамки считывания в последнем экзоне IL2RA, что приводит к неправильному считыванию части гена, кодируемой в последнем экзоне, а также к набеганию трансляции после нормального стоп-кодона. Этот сдвиг рамки можно исправить даже без HDR-матрицы (фиг. 33). В этом месте геномный разрез, вызванный одним лишь RNP Cas9, был достаточным для того, чтобы вызвать продуктивную экспрессию IL2RA на клеточной поверхности, вероятно, путем восстановления правильной рамки с мутациями типа вставки/делеции (фиг. 33). В целом эти данные показывают, как можно исправить различные мутации в Т-клетках пациента с помощью зависящих от HDR-матрицы и не зависящих от HDR-матрицы механизмов репарации.

Одна потенциальная терапевтическая стратегия для пациентов из этой семьи с

моногенными дефектами T_{reg} должна заключаться в коррекции генов T-клеток *ex vivo* с последующим переливанием аутологичных исправленных T_{reg} . Клетки T_{reg} , полученные при прицельной коррекции, могли бы ограничить некоторые потенциальные риски пересадки гемопоэтических стволовых клеток. Проверили, приведет ли коррекция одной из мутаций IL2RA к продуктивной сигнализации и будет ли происходить коррекция в значимой фракции клеток T_{reg} FOXP3⁺. После исправления мутации с.530A>G клетки были способны функционально передавать сигналы через IL2RA, высокоаффинный рецептор IL-2. В ответ на обработку IL-2 модифицированные клетки проявляли повышенное фосфорилирование Stat5, признак продуктивной передачи сигналов (фиг. 31С и фиг. 33 и 34). Кроме того, проточная цитометрия подтвердила, что часть клеток после коррекции IL2RA экспрессировала FOXP3, важнейший фактор транскрипции в клетках T_{reg} (фиг. 30D и фиг. 32 и 33).

Эндогенный ген, кодирующий IL2RA, находится под жестким контролем нескольких *cis*-регуляторных элементов, составляющих суперэнхансер (Farh et al., “Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants”, Nature 518, 337-343 (2015); и Simeonov et al. “Discovery of stimulation-responsive immune enhancers with unbiased CRISPR activation”, Nature 549 (7670): 111-115 (2017)). Следовательно, терапевтическая коррекция IL2RA, вероятно, будет зависеть от специфической репарации гена в своем эндогенном геномном локусе. Учитывая, что вставка GFP с помощью Cas9 и дцДНК показала, что существует возможность неспецифического встраивания дцДНК, мы использовали никазу Cas9 D10A и длинную матрицу оцДНК для специфической репарации мутации с.530A>G у пациента. С использованием этих реагентов оказалось возможным специфически и избирательно исправить мутантный ген у ~20% T-клеток от пациента (фиг. 30E).

Невирусное нацеливание генов позволяет эффективно вставлять определенные последовательности по всему геному первичных T-клеток человека. Такие вставки могут варьироваться от введения или коррекции мутаций по одной паре оснований до встраивания больших функциональных последовательностей и меток по эндогенным локусам, а также возможно мультиплексное встраивание по всему геному. Для терапевтического применения подвергнутых инженерии T-клеток можно значительно уменьшить нецелевое встраивание при помощи никазы Cas9 D10A и HDR-матриц из оцДНК. Представленные здесь способы и результаты позволят ускорить разработку способов терапии и лечения генетических заболеваний с помощью подвергнутых инженерии T-клеток.

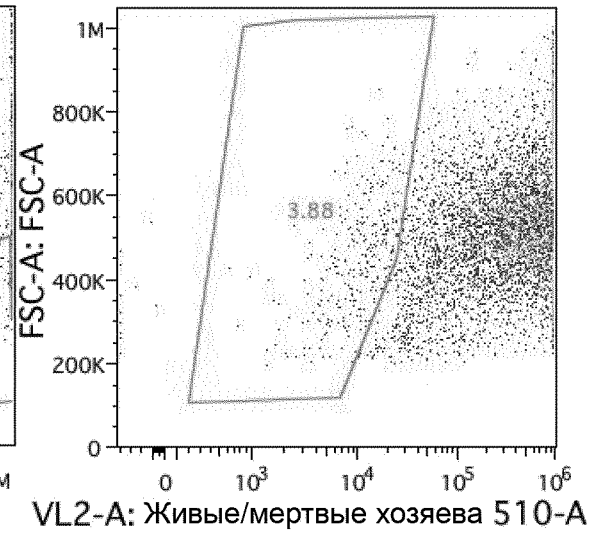
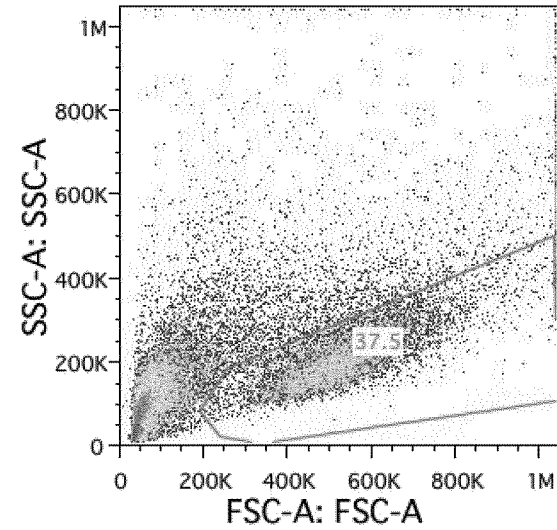
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ редактирования генома клетки, который включает:
 - a) получение комплекса рибонуклеопротеинового комплекса Cas9 (RNP) и ДНК-матрицы, включающего:
 - (i) RNP, причем RNP содержит нуклеазный домен Cas9 и направляющую РНК, причем направляющая РНК специфически гибридизуется с целевым участком генома клетки, а нуклеазный домен Cas9 расщепляет целевой участок с образованием сайта вставки в геноме клетки; и
 - (ii) двухцепочечную или одноцепочечную ДНК-матрицу, причем размер ДНК матрицы составляет более 200 нуклеотидов, при этом 5'- и 3'-концы ДНК-матрицы содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки, а молярное соотношение RNP к ДНК-матрице в комплексе составляет от 3:1 до 100:1; и
 - b) введение комплекса RNP и ДНК-матрицы в клетку.
2. Способ по п. 1, при этом комплекс RNP и ДНК-матрицы образуется при инкубации RNP с ДНК-матрицей в течение от, как минимум, около 1 мин до около 30 мин при температуре от около 20°C до 25°C.
3. Способ по п. 1 или 2, при этом ДНК-матрица представляет собой линейную ДНК-матрицу.
4. Способ по любому из п.п. 1-3, при этом ДНК-матрица представляет собой одноцепочечную ДНК-матрицу.
5. Способ по любому из п.п. 1-3, при этом ДНК-матрица представляет собой чистую одноцепочечную ДНК-матрицу.
6. Способ по любому из п.п. 1-5, при этом комплекс RNP и ДНК-матрицы и клетку смешивают перед введением комплекса RNP и ДНК-матрицы в эту клетку.
7. Способ по любому из п.п. 1-6, при этом RNP содержит нуклеазу Cas9.
8. Способ по любому из п.п. 1-6, при этом RNP содержит нуклеазу Cas9.
9. Способ по любому из п.п. 1-8, при этом комплекс RNP и ДНК-матрицы содержит по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP.
10. Способ по п. 9, при этом по меньшей мере два структурно разных комплекса RNP содержат структурно разные направляющие РНК.
11. Способ по п. 10, при этом каждый из структурно разных комплексов RNP содержит нуклеазу Cas9, а структурно разные направляющие РНК гибридизуются с противоположными нитями целевого участка.
12. Способ по п. 9, при этом по меньшей мере два структурно разных комплекса

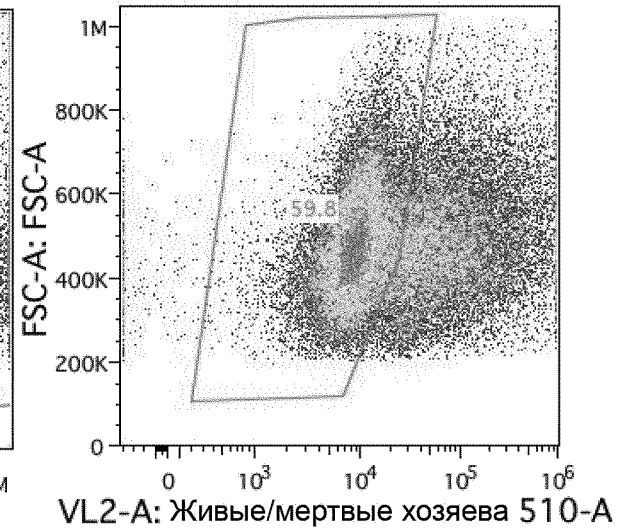
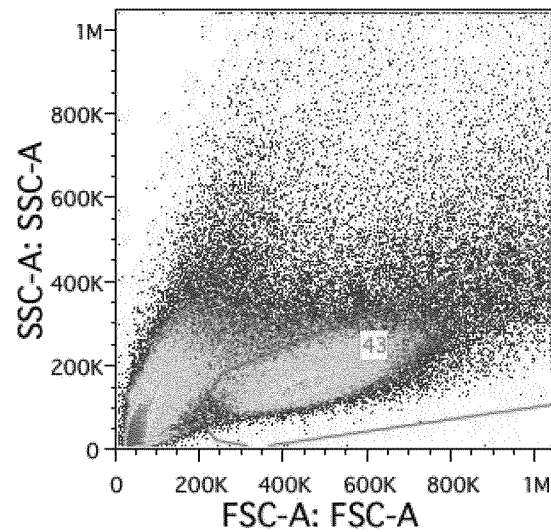
RNP содержат структурно разные нуклеазные домены Cas9.

13. Способ по любому из п.п. 1-12, при этом введение включает электропорацию.
14. Способ по любому из п.п. 1-13, при этом молярное соотношение RNP к ДНК-матрице составляет от 5:1 до 15:1.
15. Способ по любому из п.п. 1-14, при этом молярное соотношение RNP к ДНК-матрице составляет от 5:1 до 10:1.
16. Способ по любому из п.п. 1-15, при этом молярное соотношение RNP к ДНК-матрице составляет от 8:1 до 12:1.
17. Способ по любому из п.п. 1-16, при этом размер ДНК матрицы составляет более 1 т.н.
18. Способ по любому из п.п. 1-17, при этом ДНК-матрица находится в концентрации от 2,5 до 25 пМ.
19. Способ по любому из п.п. 1-18, при этом количество ДНК-матрицы составляет от 1 мкг до 10 мкг.
20. Способ по любому из п.п. 1-19, при этом клетка представляет собой первичную гемопоэтическую клетку или первичную гемопоэтическую стволовую клетку.
21. Способ по любому из п.п. 1-20, при этом комплекс RNP и ДНК-матрицы вводят в количестве от около 1×10^5 до около 2×10^6 клеток.
22. Способ по любому из п.п. 1-21, при этом клетка представляет собой первичную гемопоэтическую клетку.
23. Способ по п. 22, при этом первичная гемопоэтическая клетка представляет собой иммунную клетку.
24. Способ по п. 23, при этом иммунная клетка представляет собой Т-клетку.
25. Способ по п. 24, при этом Т-клетка представляет собой регуляторную Т-клетку, эффекторную Т-клетку или наивную Т-клетку.
26. Способ по п. 25, при этом регуляторная Т-клетка, эффекторная Т-клетка или наивная Т-клетка представляет собой Т-клетку CD4⁺.
27. Способ по п. 24, при этом Т-клетка представляет собой Т-клетку CD8⁺.
28. Способ по п. 24, при этом Т-клетка представляет собой Т-клетку CD4⁺CD8⁺.

