

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091056 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.17

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.29

(54) НАПРАВЛЕННАЯ ЗАМЕНА ЭНДОГЕННЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

(31) 62/578,153

(32) 2017.10.27

(33) US

(86) PCT/US2018/058026

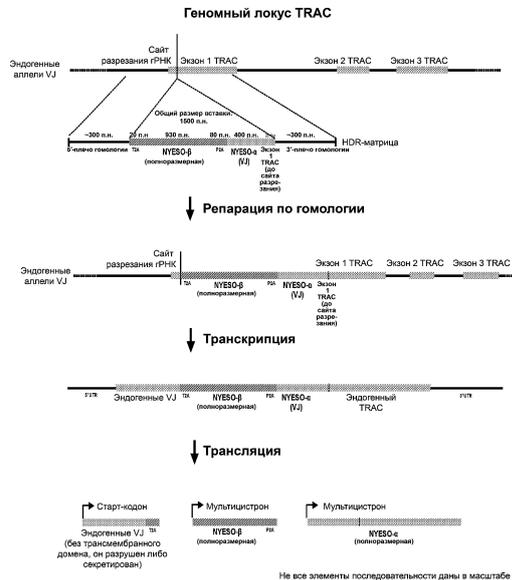
(87) WO 2019/084552 2019.05.02

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

(72) Изобретатель:
Рот Теодор Ли, Шифрут Эрик, Марсон
Александр, Сос Кристина Пюнг, Рибас
Энтони (US)

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

(57) Представлены способы и композиции для редактирования генома Т-клеток человека. В некоторых воплощениях в экзон 1 гена константной области субъединицы Т-клеточного рецептора (TCR) в геноме Т-клеток вставляется гетерологичная β-цепь TCR и гетерологичная α-цепь TCR.



A1

202091056

202091056

A1

НАПРАВЛЕННАЯ ЗАМЕНА ЭНДОГЕННЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Родственная предшествующая заявка

[0001] Настоящая заявка претендует на приоритет по предварительной заявке на патент США No. 62/578,153, поданной 27 октября 2017 г., которая включена сюда путем ссылки во всей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Т-клетки – наиболее активно изучаемый тип клеток в развивающейся области адоптивной клеточной терапии. Т-клетки специфически взаимодействуют с мишенью своих Т-клеточных рецепторов (TCR), обеспечивая высокоспецифичные ответы с минимальными побочными эффектами. Эти высокоэффективные и специфичные ответы могут быть разработаны в направлении новых антигенов и мишеней путем введения в Т-клетки новых рецепторов с требуемой специфичностью. Однако разработка совершенно новых типов рецепторов отнимает много времени, дорого обходится и не позволяет воспользоваться тем, что благодаря развитию репертуара эндогенных Т-клеток организм естественным образом вырабатывает такие TCR, которые связывают практически любые возможные антигенные мишени. Способность получать Т-клетки человека и заменять их эндогенные TCR на TCR с требуемой антигенной специфичностью могла бы преобразовать всю сферу разработки и применения адоптивных Т-клеточных методов лечения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение направлено на композиции и способы редактирования генома Т-клеток человека. Авторы изобретения открыли, что гетерологичный TCR может быть вставлен в целевой участок генома Т-клеток так, чтобы гетерологичный TCR находился под контролем эндогенного промотора TCR. Представленные здесь способы и композиции могут применяться для замены эндогенного TCR в Т-клетках человека на гетерологичный TCR с требуемой антигенной специфичностью. В некоторых воплощениях целевым участком в геноме Т-клеток является нативный локус Т-клеточного рецептора.