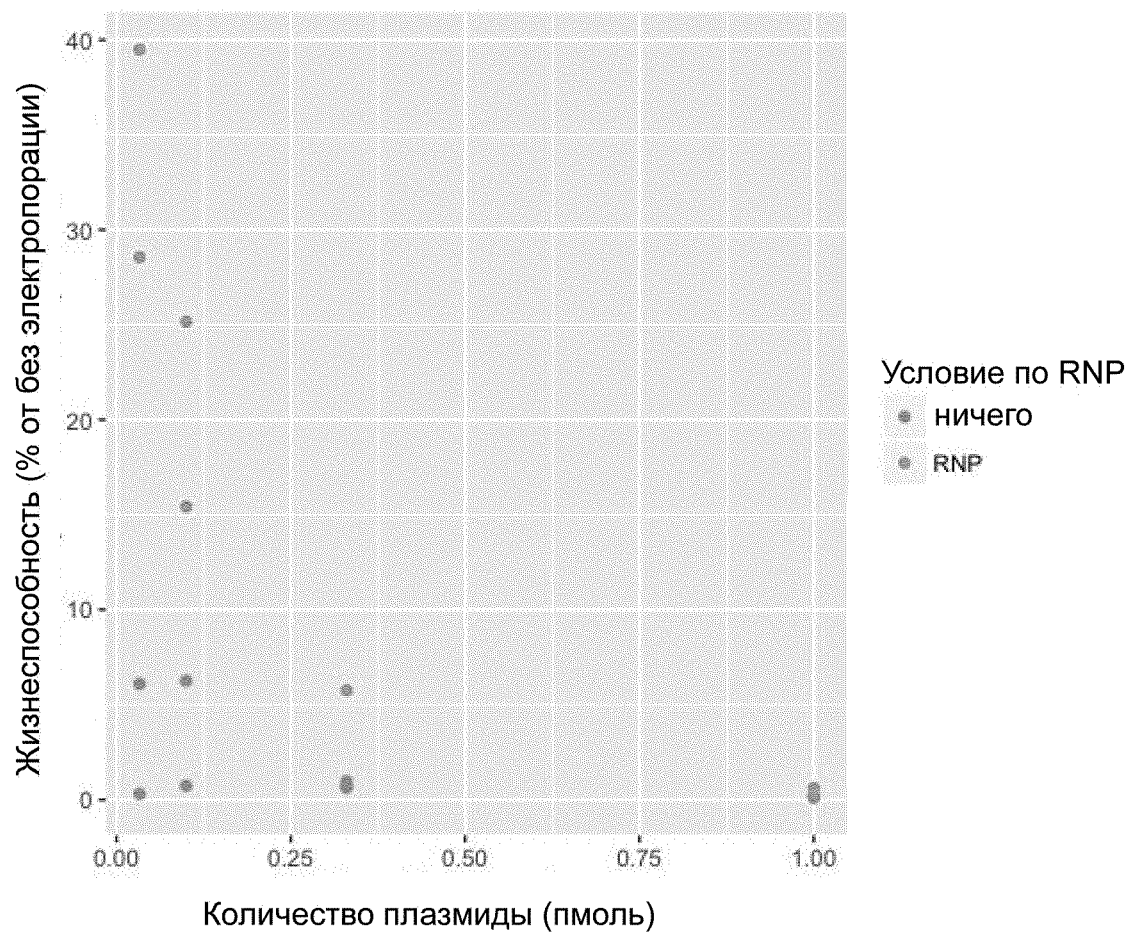
**Только
плазмида**



**Плазмида +
RNP**

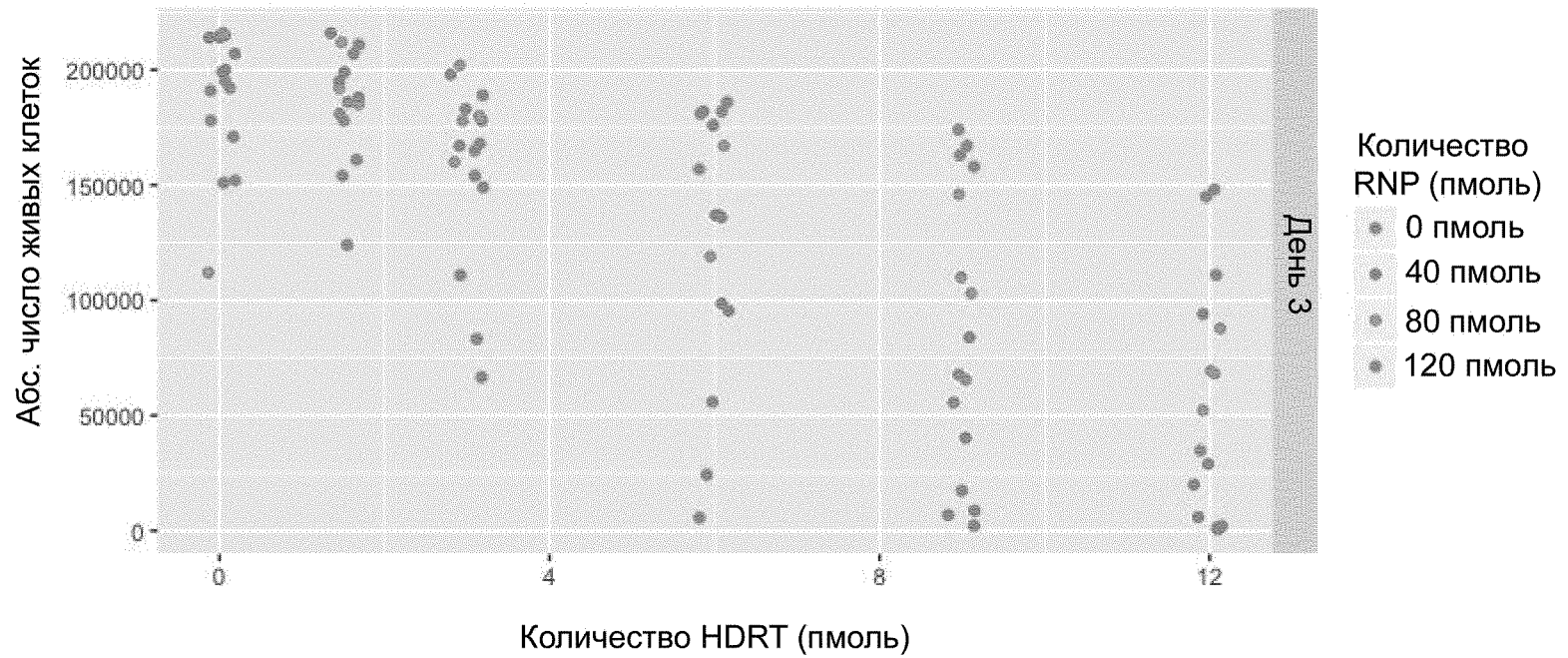


RNP + плазида сохраняет жизнеспособность клеток



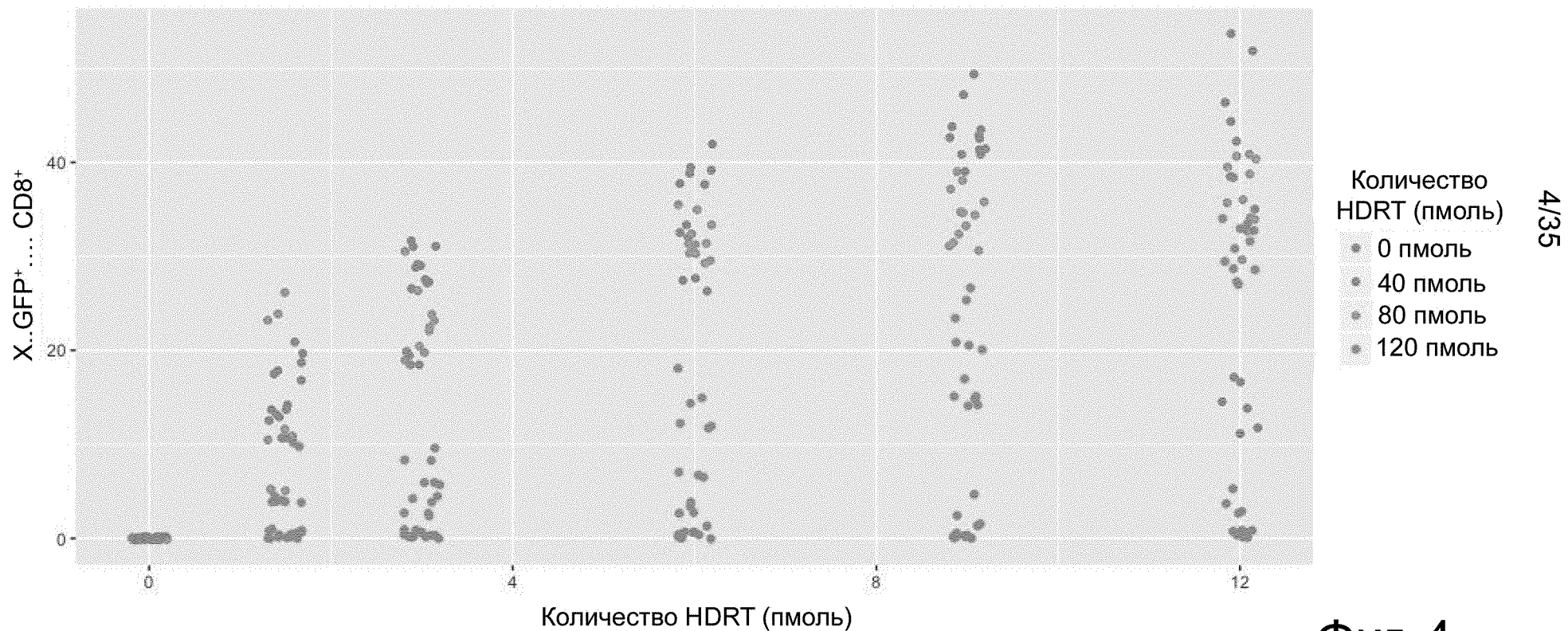
Фиг. 2

RNP + дцДНК сохраняет жизнеспособность клеток



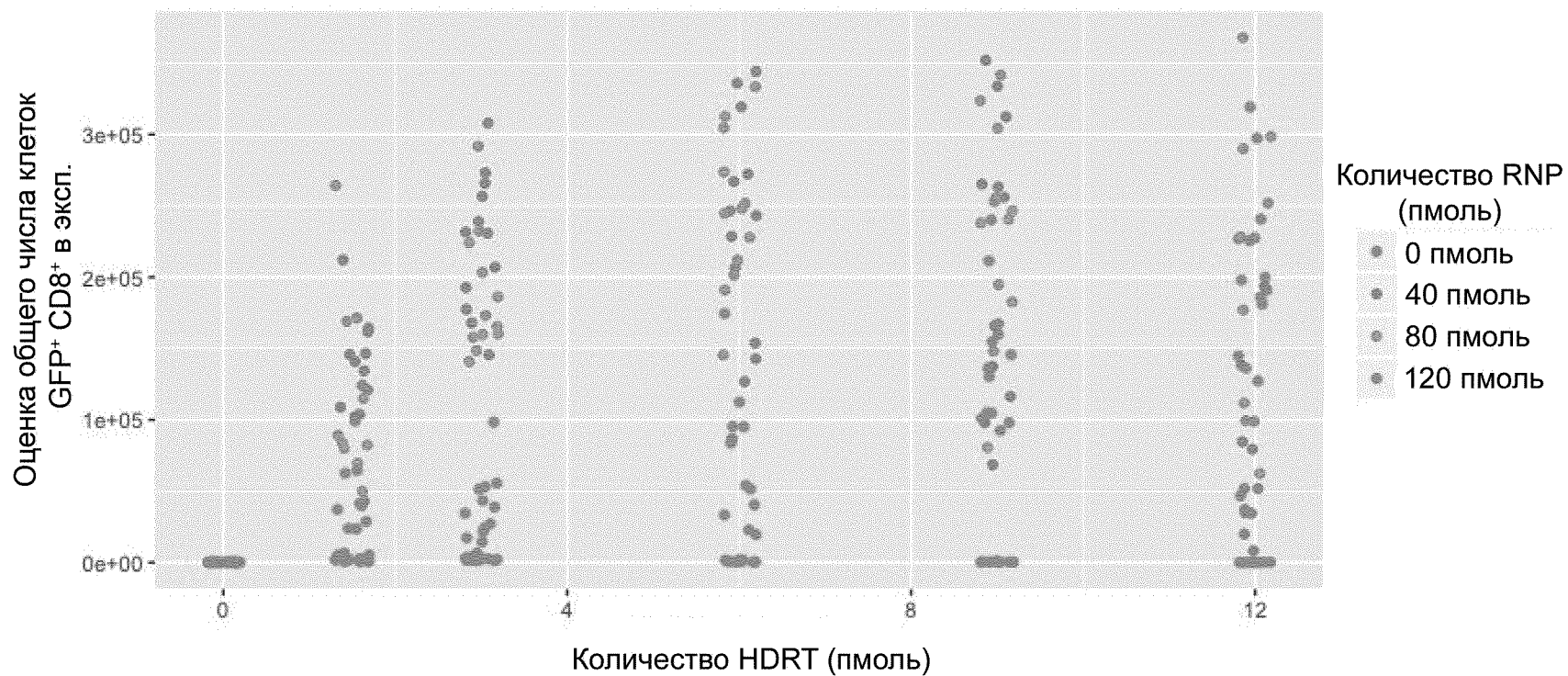
Фиг. 3

Отношение Cas9 к ДНК-матрицы



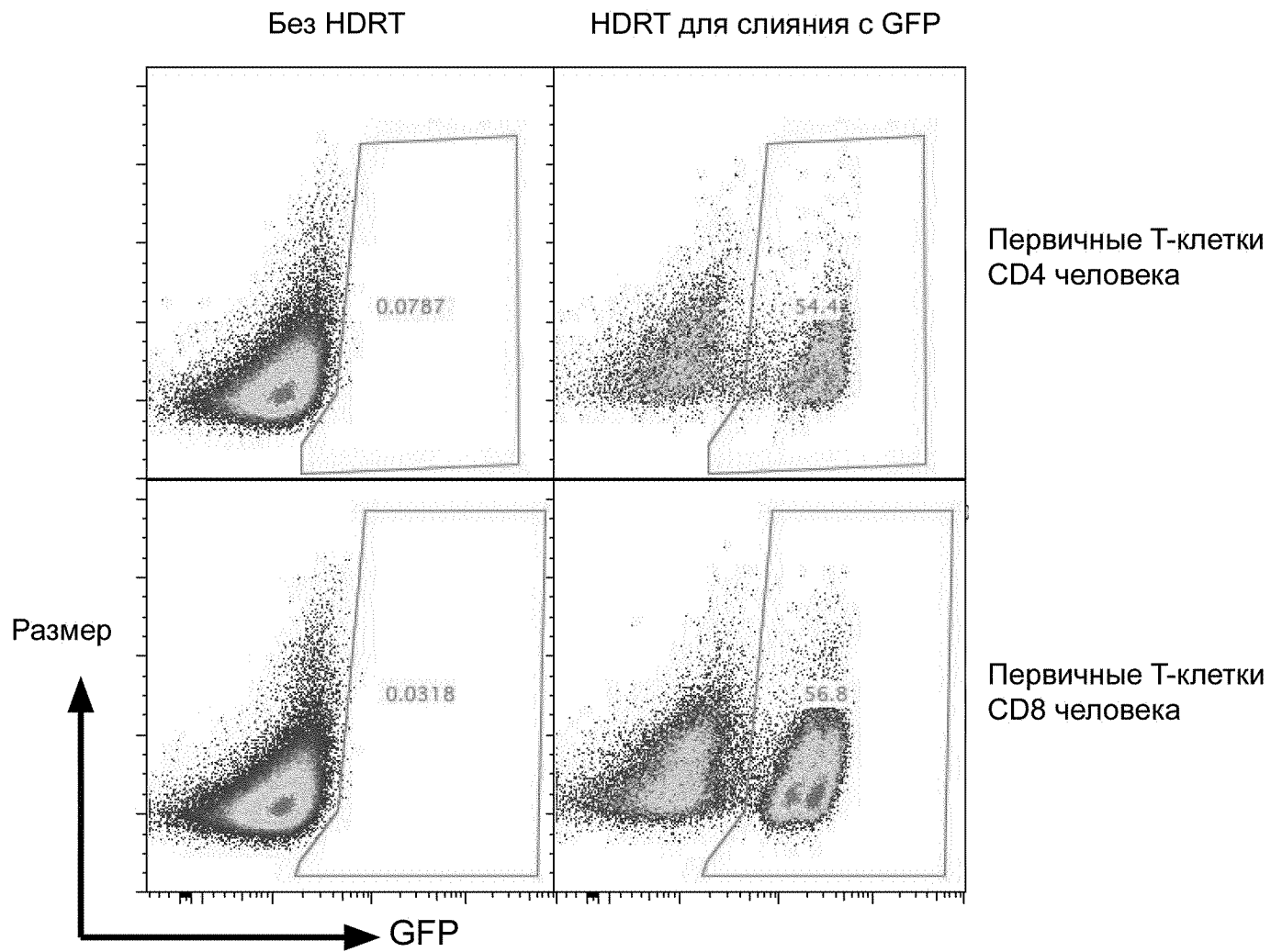
Фиг. 4

Молярное соотношение уравнивает потерю жизнеспособности и эффективность



5/35

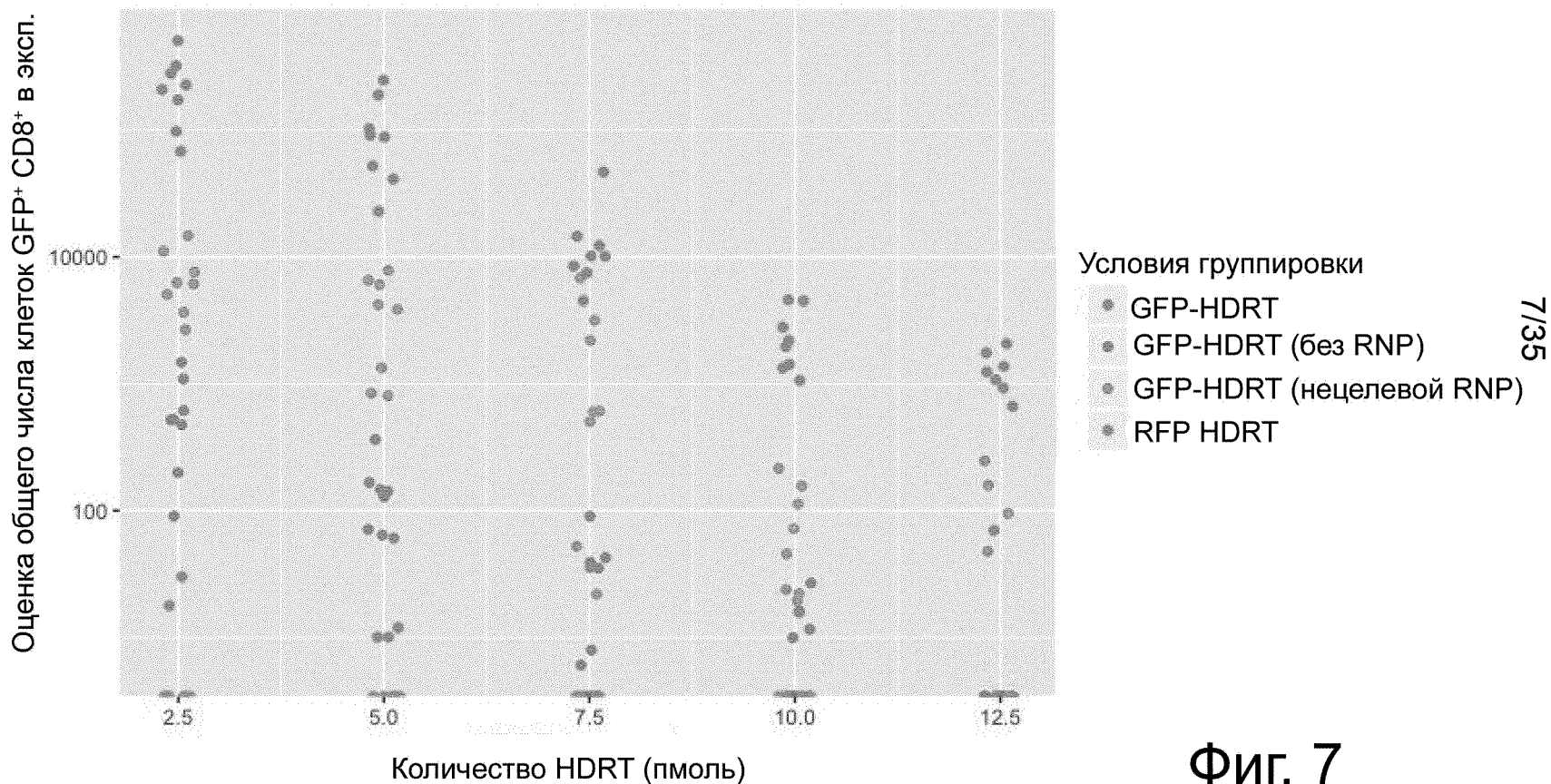
Фиг. 5



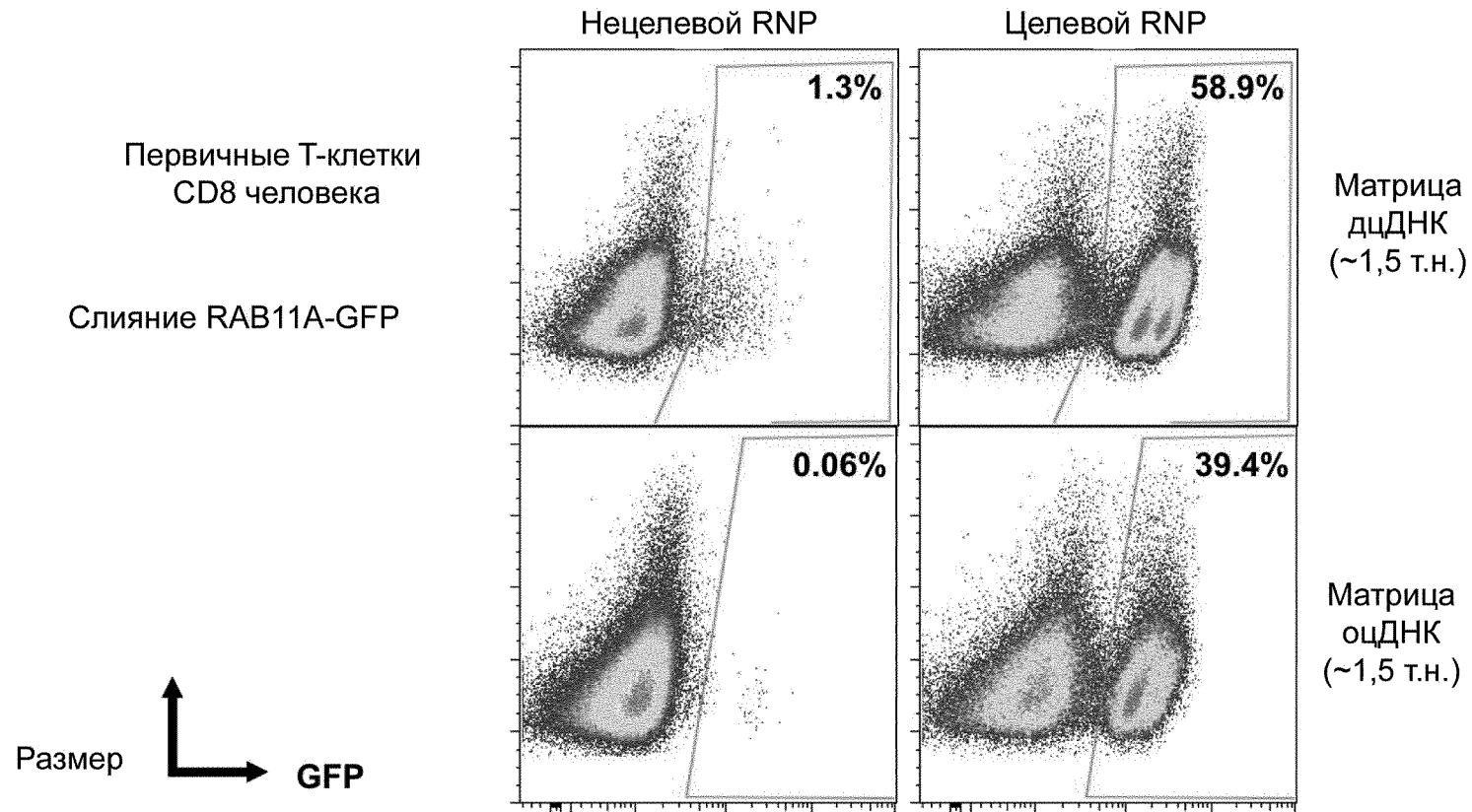
6/35

Фиг. 6

Но матрицы из дцДНК вызывают небольшой уровень нецелевого встраивания



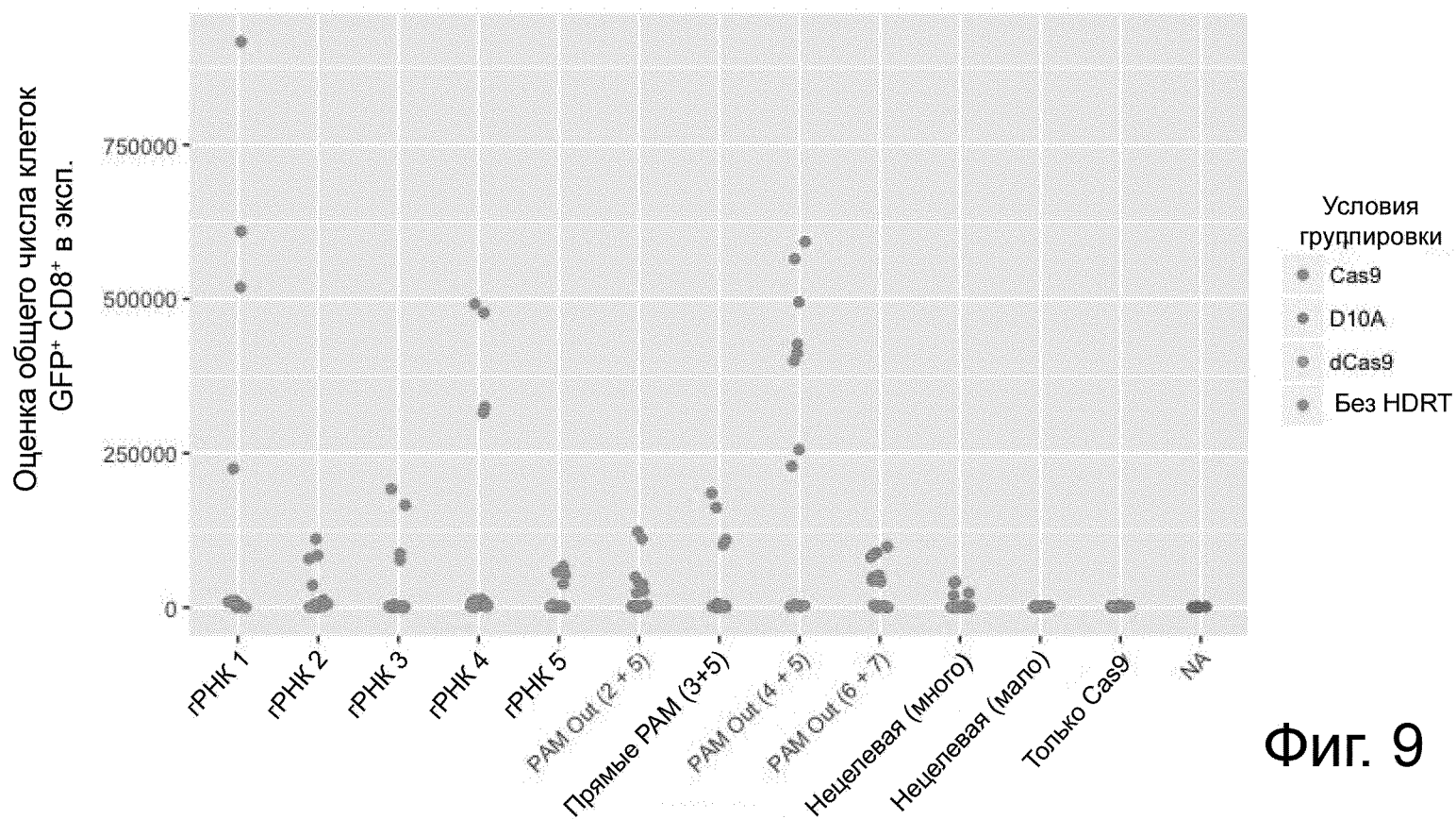
Уменьшение нецелевого встраивания при использовании длинной оцДНК



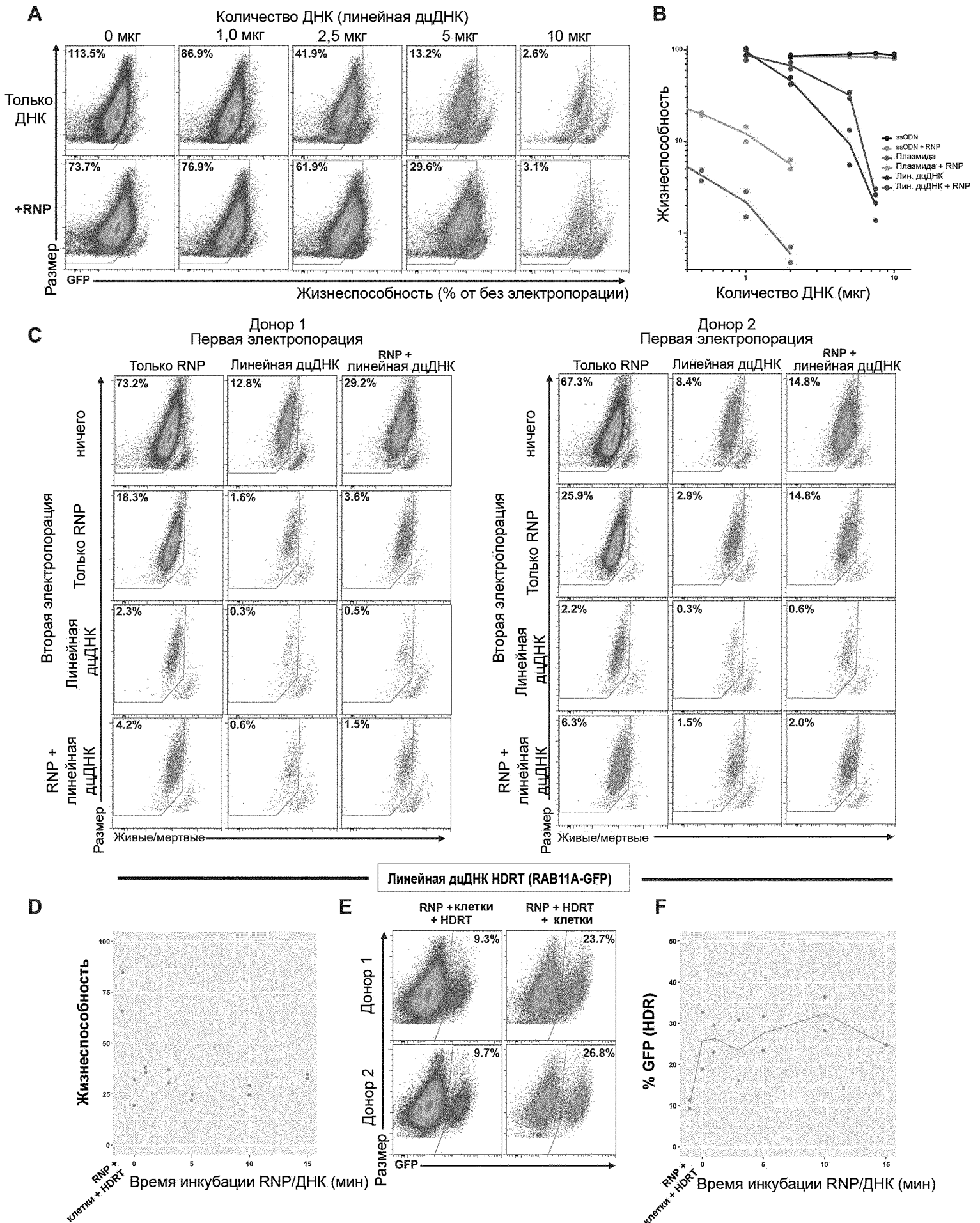
8/35

Фиг. 8

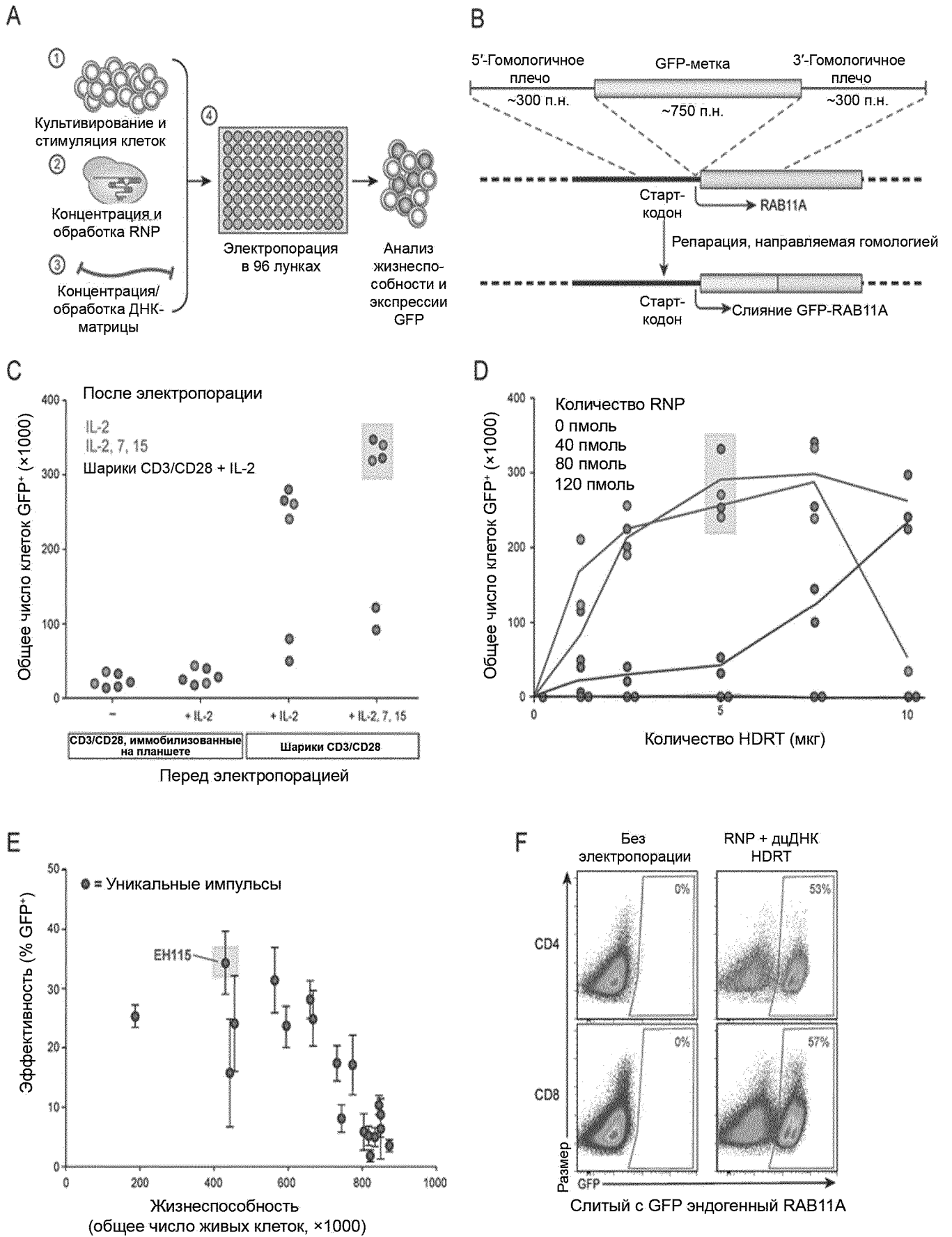
**Никаза Cas9 предотвращает нецелевые разрывы ДНК,
но обеспечивает высокую эффективность вставки**



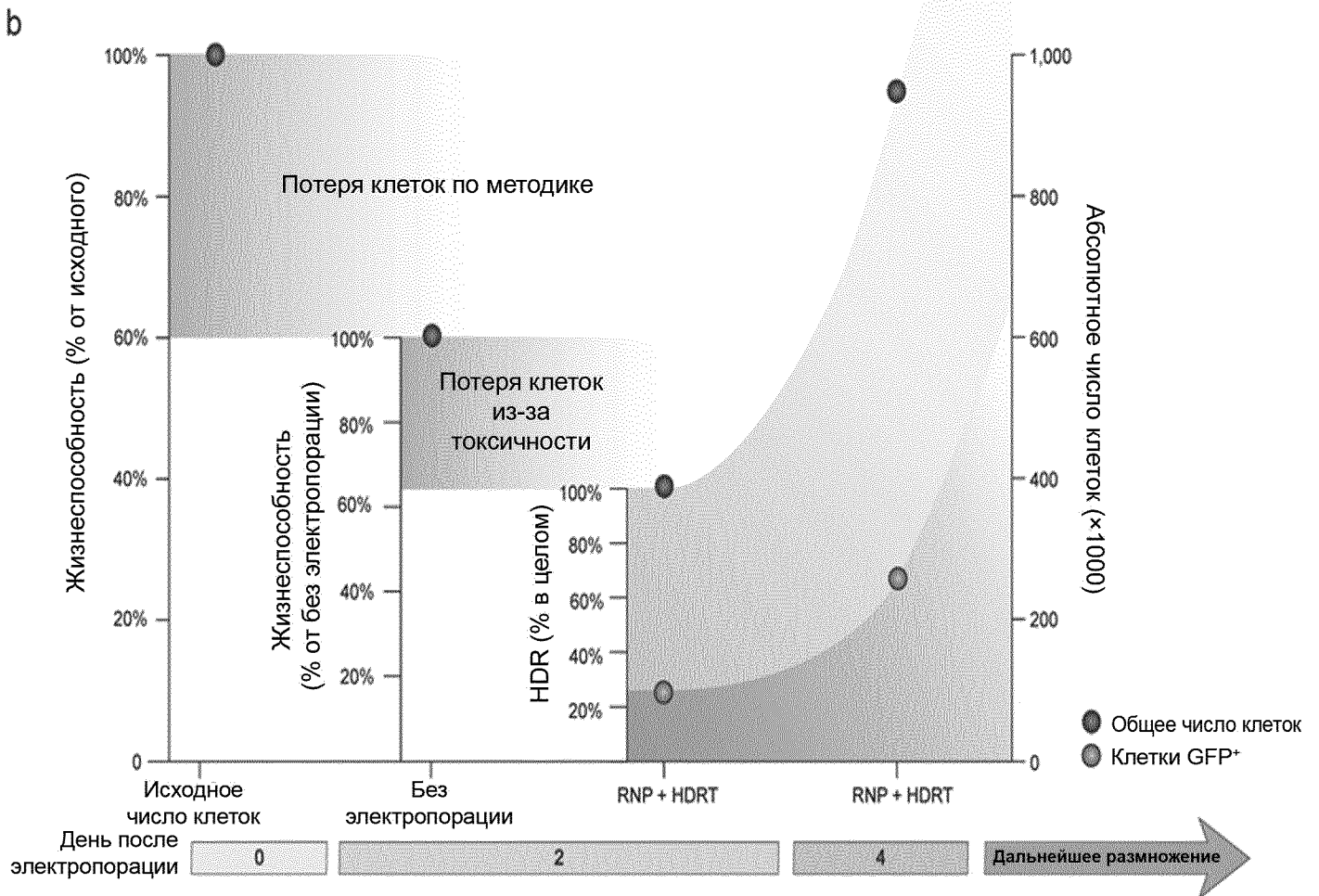
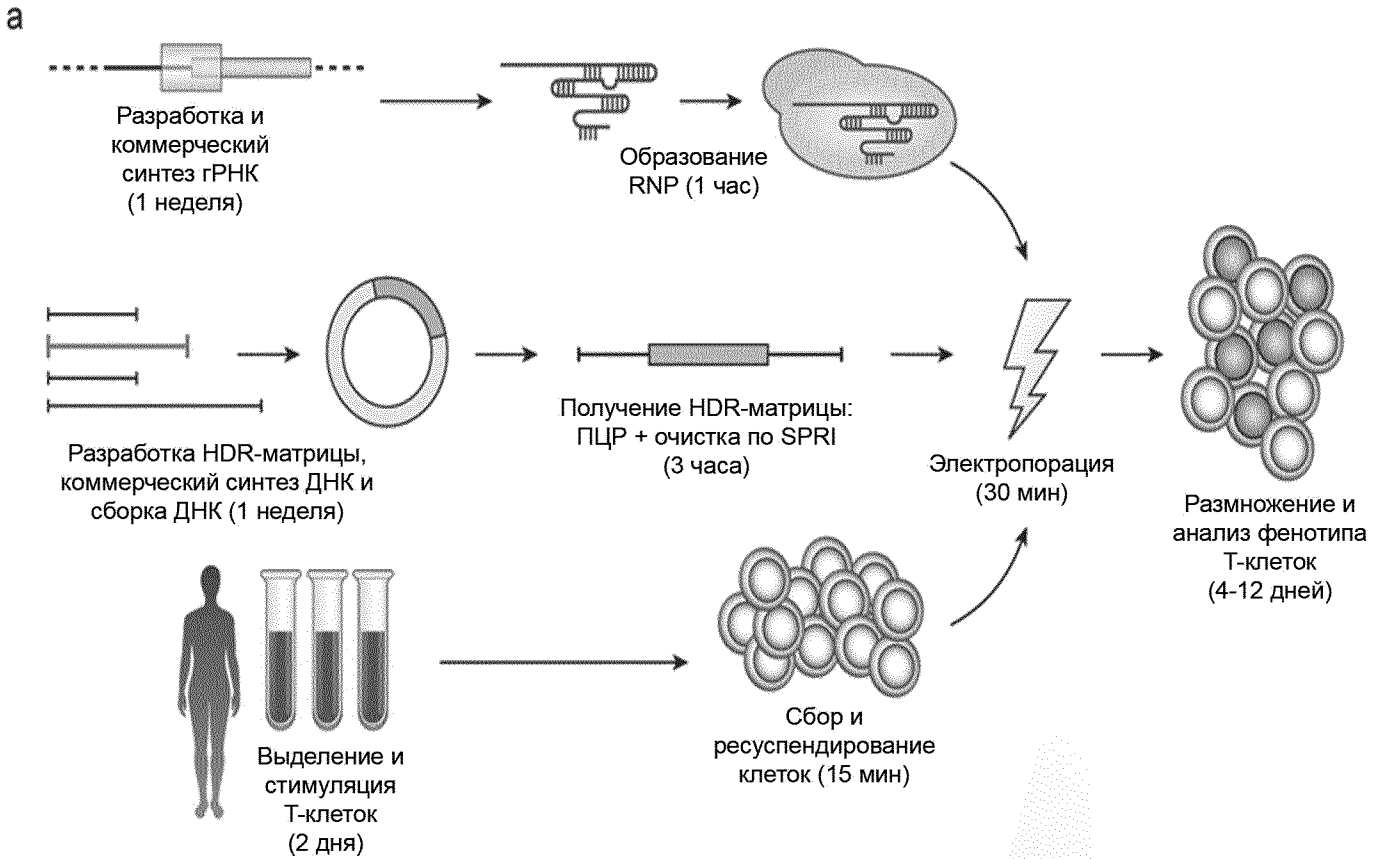
Фиг. 9