[0004] В некоторых воплощениях настоящего изобретения предусмотрен способ редактирования генома Т-клеток человека. В некоторых воплощениях способ включает вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области субъединицы Т-клеточного рецептора (TCR) в Т-клетках человека последовательности нуклеиновой кислоты,

кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) первую гетерологичную цепь субъединицы TCR, причем эта цепь субъединицы TCR содержит переменную область и константную область субъединицы TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) переменную область второй гетерологичной цепи субъединицы TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной субъединицы TCR, причем, если эндогенной субъединицей TCR является альфа-субъединица TCR (TCR- α), то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь бета-субъединицы TCR (TCR- β), а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR, а если эндогенной субъединицей TCR является β -субъединица TCR, то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR, а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь β -субъединицы TCR. В некоторых воплощениях способ включает вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области α -субъединицы TCR (TRAC) в Т-клетках человека последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) гетерологичную β -цепь TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) переменную область гетерологичной α -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR.

[0005] В некоторых воплощениях способ включает вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области β -субъединицы TCR (TRBC) в Т-клетках человека последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) гетерологичную α -цепь TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) переменную область гетерологичной β -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR.

[0006] В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота вставляется путем введения в Т-клетки вирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота вставляется путем введения в Т-клетки невирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота вставляется в Т-клетки путем введения в Т-клетки: (a) направленной нуклеазы, расщепляющей целевой участок экзона 1 гена константной области α -субъединицы TCR (TRAC), создавая сайт вставки в геноме Т-клетки; и (b) последовательности нуклеиновой кислоты, причем эта последовательность нуклеиновой кислоты вставляется в сайт вставки путем гомологичной репарации (HDR). В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота

вставляется в Т-клетки путем введения в Т-клетки: (а) направленной нуклеазы, расщепляющей целевой участок экзона 1 гена константной области β -субъединицы TCR (TRBC), создавая сайт вставки в геноме Т-клетки; и (б) последовательности нуклеиновой кислоты, причем эта последовательность нуклеиновой кислоты вставляется в сайт вставки путем гомологичной репарации (HDR). В некоторых воплощениях 5'-конец и 3'-конец нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим целевой участок. В некоторых воплощениях 5'-конец и 3'-конец нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки. В некоторых воплощениях направленная нуклеаза вводит двухцепочечный разрыв на сайте вставки. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты вводится в клетки в виде двухцепочечной или одноцепочечной нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота вводится в клетки в виде двухцепочечной или одноцепочечной ДНК-матрицы. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты вводится в клетки в виде линейной нуклеиновой кислоты.

[0007] В некоторых воплощениях первый саморасщепляющийся пептид и второй саморасщепляющийся пептид представляют собой одинаковые или разные вирусные 2А-пептиды.

[0008] В некоторых воплощениях направленную нуклеазу выбирают из группы, состоящей из РНК-направляемого нуклеазного домена, эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), нуклеаз типа цинкового пальца (ZFN) и мега-TAL. В некоторых воплощениях РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9, а способ дополнительно включает введение в клетки направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 TRAC. В некоторых воплощениях нуклеаза Cpf1 или нуклеаза Cas9, направляющая РНК и нуклеиновая кислота вводятся в клетки в виде комплекса рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) с ДНК-матрицей, причем комплекс РНП-ДНК матрицы содержит: (i) РНП, причем РНП содержит нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9 и направляющую РНК; и (ii) ДНК-матрицу.

[0009] В некоторых воплощениях молярное соотношение РНП и ДНК матрицы в комплексе составляет от 3:1 до 100:1. В некоторых воплощениях комплекс РНП-ДНК матрицы образуется при инкубации РНП с ДНК-матрицей в течение от 10 до 30 минут при температуре от 20° до 25°С. В некоторых воплощениях комплекс РНП-ДНК матрицы смешивают с клетками перед введением комплекса РНП-ДНК матрицы в клетки. В

некоторых воплощениях комплекс РНП-ДНК матрицы содержит по меньшей мере два структурно различных комплекса РНП. В некоторых воплощениях по меньшей мере два структурно различных комплекса РНП содержат структурно разные направляющие РНК. В некоторых воплощениях каждый из структурно различных комплексов РНП содержит нуклеазу Cas9, при этом структурно разные направляющие РНК гибридизуются с противоположными нитями целевого участка.

[0010] В некоторых воплощениях введение включает электропорацию. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота вводится в популяцию от 1×10^5 до 2×10^6 Т-клеток. В некоторых воплощениях направленная нуклеаза и ДНК-матрица вводятся в популяцию от 1×10^5 до 2×10^6 Т-клеток. В некоторых воплощениях в клетки вводится по меньшей мере две структурно разные ДНК-матрицы. В некоторых воплощениях по меньшей мере две структурно разные ДНК-матрицы не являются вирусными. В некоторых воплощениях каждая из по меньшей мере двух структурно разных ДНК-матриц кодирует уникальную комбинацию варибельной области гетерологичной β -цепи TCR специфичного к антигену Т-клеточного рецептора и варибельной области гетерологичной α -цепи TCR специфичного к антигену Т-клеточного рецептора. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой эффекторные Т-клетки, причем эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD8^+$. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой эффекторные Т-клетки, причем эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD4^+$. В некоторых воплощениях эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD4^+CD8^+$.

[0011] В некоторых воплощениях способ дополнительно включает культивирование Т-клеток в условиях, способствующих экспрессии гетерологичной β -цепи TCR и гетерологичной α -цепи TCR с образованием антиген-специфичного Т-клеточного рецептора. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает культивирование модифицированных Т-клеток в условиях, эффективных для расширения популяции модифицированных клеток. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает очистку Т-клеток, экспрессирующих антиген-специфичный Т-клеточный рецептор.

[0012] В некоторых воплощениях настоящего изобретения предусмотрен способ редактирования генома Т-клеток человека, включающий: (а) вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области альфа-субъединицы TCR (TRAC) в Т-клетках человека последовательности первой нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i)

последовательность саморасщепляющегося пептида; (ii) гетерологичную TCR - α -цепь антиген-специфичного T-клеточного рецептора; и (iii) N-концевую часть экзона 1 эндогенной альфа-субъединицы TCR; и (b) вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области бета-субъединицы TCR (TRBC) в T-клетках человека последовательности второй нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (ii) гетерологичную TCR - β -цепь антиген-специфичного T-клеточного рецептора; и (iii) N-концевую часть экзона 1 эндогенной бета-субъединицы TCR.

[0013] В некоторых воплощениях последовательность первой и/или второй нуклеиновой кислоты вставляется путем введения в T-клетки вирусного вектора, содержащего первую и/или вторую нуклеиновую кислоту. В некоторых воплощениях последовательность первой и/или второй нуклеиновой кислоты вставляется путем введения в T-клетки невирусного вектора, содержащего первую и/или вторую нуклеиновую кислоту. В некоторых воплощениях первая и вторая нуклеиновая кислота вставляются в T-клетки путем введения: (a) одной или нескольких направленных нуклеаз, создающих первый сайт вставки в экзоне 1 TRAC и второй сайт вставки в экзоне 1 гена константной области бета-субъединицы TCR (TRBC); (b) последовательности первой нуклеиновой кислоты и (c) последовательности второй нуклеиновой кислоты, причем и первая последовательность нуклеиновой кислоты встраивается в первый сайт вставки в экзоне 1 TRAC, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты встраивается во второй сайт вставки в экзоне 1 TRBC путем гомологичной репарации (HDR). В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты вводится в клетки в виде двухцепочечной или одноцепочечной ДНК-матрицы. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты вводится в клетки в виде линейной ДНК-матрицы.

[0014] В некоторых воплощениях 5'-конец и 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим целевой участок в экзоне 1 гена TRAC. В некоторых воплощениях 5'-конец и 3'-конец первой последовательности нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим первый сайт вставки в экзоне 1 гена TRAC. В некоторых воплощениях 5'-конец и 3'-конец второй последовательности нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим целевой участок в экзоне 1 гена TRBC. В некоторых воплощениях 5'-конец и 3'-конец второй последовательности нуклеиновой

кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим второй сайт вставки в экзоне 1 гена TRBC.