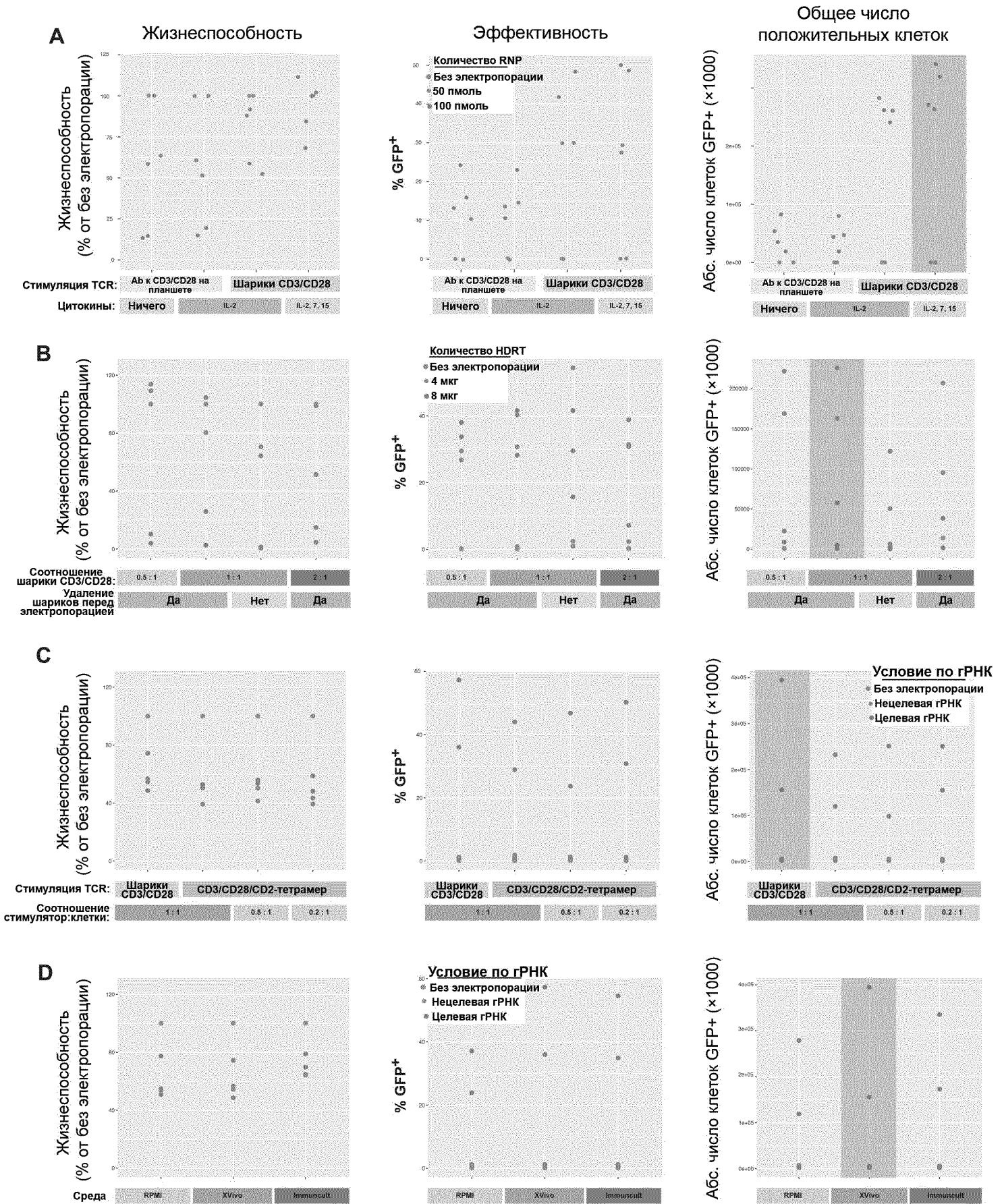
Фиг. 10



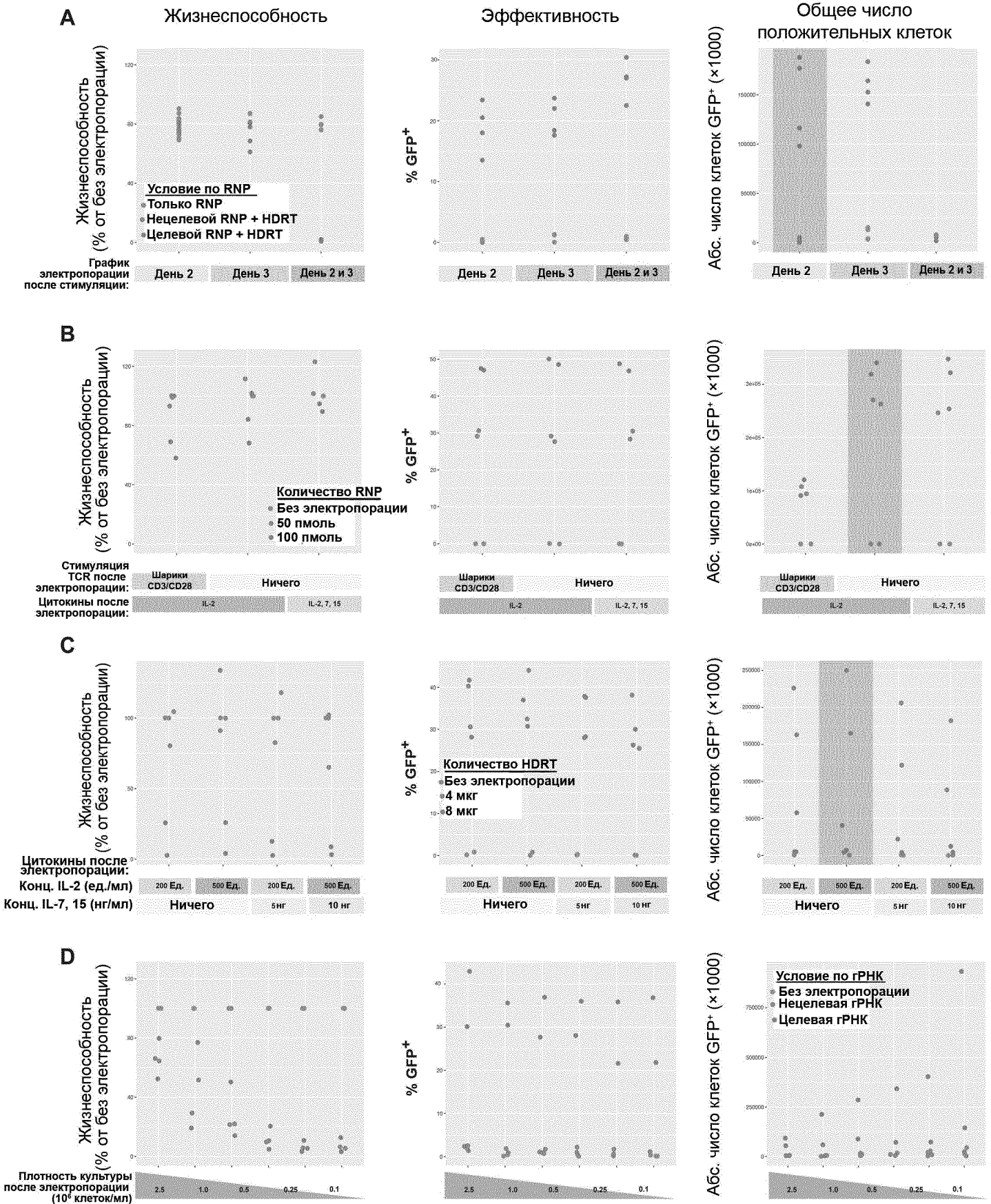
Фиг. 11



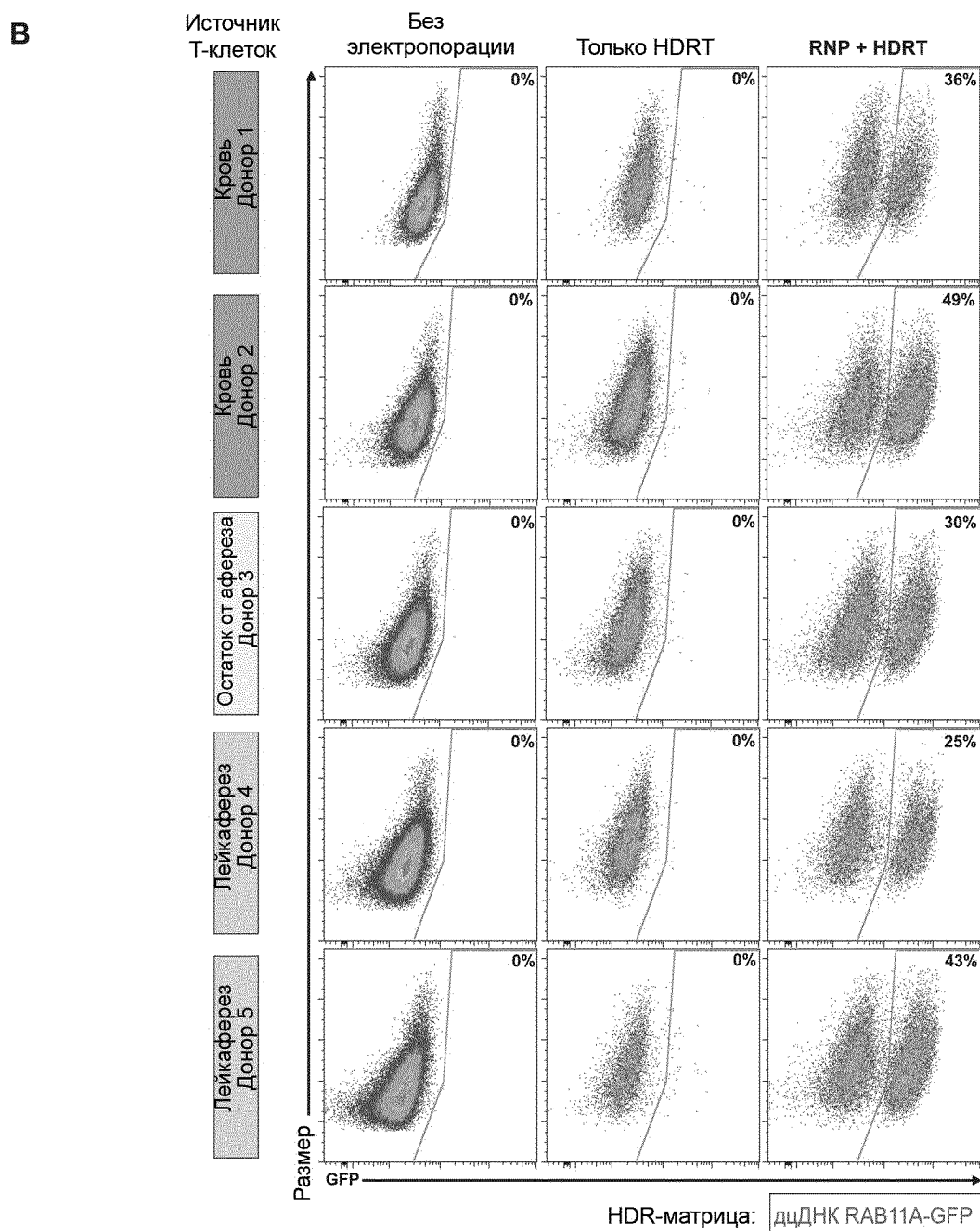
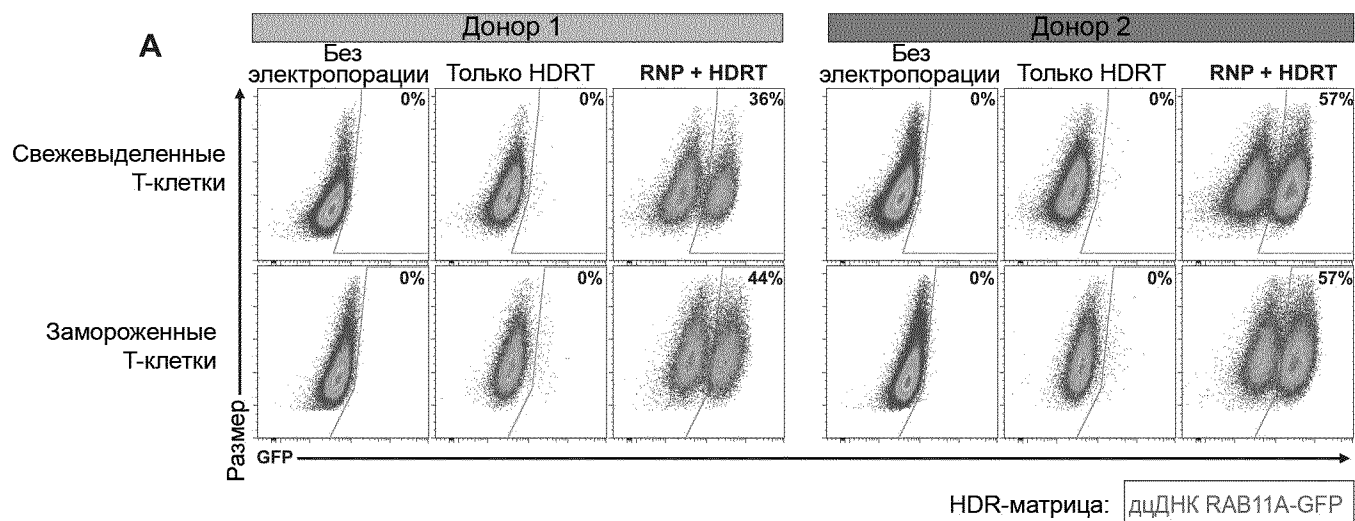
Фиг. 12



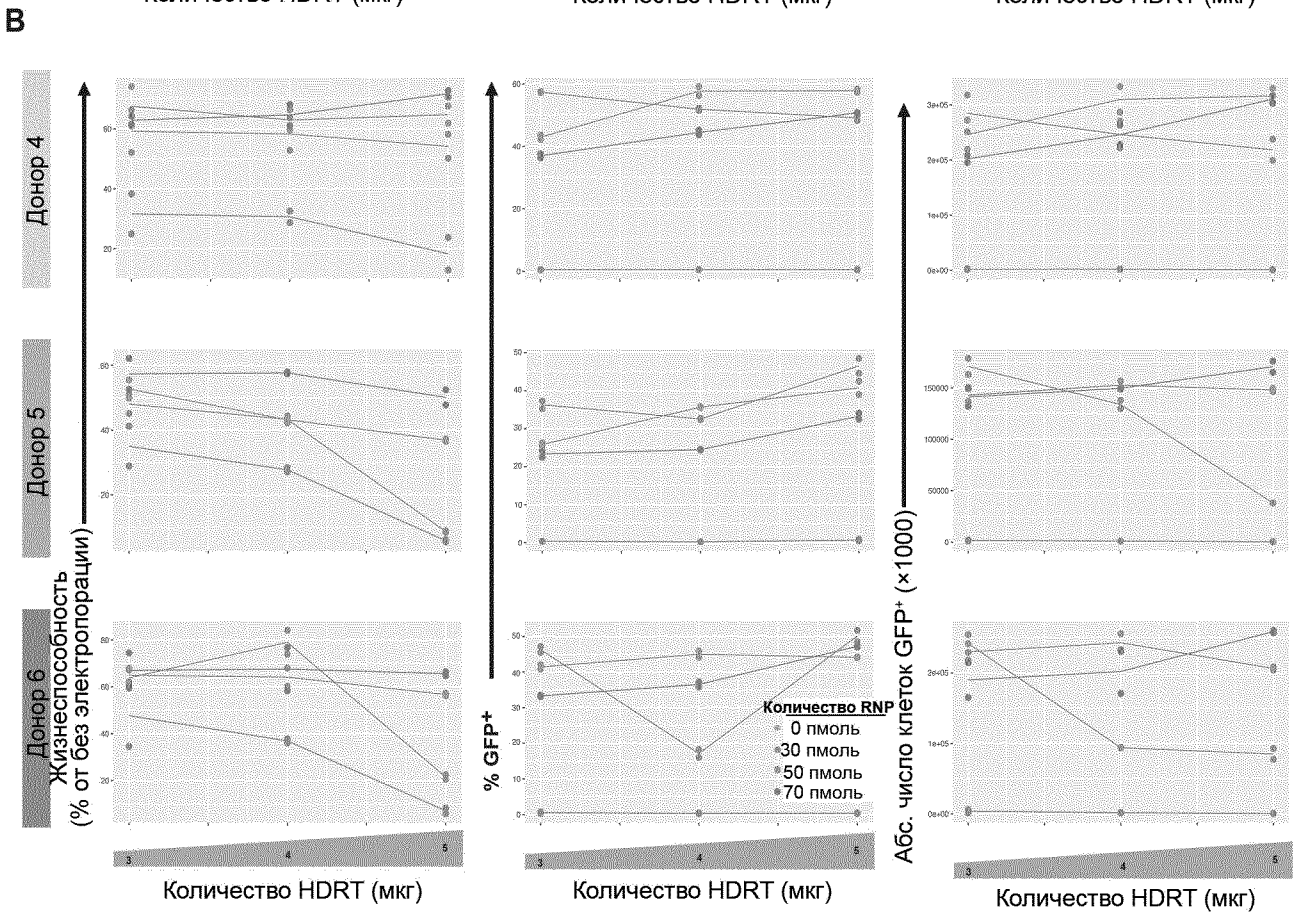
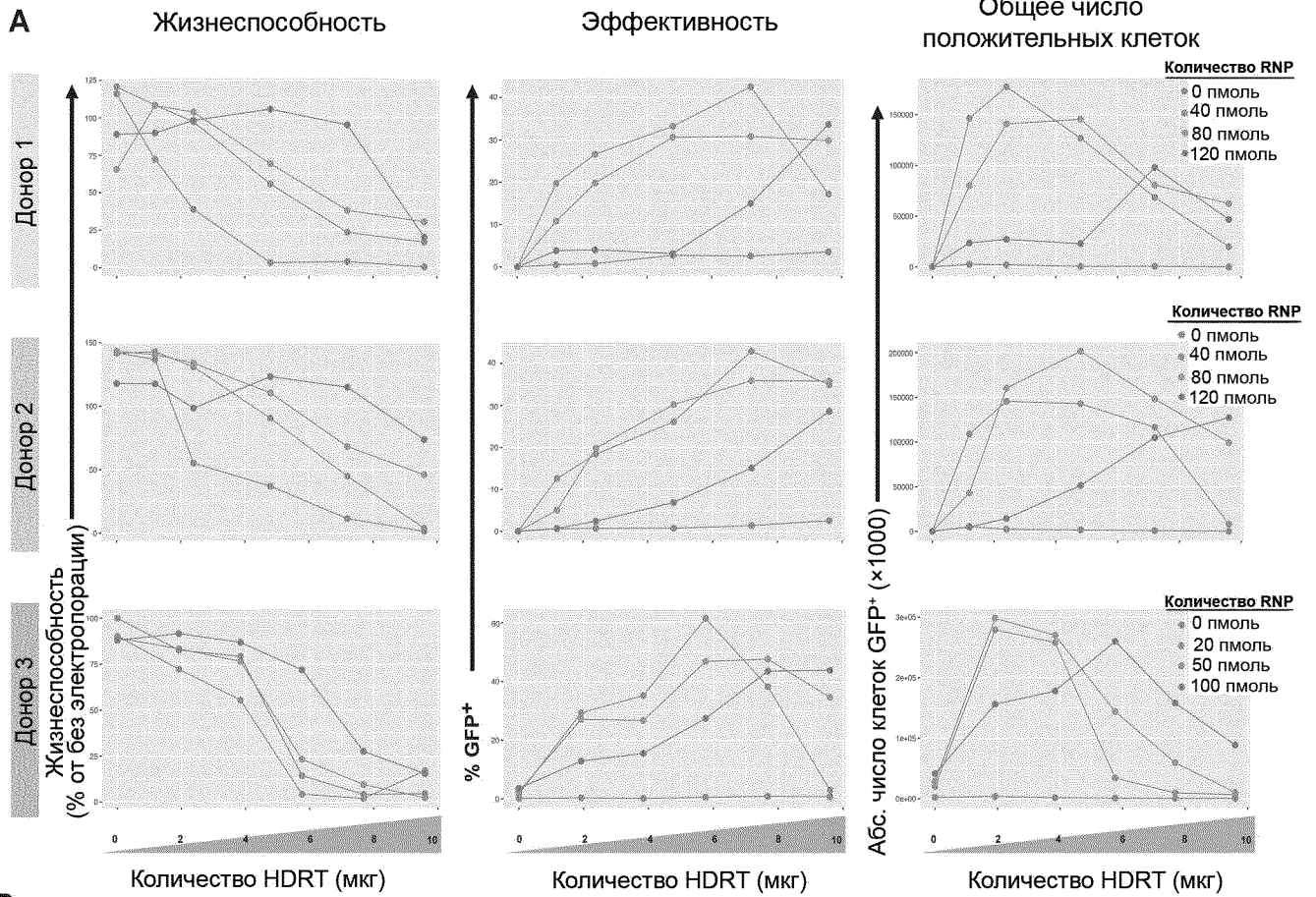
Фиг. 13