[0015] В некоторых воплощениях одна или несколько направленных нуклеаз вводят двухцепочечные разрывы в первом и втором сайтах вставки. В некоторых воплощениях первый саморасщепляющийся пептид и второй саморасщепляющийся пептид представляют собой одинаковые или разные вирусные 2А-пептиды. В некоторых воплощениях одну или несколько направленных нуклеаз выбирают из группы, состоящей из РНК-направляемого нуклеазного домена, эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), нуклеаз типа цинкового пальца (ZFN) и мега-TAL.

[0016] В некоторых воплощениях РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9, а способ дополнительно включает введение в клетки первой направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 TRAC, и второй направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 TRBC. В некоторых воплощениях нуклеаза Cpf1 или нуклеаза Cas9, первая направляющая РНК и первая нуклеиновая кислота вводятся в клетки в виде комплекса рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) с ДНК-матрицей, причем комплекс РНП-ДНК матрицы содержит: (i) РНП, причем РНП содержит нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9 и первую направляющую РНК; и (ii) первую ДНК-матрицу. В некоторых воплощениях нуклеаза Cpf1 или нуклеаза Cas9, вторая направляющая РНК и вторая нуклеиновая кислота вводятся в клетки в виде комплекса РНП-ДНК матрицы, причем комплекс РНП-ДНК матрицы содержит: (i) РНП, причем РНП содержит нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9 и вторую направляющую РНК; и (ii) вторую ДНК-матрицу.

[0017] В некоторых воплощениях молярное соотношение РНП и ДНК матрицы в комплексе составляет от 3:1 до 100:1. В некоторых воплощениях комплекс РНП-ДНК матрицы образуется при инкубации РНП с ДНК-матрицей в течение от 10 до 30 минут при температуре от 20° до 25°С. В некоторых воплощениях комплекс РНП-ДНК матрицы содержит по меньшей мере два структурно разных комплекса РНП. В некоторых воплощениях каждый из структурно разных комплексов РНП содержит нуклеазу Cas9, при этом структурно разные направляющие РНК гибридизуются с противоположными нитями целевого участка. В некоторых воплощениях введение включает электропорацию.

[0018] В некоторых воплощениях первая и вторая нуклеиновые кислоты вводятся в от 1×10^5 до 2×10^6 Т-клеток. В некоторых воплощениях одна или несколько направленных нуклеаз и первая и вторая нуклеиновые кислоты вводятся в от 1×10^5 до 2×10^6 Т-клеток. В некоторых воплощениях в клетки вводятся по меньшей мере две структурно различные первые ДНК-матрицы. В некоторых воплощениях по меньшей мере две структурно

различные первые ДНК-матрицы содержат разные переменные области α -цепи антиген-специфического Т-клеточного рецептора. В некоторых воплощениях в клетки вводятся по меньшей мере две структурно различные вторые ДНК-матрицы. В некоторых воплощениях по меньшей мере две структурно различные вторые ДНК-матрицы содержат разные переменные области β -цепи антиген-специфического Т-клеточного рецептора.

[0019] В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой эффекторные Т-клетки, причем эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD8^+$. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой эффекторные Т-клетки, причем эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD4^+$. В некоторых воплощениях эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD4^+CD8^+$.

[0020] В некоторых воплощениях способ дополнительно включает культивирование Т-клеток в условиях, способствующих экспрессии гетерологичной β -цепи TCR и гетерологичной α -цепи TCR с образованием антиген-специфического Т-клеточного рецептора. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает культивирование модифицированных Т-клеток в условиях, эффективных для расширения популяции модифицированных клеток. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает очистку Т-клеток, экспрессирующих антиген-специфичный Т-клеточный рецептор.

[0021] В других воплощениях настоящего изобретения предусмотрены модифицированные Т-клетки, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) переменную область гетерологичной β -цепи Т-клеточного рецептора (TCR); (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) переменную область гетерологичной α -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной альфа-субъединицы TCR; причем последовательность нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRAC.

[0022] В некоторых воплощениях настоящего изобретения также предусмотрены модифицированные Т-клетки, содержащие: а) последовательность первой нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) первую саморасщепляющуюся последовательность; (ii) переменную область гетерологичной α -цепи TCR; и (iii) N-концевую часть эндогенной α -цепи TCR; и б) последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) первую саморасщепляющуюся последовательность; (ii) переменную область гетерологичной β -цепи TCR; и (iii) N-

концевую часть эндогенной β -цепи TCR; причем последовательность первой нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRAC, а последовательность второй нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRBC.