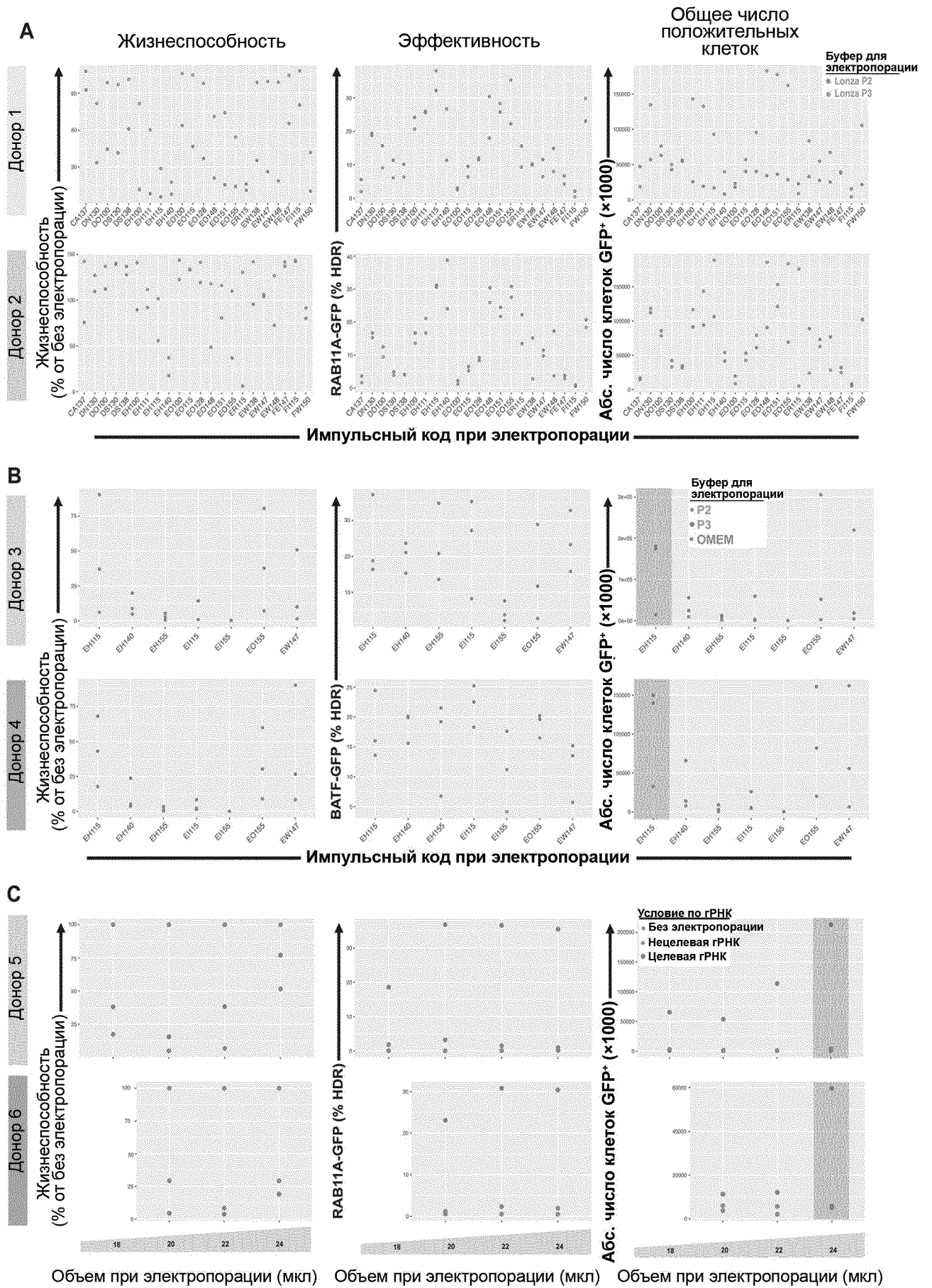
Фиг. 14



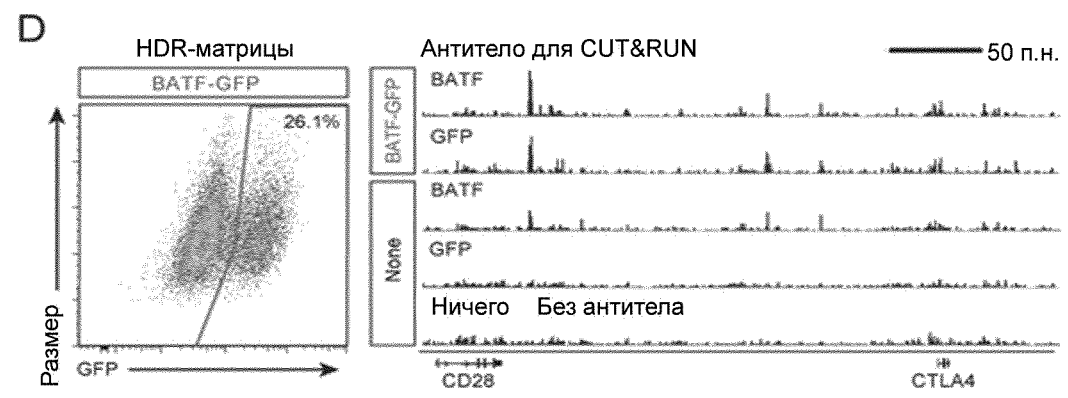
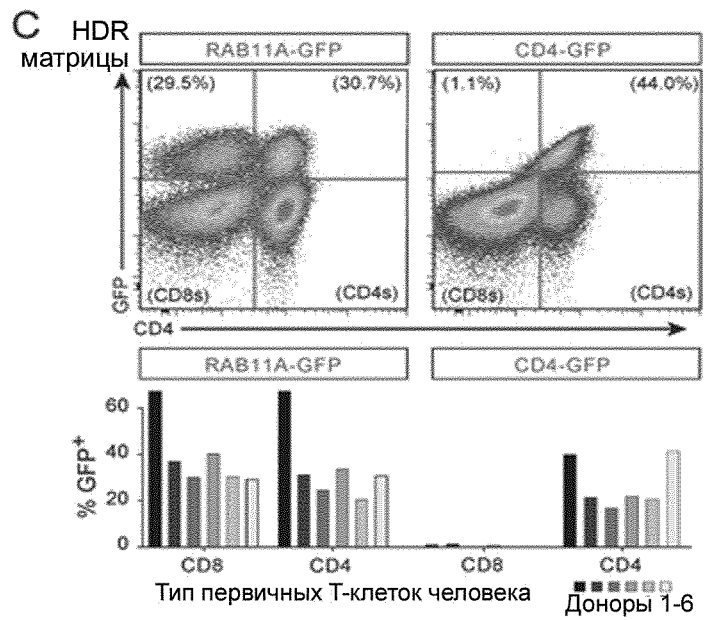
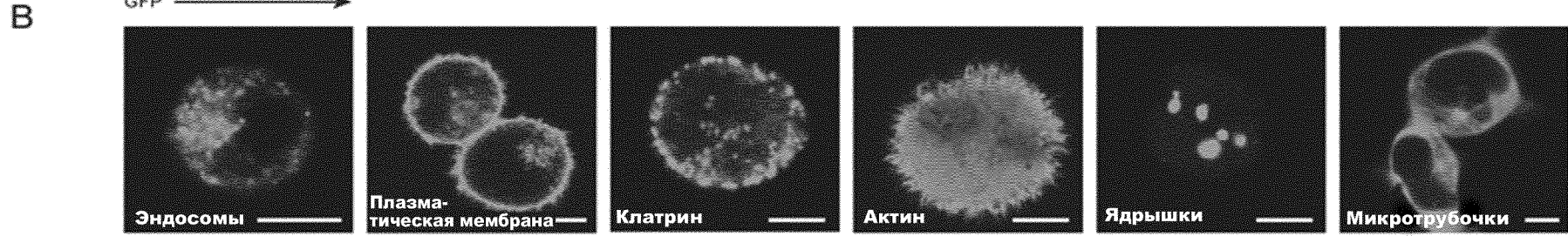
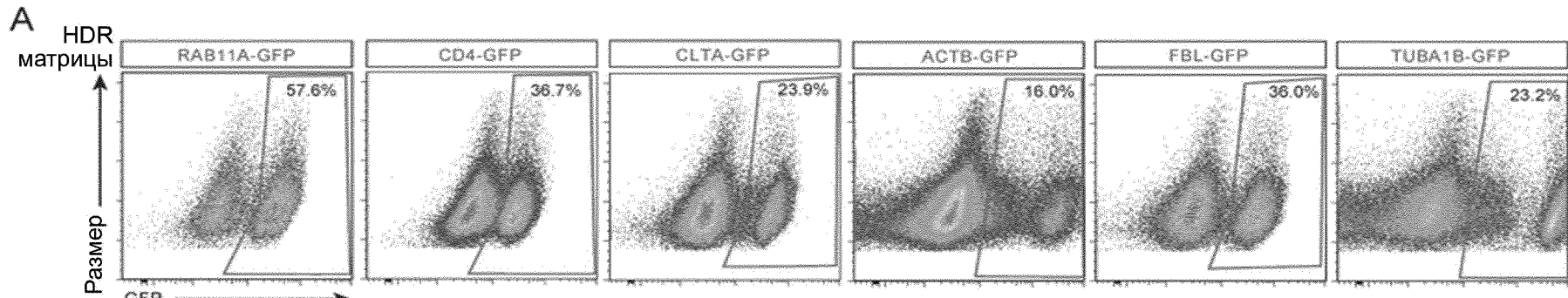
Фиг. 15



Фиг. 16

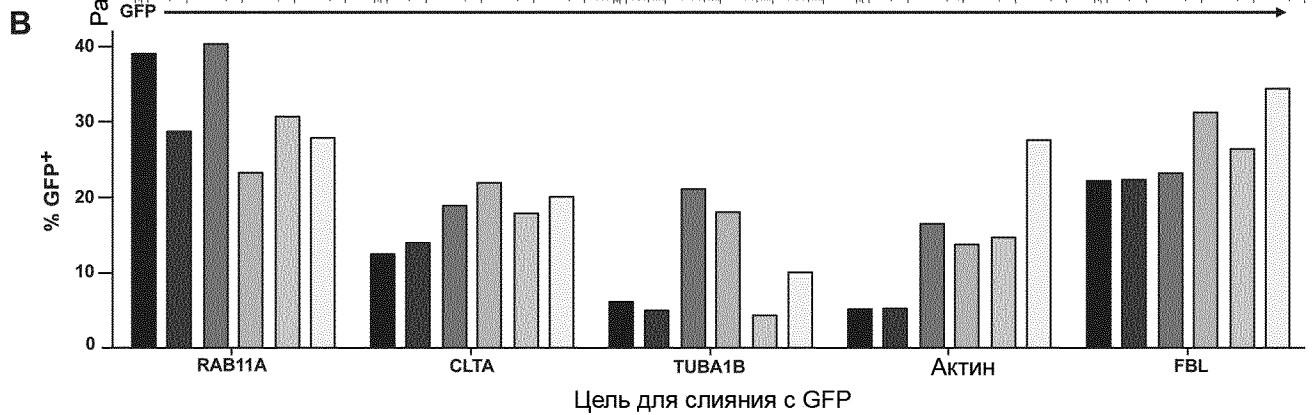
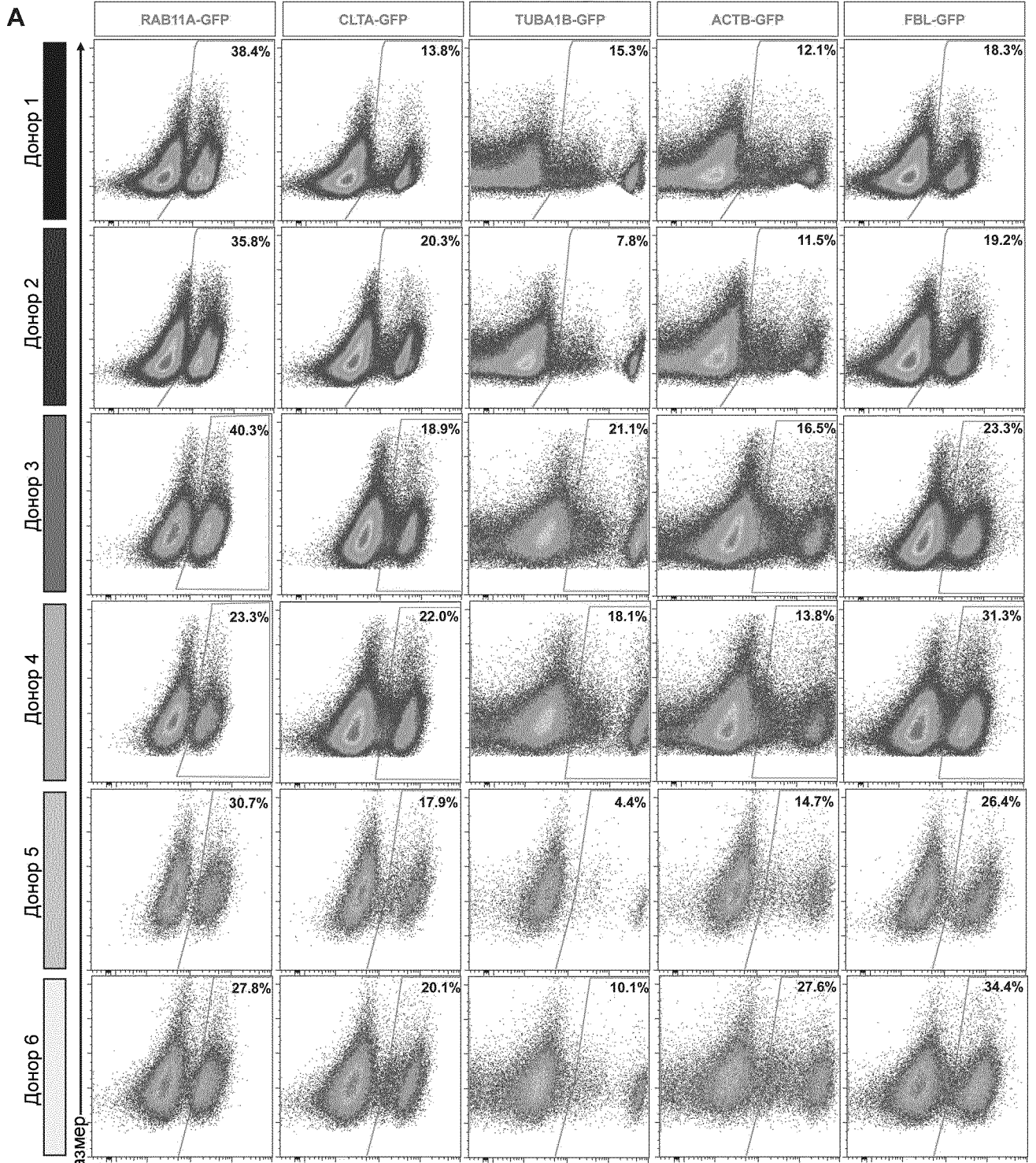


Фиг. 17



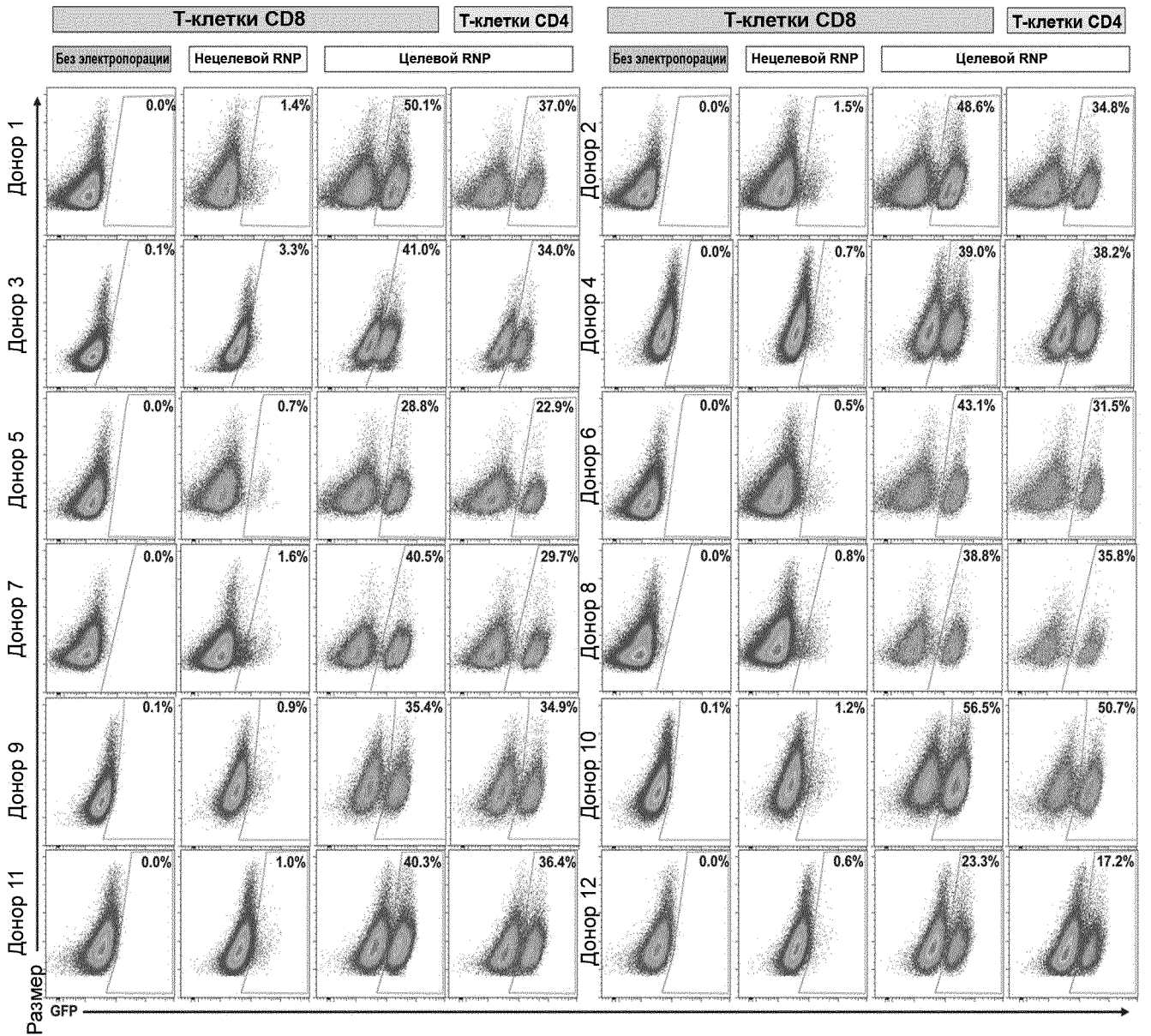
Фиг. 18

HDR-матрица

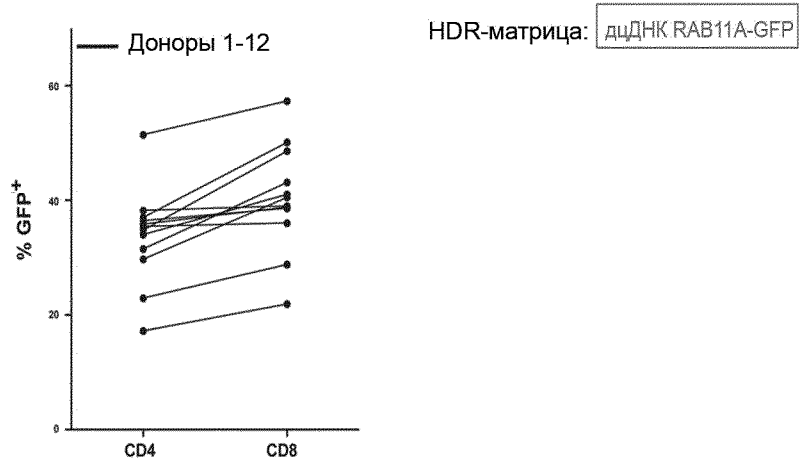


Фиг. 19

A

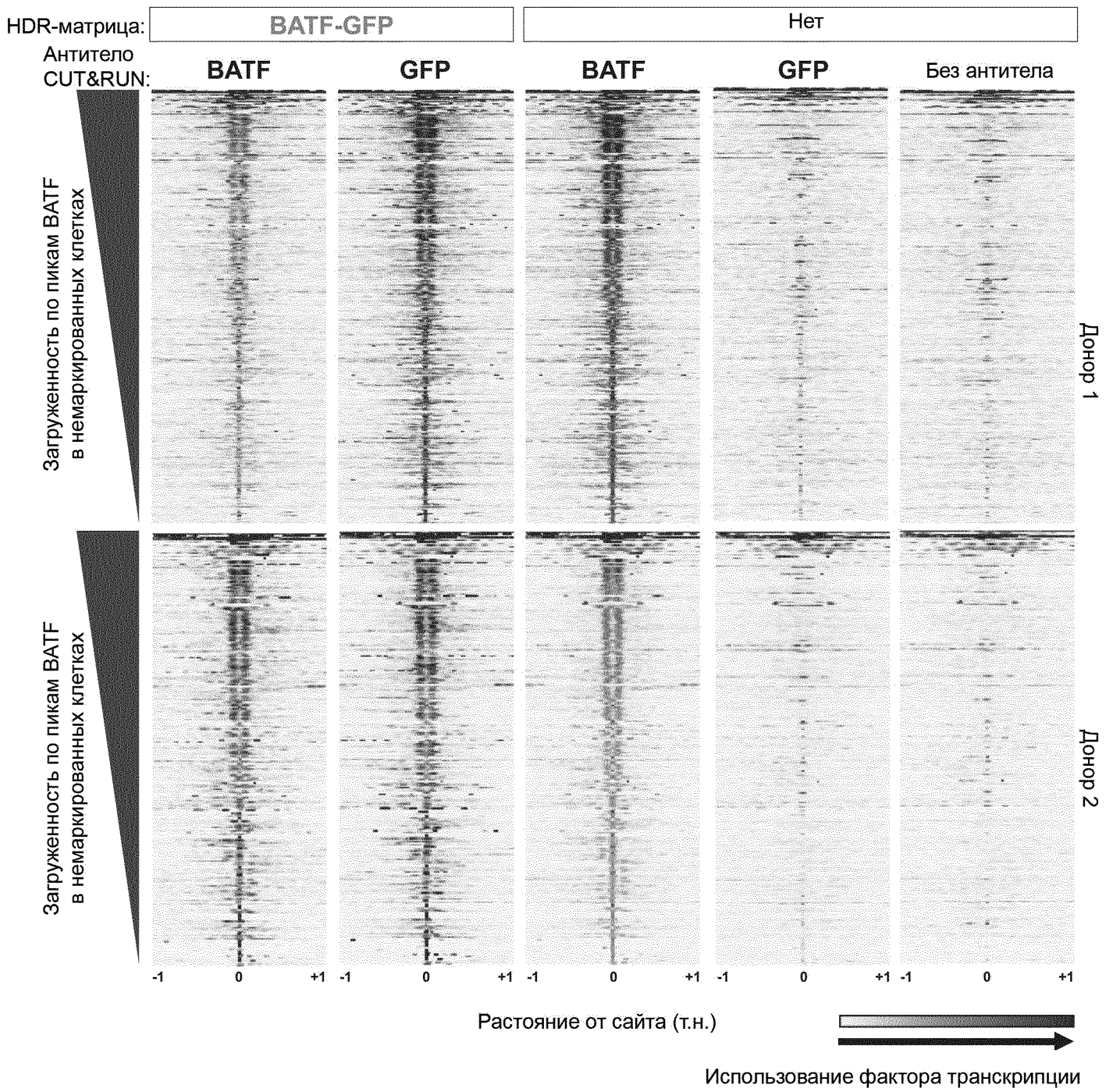


B

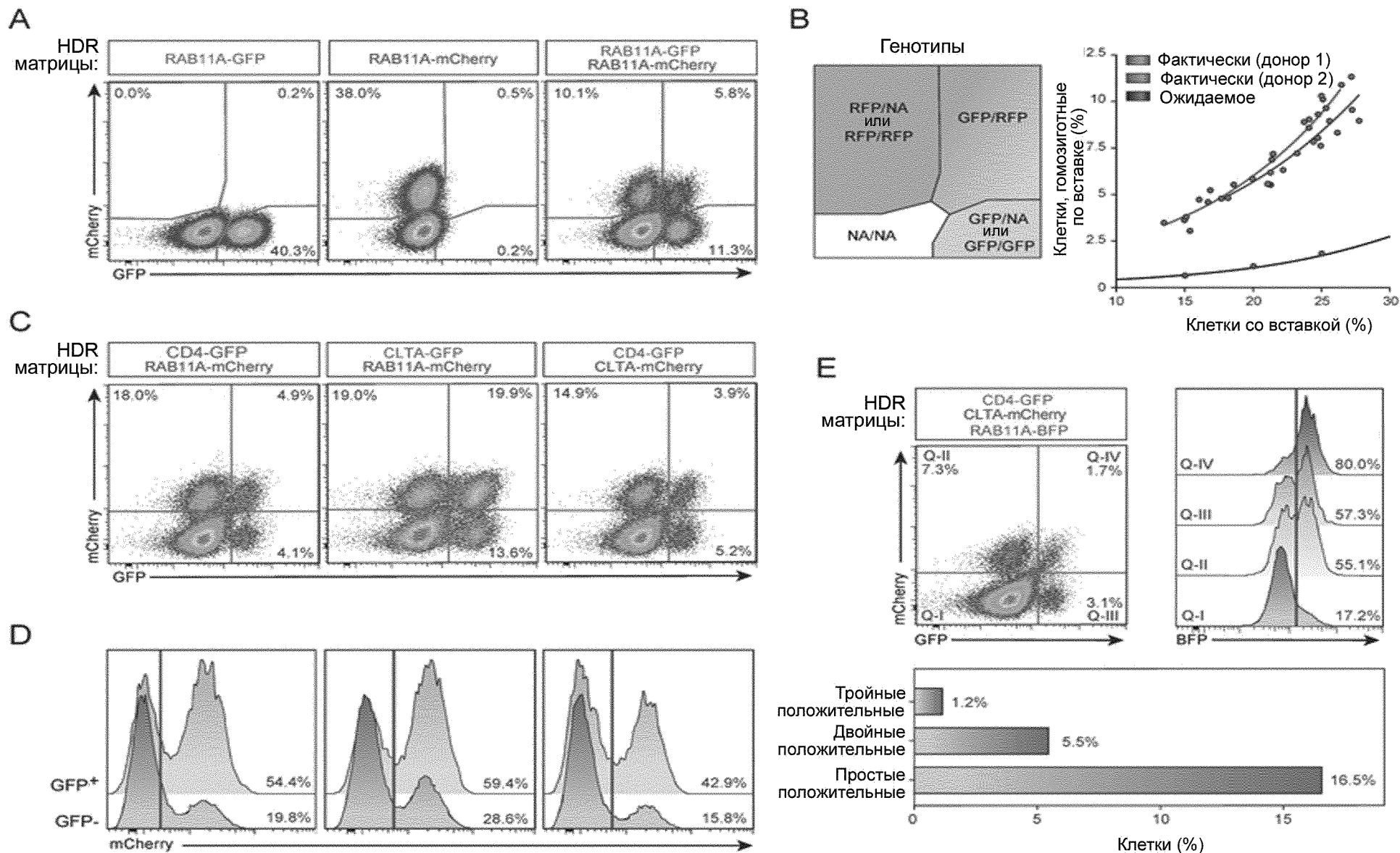


Тип первичных Т-клеток человека

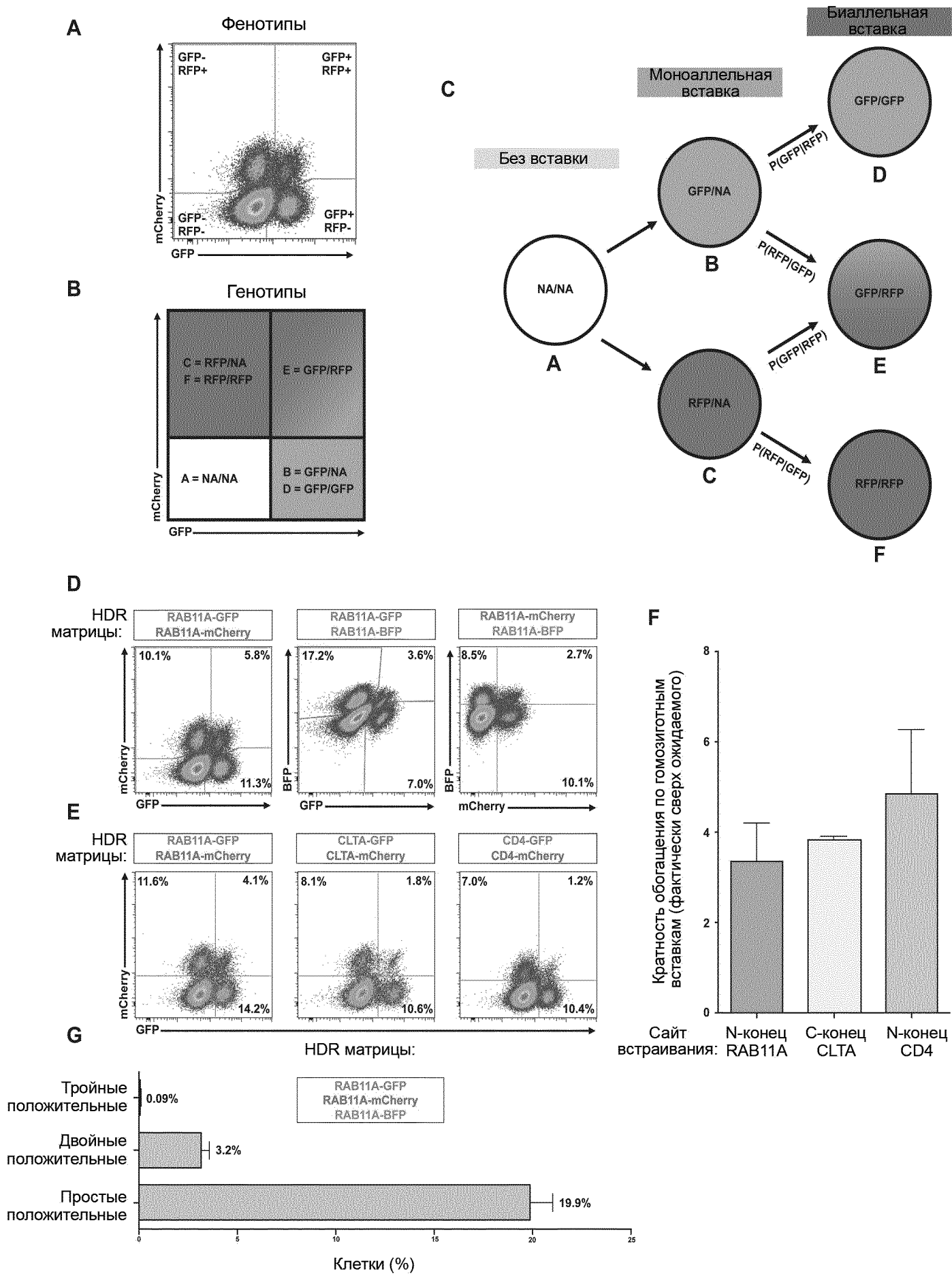
Фиг. 20



Фиг. 21