[0023] В некоторых воплощениях настоящего изобретения также предусмотрен способ лечения рака у человека, включающий: а) получение Т-клеток от субъекта; б) модифицирование Т-клеток для экспрессии гетерологичного антиген-специфичного Т-клеточного рецептора, причем Т-клеточный рецептор распознает опухолеспецифичный антиген у субъекта; и с) введение модифицированных Т-клеток субъекту.

[0024] Используя способы и композиции, описанные здесь для модификации Т-клеток для экспрессии гетерологичной α -цепи TCR и гетерологичной β -цепи TCR, можно также редактировать Т-клетки гамма-дельта ($\gamma\delta$) человека. Например, в некоторых воплощениях способ включает вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области гамма-субъединицы Т-клеточного рецептора (TRGC) в Т-клетках человека последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) переменную область гетерологичной β -цепи TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) переменную область гетерологичной α -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной α -цепи TCR.

[0025] В других воплощениях способ включает вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области гамма-субъединицы Т-клеточного рецептора в Т-клетках человека последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) переменную область гетерологичной β -цепи TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) полноразмерную гетерологичную α -цепь TCR; и (v) стоп-кодон с тем, чтобы после вставки нуклеиновой кислоты гетерологичные последовательности TCR- β и TCR- α были под контролем эндогенного промотора TCR- γ .

[0026] В других воплощениях способ включает вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области гамма-субъединицы Т-клеточного рецептора (TRGC) в Т-клетках человека последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) переменную область гетерологичной δ -цепи TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) переменную область гетерологичной γ -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной γ -субъединицы TCR. Также предусмотрен способ редактирования генома Т-клеток человека, включающий вставку в целевой участок экзона 1 гена TRAC в Т-клетках человека последовательности нуклеиновой кислоты,

кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) вариабельную область гетерологичной γ -цепи TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) вариабельную область гетерологичной δ -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR. В других воплощениях способ включает вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области гамма-субъединицы Т-клеточного рецептора (TRAC) в Т-клетках человека последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) вариабельную область гетерологичной γ -цепи TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) полноразмерную гетерологичную δ -цепь TCR; и (v) стоп-кодон с тем, чтобы после вставки нуклеиновой кислоты гетерологичные последовательности TCR- γ и TCR- δ были под контролем эндогенного промотора TCR- α .

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0027] Настоящая заявка включает в себя следующие фигуры. Фигуры предназначены для иллюстрации определенных воплощений и/или особенностей композиций и способов и для дополнения описания композиций и способов. Фигуры не ограничивают объем композиций и способов, если только в письменном описании не указано прямо, что это так.

[0028] На фиг. 1a схематически представлена вставка единой невирусной ДНК-матрицы, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность саморасщепляющегося пептида T2A; (ii) полноразмерную (т.е. вариабельную область и константную область) гетерологичную β -цепь TCR (NYESO- β); (iii) последовательность саморасщепляющегося пептида P2A; (iv) вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR (NYESO- α); и (v) N-концевую часть эндогенной альфа-субъединицы TCR, в Т-клетки посредством гомологичной репарации. После встраивания ДНК-матрицы в экзон 1 гена TRAC посредством гомологичной репарации ДНК матрицы подвергается транскрипции и трансляции с получением полноразмерной β -цепи NYESO и полноразмерной α -цепи NYESO, которые образуют антиген-специфичный TCR, который распознает неоантиген меланомы NY-ESO-1.

[0029] На фиг. 1b схематически представлена вставка единой невирусной ДНК-матрицы в локус TCR- β (TRBC1 или TRBC2). Матрица содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность саморасщепляющегося пептида T2A; (ii) полноразмерную (т.е. вариабельную область и константную область) гетерологичную α -цепь TCR (NYESO- α); (iii) последовательность саморасщепляющегося пептида P2A; (iv) вариабельную область гетерологичной β -цепи

TCR (NYESO- β); и (v) N-концевую часть эндогенной бета-субъединицы TCR в T-клетках посредством гомологичной репарации.