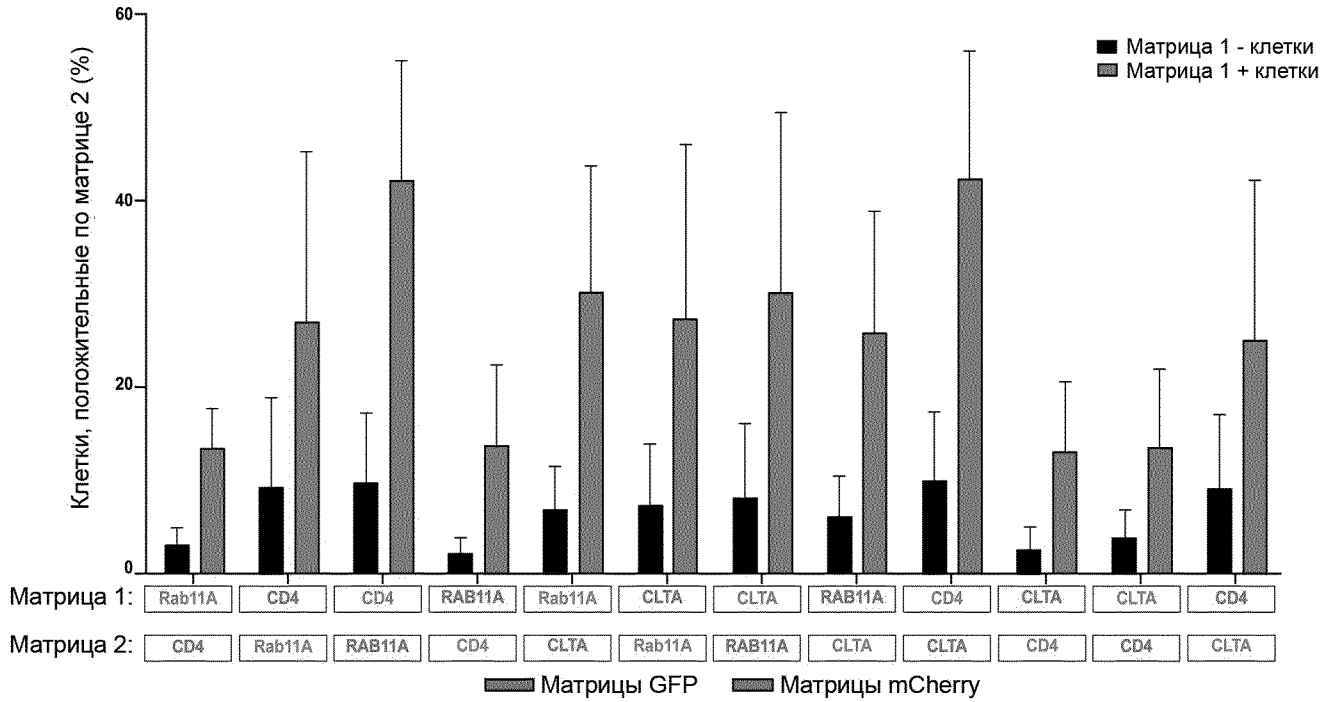
Фиг. 22



Фиг. 23

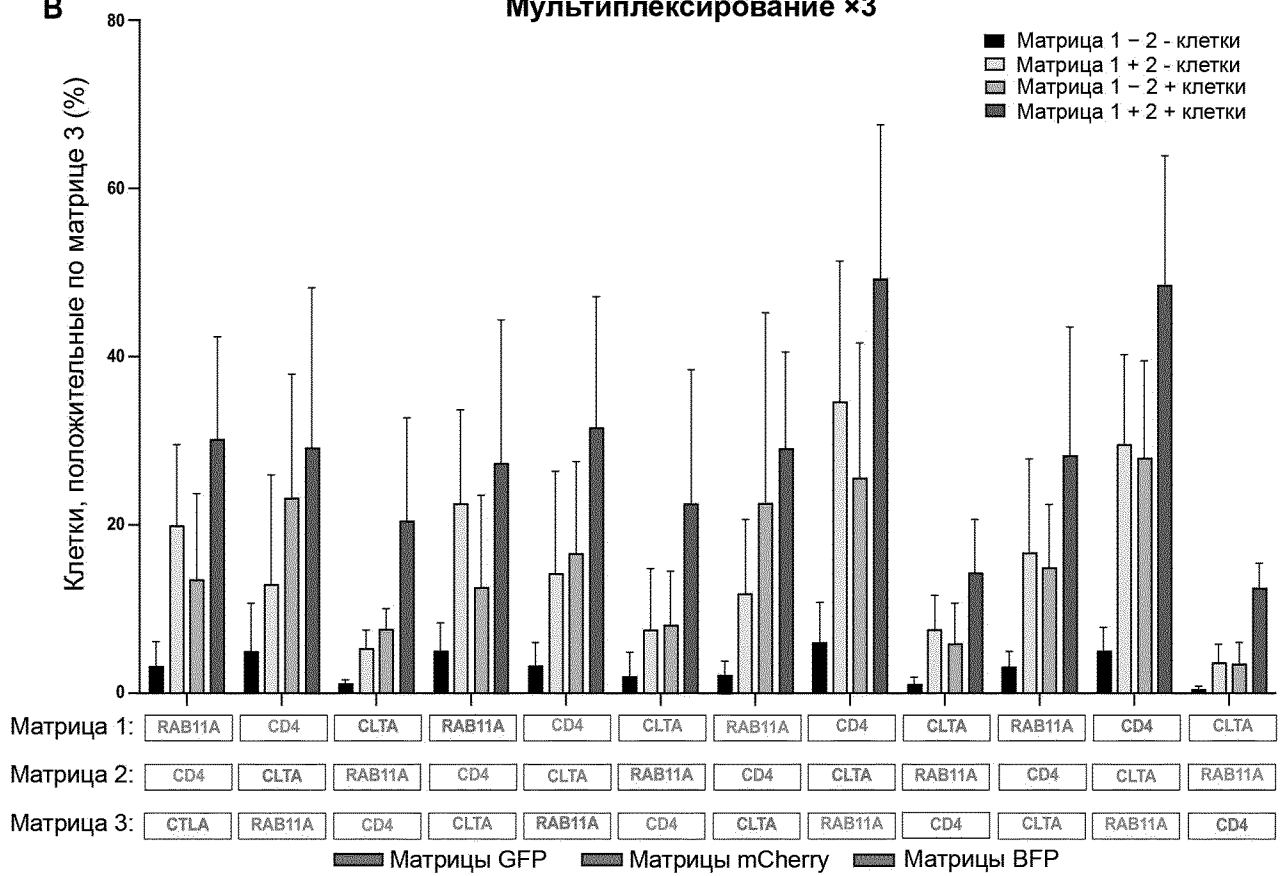
A

Мультиплексирование ×2

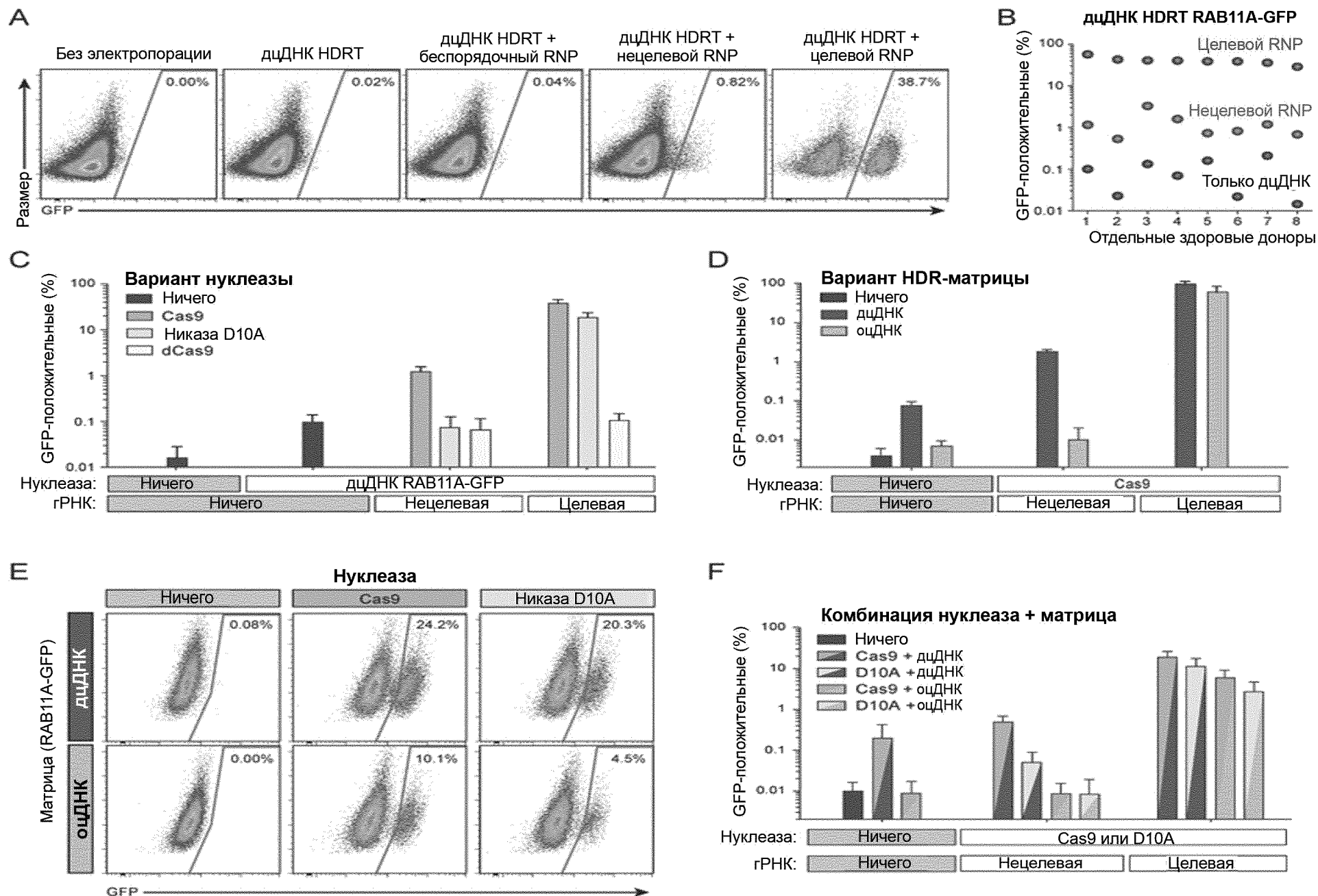


B

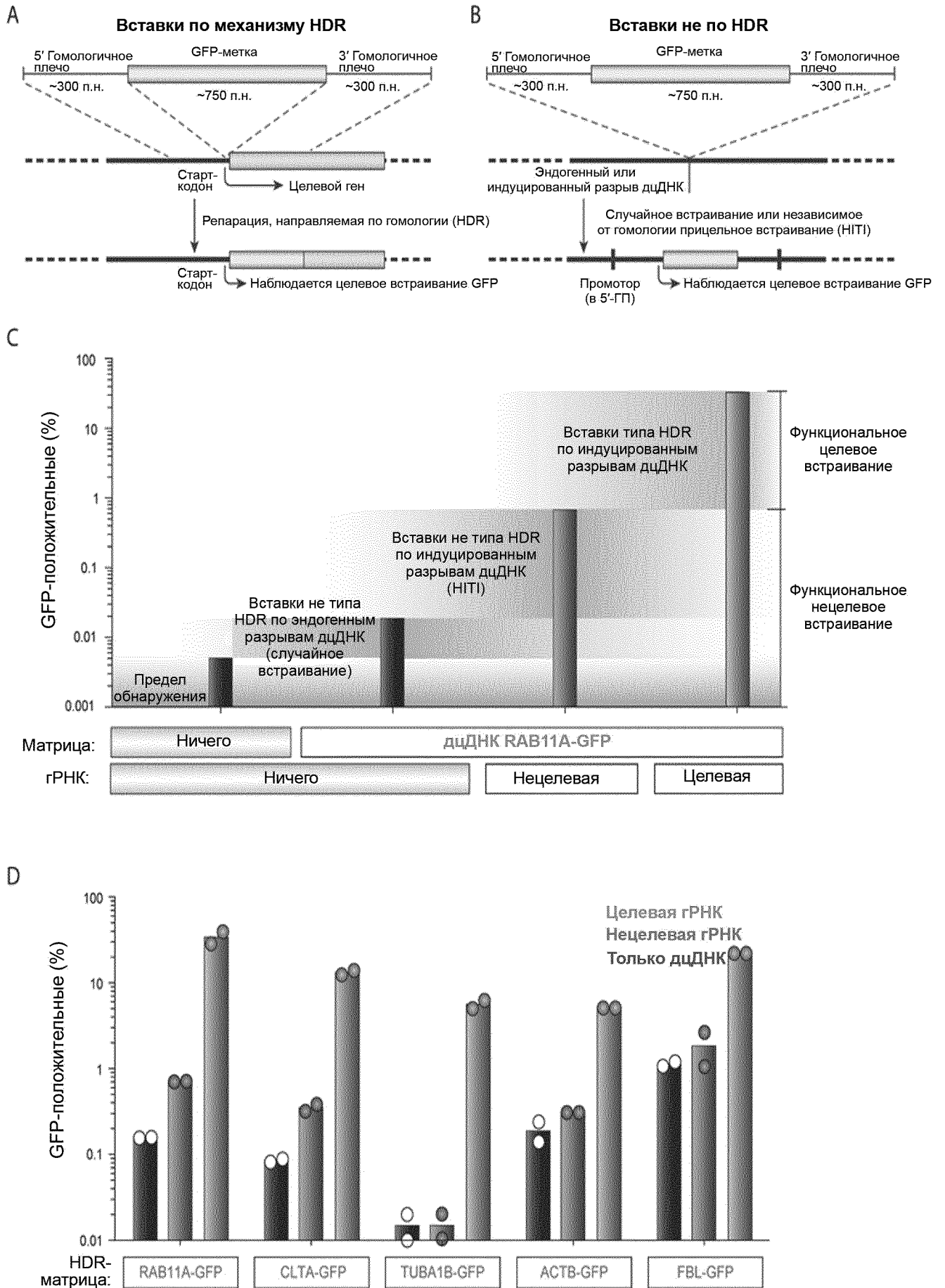
Мультиплексирование ×3



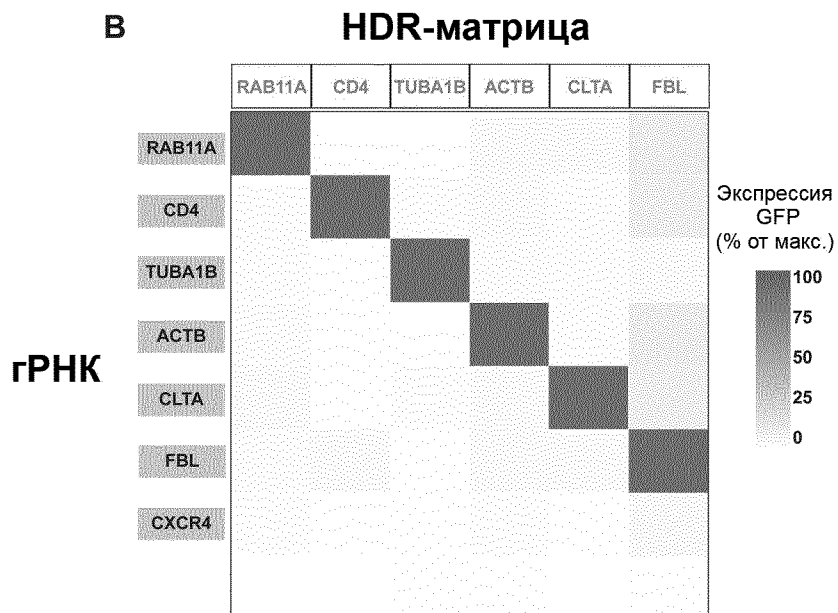
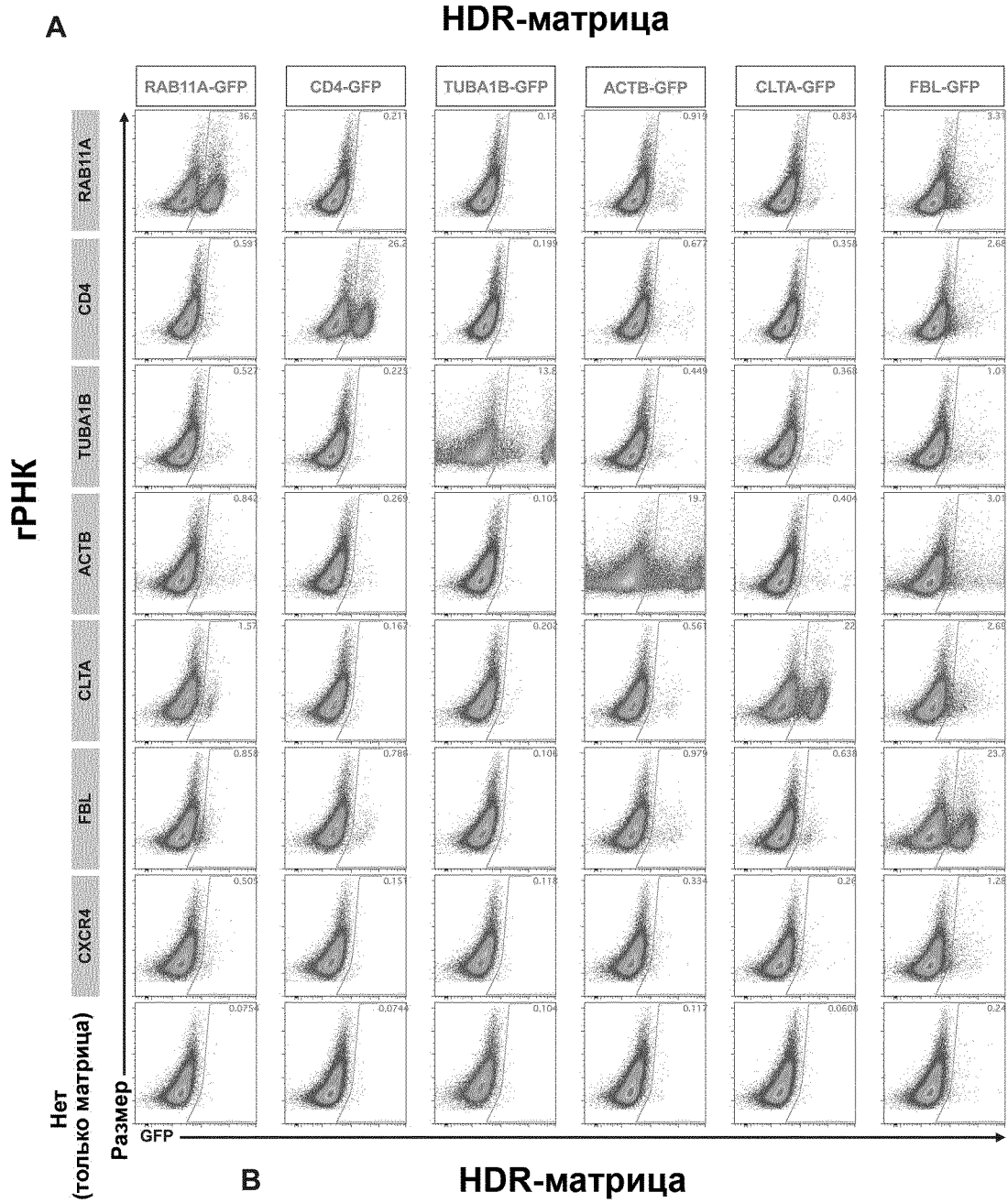
Фиг. 24



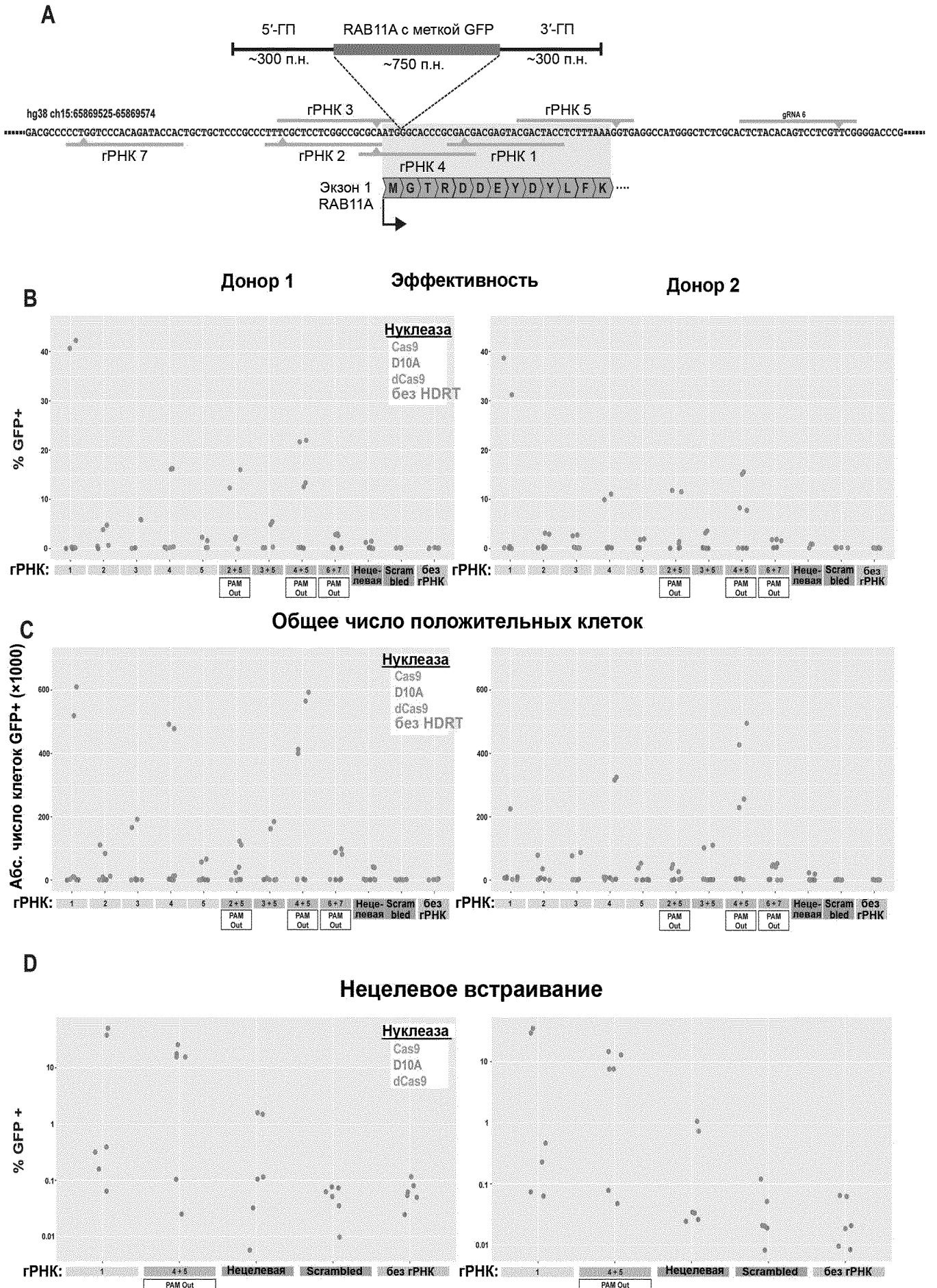
Фиг. 25



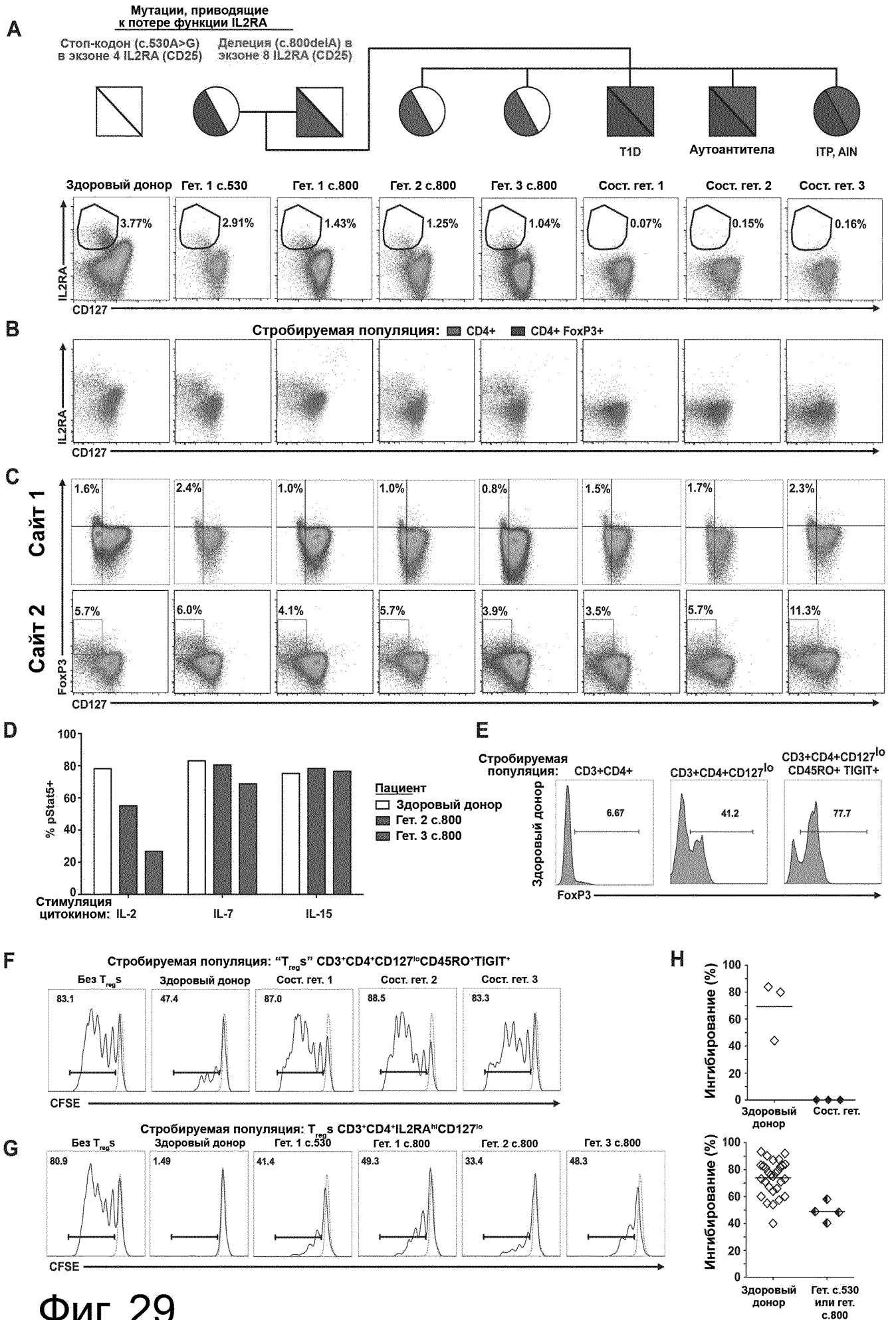
Фиг. 26



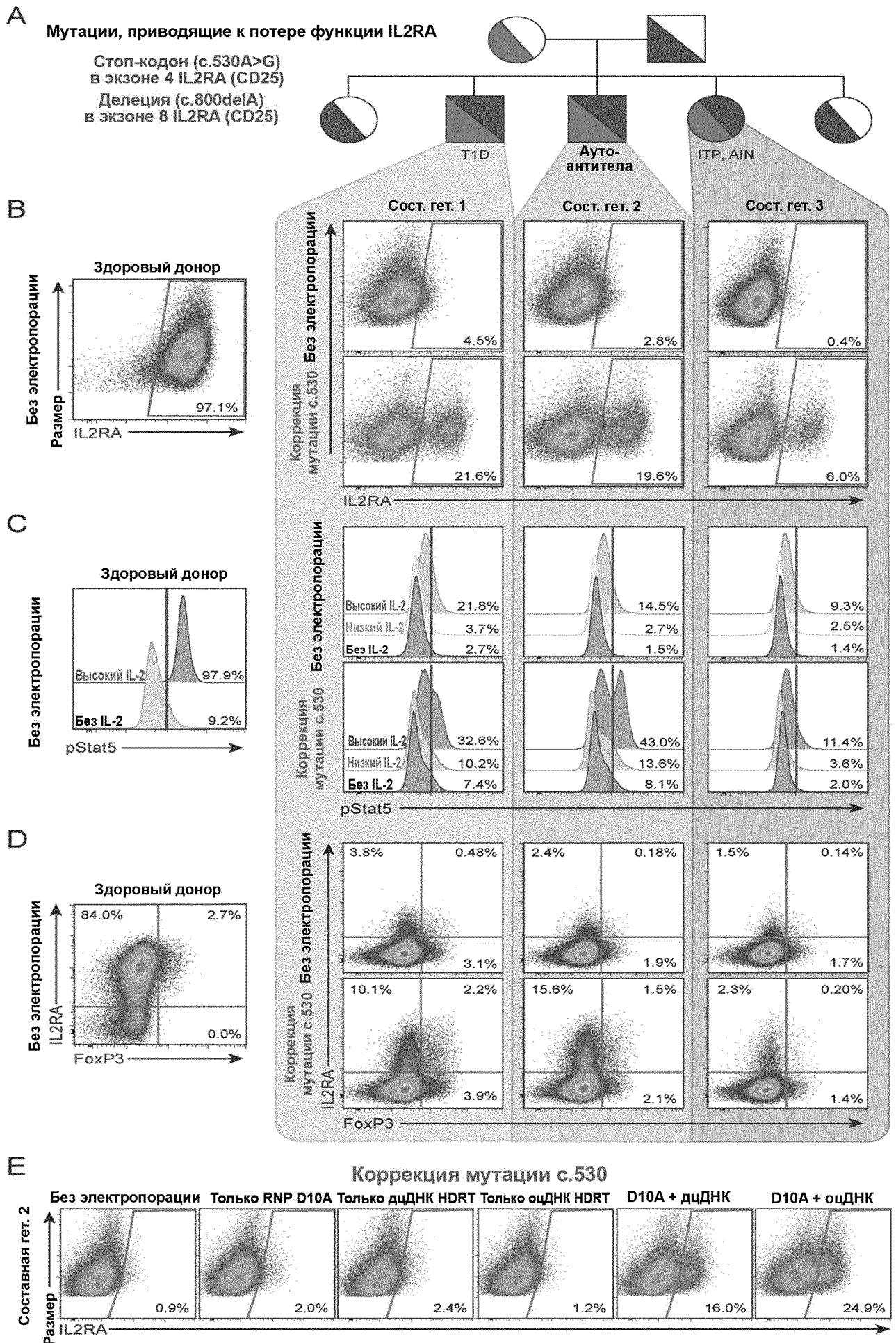
Фиг. 27



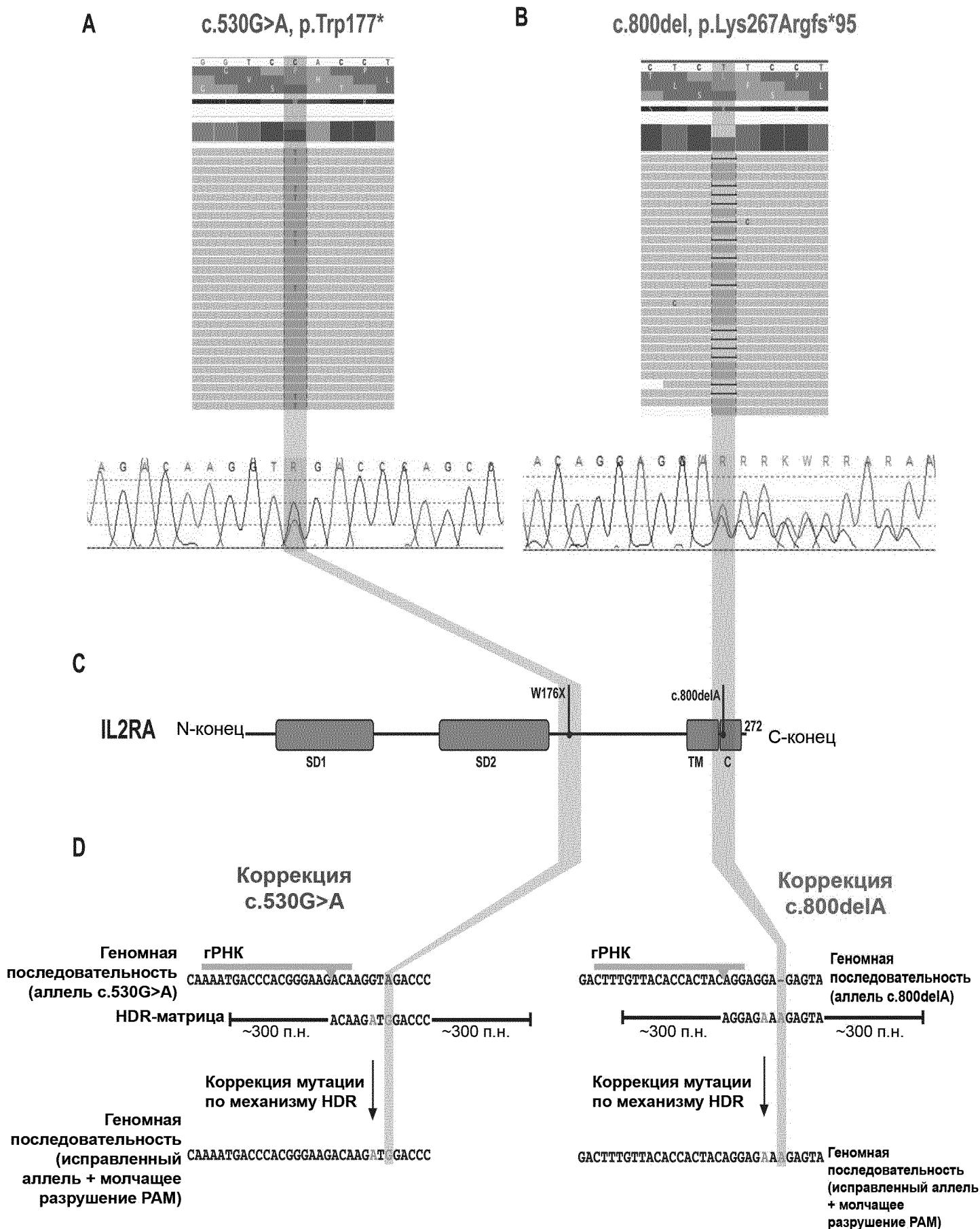
Фиг. 28



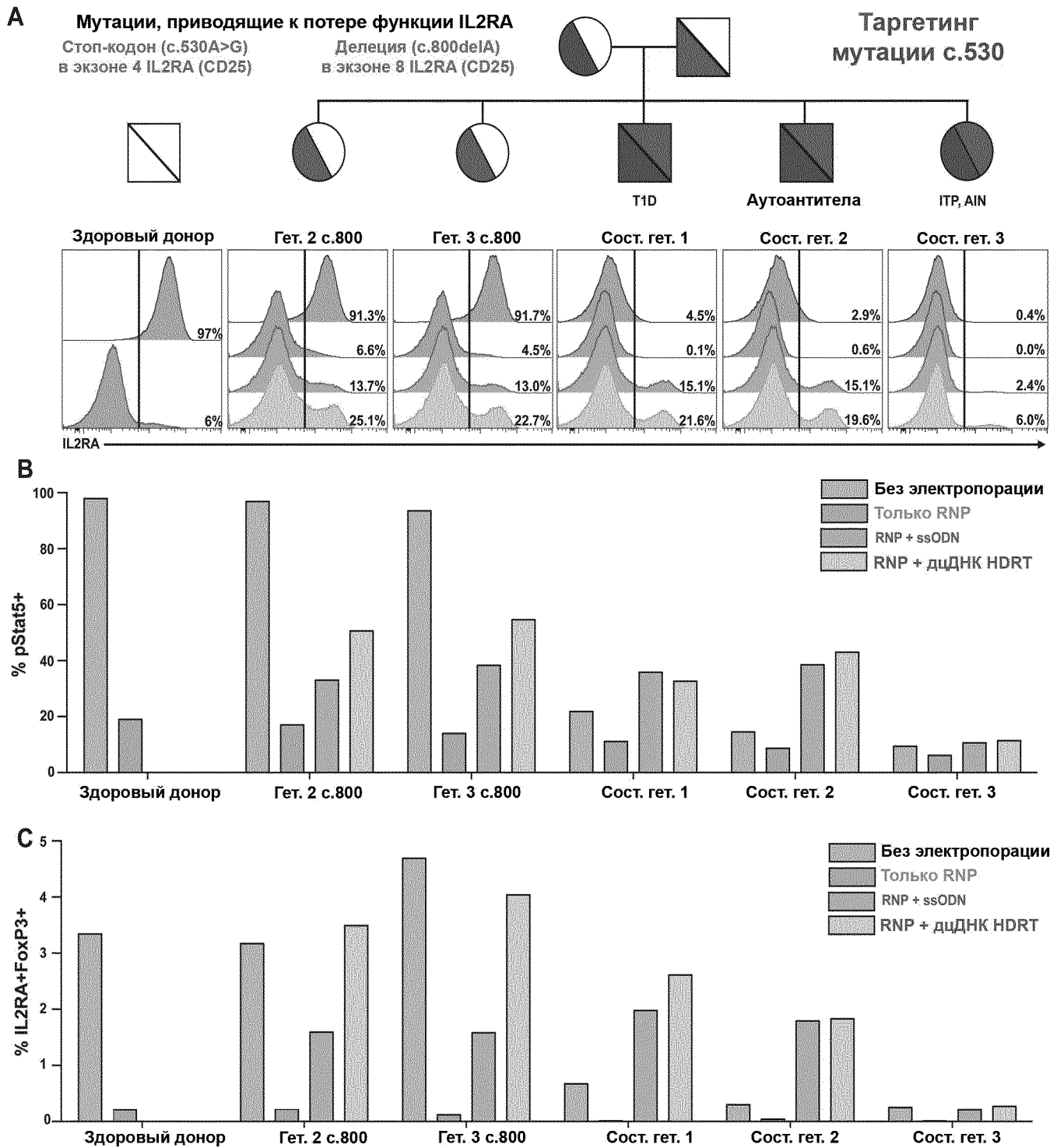
Фиг. 29



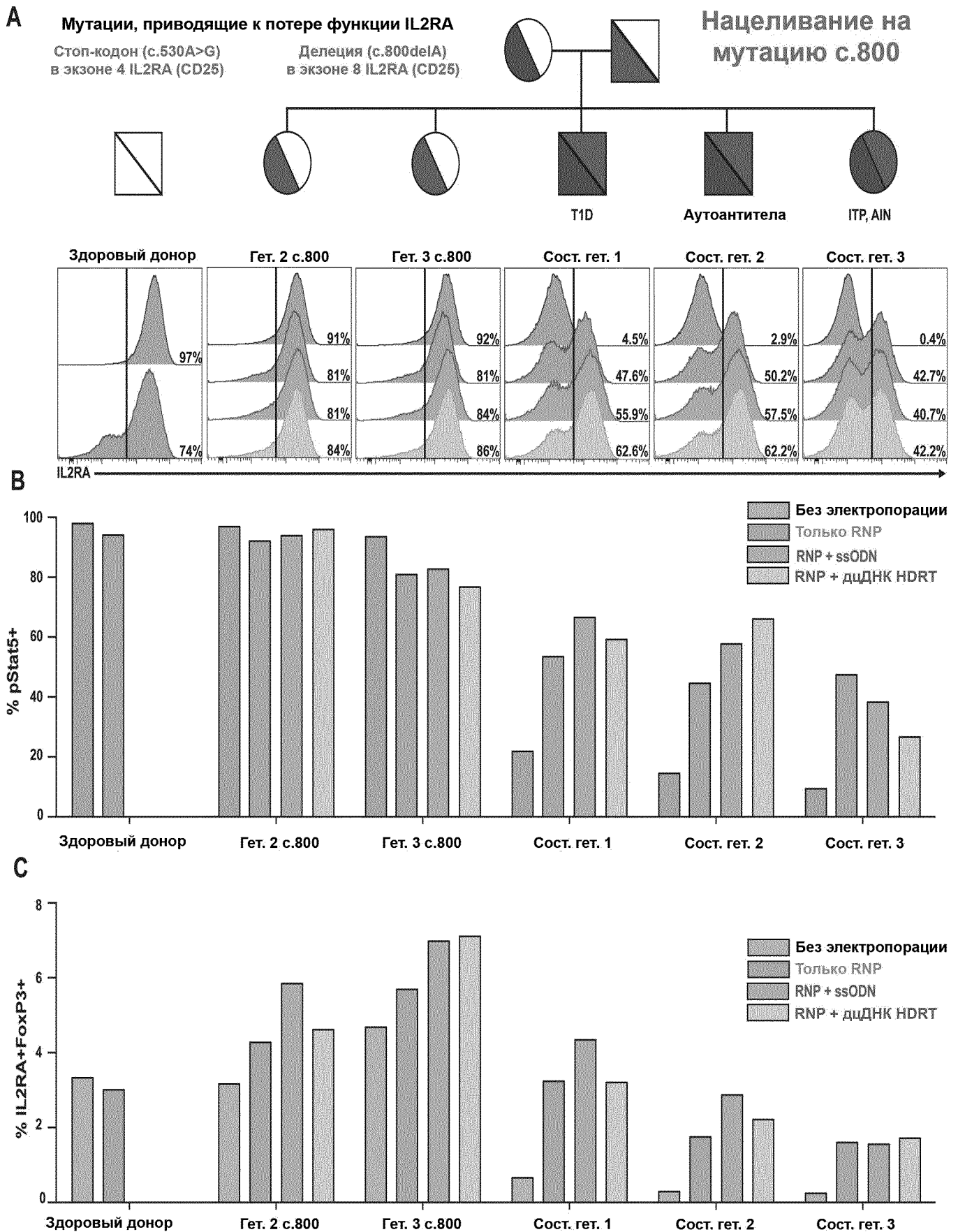
Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32

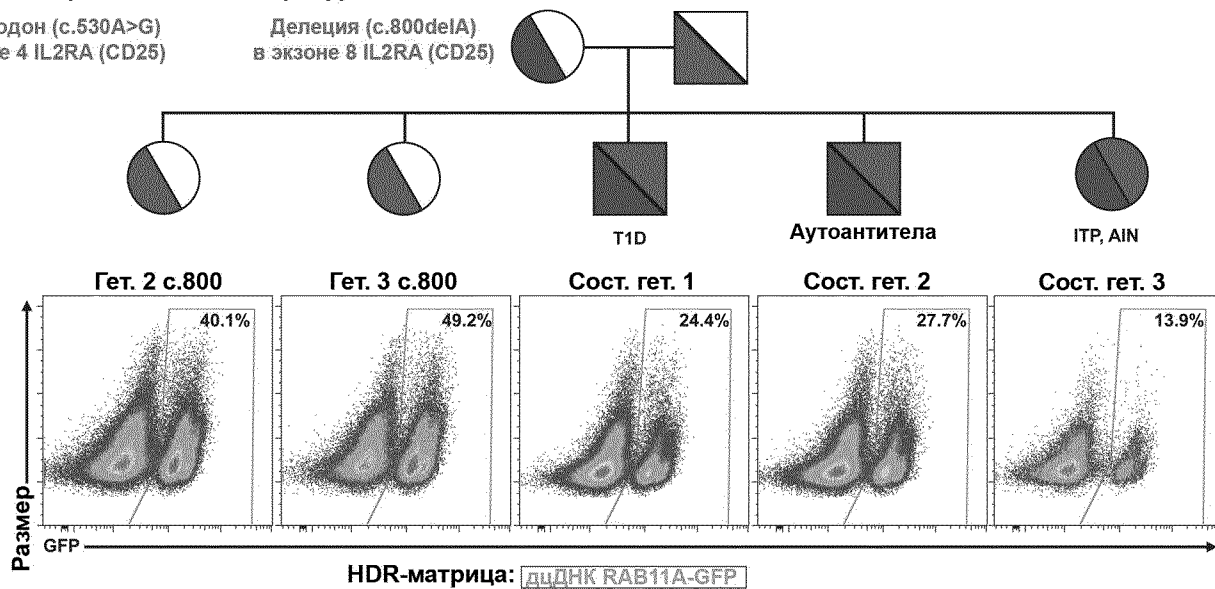


Фиг. 33

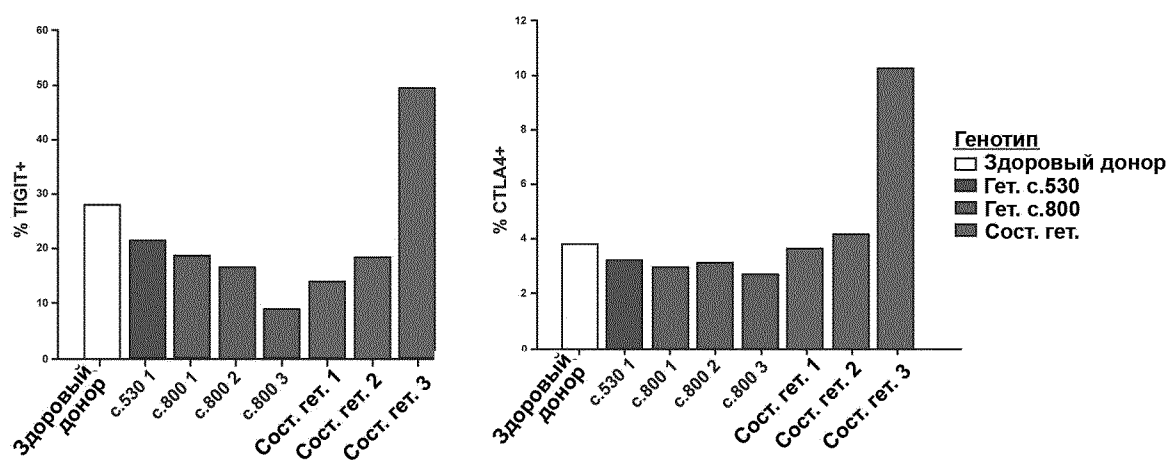
A Мутации, приводящие к потере функции IL2RA

Стоп-кодон (с.530A>G)
в экзоне 4 IL2RA (CD25)

Делеция (с.800delA)
в экзоне 8 IL2RA (CD25)

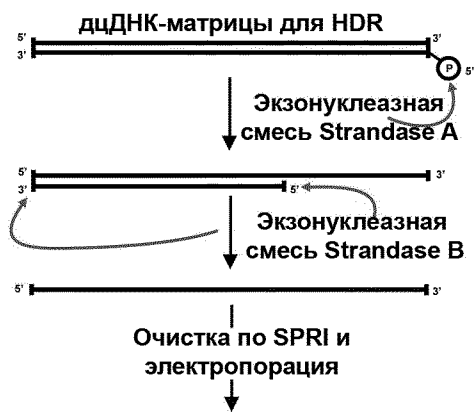


B

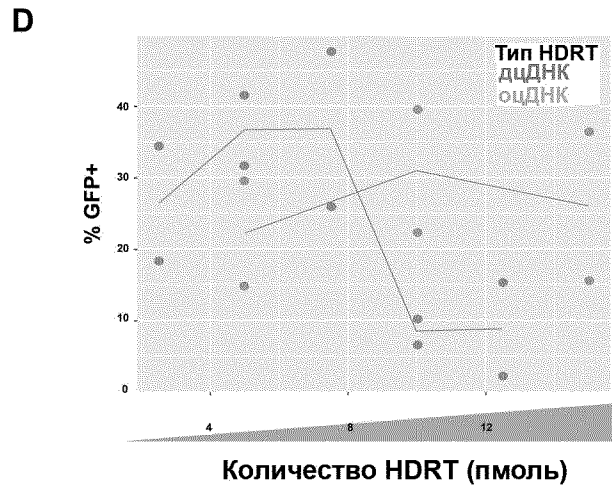
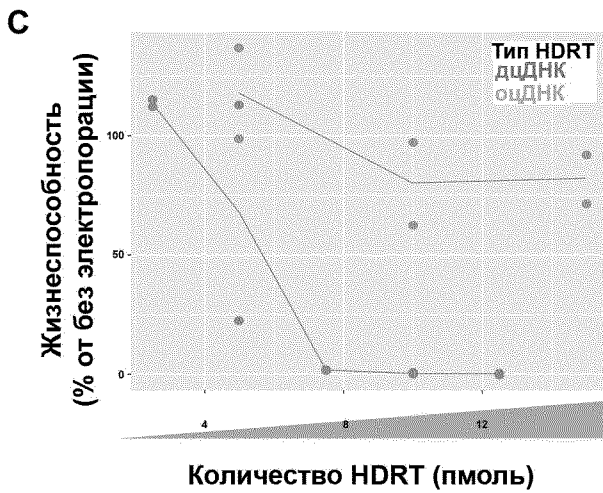
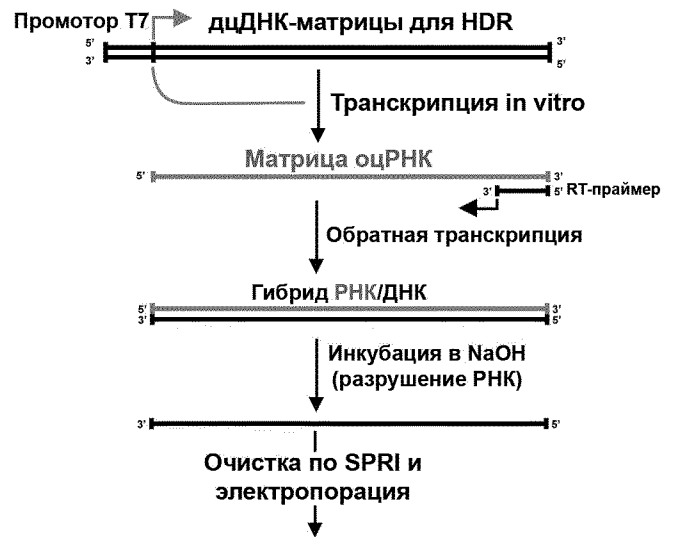


Фиг. 34

А Получение оцДНК с помощью экзонуклеазы



В Получение оцДНК с помощью IVT-RT



Фиг. 35