[0030] На фиг. 2 схематически представлена одновременная замена эндогенных α -цепей T-клеточного рецептора и β -цепей T-клеточного рецептора путем вставки (a) невирусной ДНК-матрицы, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) последовательность саморасщепляющегося пептида P2A; (ii) вариабельную область α -цепи антиген-специфичного T-клеточного рецептора (NYESO- α); и (iii) N-концевую часть экзона 1 эндогенной α -субъединицы TCR; и (b) ДНК-матрицы, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) последовательность саморасщепляющегося пептида T2A; (ii) вариабельную область β -цепи антиген-специфичного T-клеточного рецептора; и (iii) N-концевую часть экзона 1 эндогенной β -субъединицы TCR.

[0031] На фиг. 3a схематически представлена вставка гетерологичных β -цепей TCR и α -цепей TCR в T-клетки с образованием поликлональной библиотеки T-клеточных рецепторов. Проводили электропорацию одновременно нескольких различных ДНК-матриц, к примеру, невирусных ДНК-матриц, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) полноразмерную (т.е. вариабельную область и константную область) гетерологичную β -цепь T-клеточного рецептора; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной альфа-субъединицы TCR, получая популяцию T-клеток с синтетическим T-клеточным репертуаром требуемых последовательностей TCR.

[0032] На фиг. 3b схематически представлена разработка T-клеточного репертуара из ранее известных последовательностей TCR либо из природных репертуаров в нужных эндогенных популяциях T-клеток, к примеру, от субъекта. Например, TCR могут представлять собой, без ограничения, TCR, экспрессируемые в инфильтрирующих опухолях лимфоцитах, TCR, экспрессируемые в аутореактивных T-клетках в очагах аутоиммунных заболеваний, или TCR из реагирующих на патоген T-клеток.

[0033] На фиг. 4a представлен анализ методом FACS T-клеток CD4⁺ и CD8⁺ после электропорации с гетерологичным TCR NYESO. T-клетки CD4⁺ и CD8⁺ от двух здоровых доноров крови подвергали электропорации с помощью невирусной конструкции, содержащей гетерологичный NYESO- α и гетерологичный NYESO- β , как описано здесь. Через 4 дня после электропорации клетки окрашивали флуоресцентно меченым МНС-декстрамером, содержащим пептид, распознаваемый встроенным NYESO-

специфичным TCR.

[0034] На фиг. 4b представлен анализ методом FACS T-клеток CD8⁺ после электропорации с гетерологичным TCR NYESO. T-клетки CD8⁺ от здоровых доноров крови подвергали электропорации с помощью невирусной ДНК-конструкции, содержащей гетерологичный NYESO- α и гетерологичный NYESO- β , как описано здесь. Через 4 дня после электропорации клетки окрашивали флуоресцентно меченым MHC-декстрамером, содержащим пептид, распознаваемый встроенным NYESO-специфичным TCR.

[0035] На фиг. 5 представлен анализ методом FACS клеток CD8⁺ после электропорации с гетерологичным TCR NYESO. Клетки обрабатывали, как на фиг. 3 и 4, с добавлением окрашивания на экспрессию TCR (с помощью антитела, связывающегося со всеми возможными TCRs человека) вместо антиген-специфичного окрашивания NYESO с помощью MHC-декстрамера. У большинства T-клеток, где не было замены эндогенного TCR по гомологии, эндогенный TCR был отключен вследствие разрезания экзона 1 TRAC под действием гидРНК и введения небольших мутаций типа вставок-делеций (indels) путем негомологичного соединения концов. Как и ожидалось, почти все NYESO-положительные клетки были также положительными по экспрессии TCR.

[0036] На фиг. 6a показано, что первичные T-клетки человека, содержащие гетерологичный TCR NYESO, уничтожают раковые клетки при анализе гибели клеток *in vitro*.

[0037] На фиг. 6b представлены результаты из одной точки времени при анализе гибели клеток *in vitro* с использованием T-клеток человека, содержащих гетерологичный TCR NYESO.

[0038] На фиг. 7a-f представлена функциональность T-клеток *in vivo* при безвирусной замене TCR. (a) Схема модели ксенотрансплантатов антиген-специфичных опухолей человека *in vivo*. (b) Через два дня после переноса 5×10^6 общих T-клеток с безвирусной заменой (~10% TCR⁺ NYESO-1⁺, ~10% TCR⁺ NYESO-1⁻ и ~80% TCR⁻ NYESO-1⁻) T-клетки NYESO-1⁺ с безвирусным редактированием преимущественно накапливались в опухолях по сравнению с селезенкой (n = 5 мышей для каждого из 4 доноров T-клеток человека). (c) Через 10 дней после переноса 5×10^6 общих T-клеток с безвирусной заменой, помеченных CFSE, клетки TCR⁺ NYESO-1 проявляли большую пролиферацию, чем T-клетки TCR⁻ или TCR⁺ NYESO-1⁻, и большую пролиферацию (низкий CFSE) в опухолях, чем в селезенке. Через 10 дней после переноса в опухолях с трудом выявлялись T-клетки TCR⁻ и TCR⁺ NYESO⁻. (d) Индивидуальные графики изменения объема опухолей для данных, приведенных на фиг. 8f. (e, f). В этих

экспериментах через 17 дней после переноса Т-клеток (d) клетки с безвирусной заменой TCR проявляли большую экспрессию TCR NYESO-1 и меньшую экспрессию маркеров истощения. При переносе как трансдуцированных лентивирусом, так и клеток с безвирусной заменой TCR проявлялось значительное снижение опухолевой нагрузки на 24-й день. На этой экспериментальной модели при безвирусной замене TCR проявлялось дальнейшее снижение (фиг. 8f).

[0039] На фиг. 8a представлена антиген-специфичная продукция цитокинов и дегрануляция в Т-клетках CD8⁺ с заменой TCR.

[0040] На фиг. 8b представлено антиген-специфичное уничтожение клеток мишени Т-клетками CD8⁺ с заменой TCR.

[0041] На фиг. 8c представлена схема модели ксенотрансплантатов опухолей у мышей.

[0042] На фиг. 8d представлена масштабируемость безвирусной замены эндогенного TCR для адоптивной клеточной терапии.

[0043] На фиг. 8e представлена преимущественная локализация *in vivo* Т-клеток TCR⁺ NYESO-1 в опухолях.

[0044] На фиг. 8f представлен рост опухолей после адоптивного переноса Т-клеток TCR⁺ NYESO-1 с безвирусной или лентивирусной модификацией либо одного носителя (физраствора): n = 2 (a, b) независимых здоровых донора, средние значения и стандартные отклонения из трех повторов; n = 6 (d) или n = 2 (e, f) независимых здоровых донора на 5 (e) или 7 мышах (f), средние значения и стандартные отклонения (d-f); ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (двухсторонний метод ANOVA с критерием для множественных сравнений Holm-Sidak).

[0045] На фиг. 9a представлен анализ ошибочных пар цепей TCR после ретровирусной доставки NYESO-1-специфичного TCR или безвирусной замены TCR при гейтировании Т-клеток CD4⁺ или CD8⁺. Безвирусная замена TCR приводит к меньшему ошибочному спариванию TCR по сравнению с ретровирусной доставкой TCR. При вирусном введении нового TCR инфицированные клетки потенциально должны экспрессировать по меньшей мере 4 разных TCR (новая TCR- α + новая TCR- β ; новая TCR- α + эндогенная TCR- β ; эндогенная TCR- α и новая TCR- β ; эндогенная TCR- α + эндогенная TCR- β). Окрашивание на специфическую β -цепь в новом введенном TCR (VB13.1) вместе с мультимером МНС-пептида (NYSEO) может дать примерную оценку неправильно спаренных TCR, позволяя отличить клетки, которые преимущественно экспрессируют введенный TCR (VB13.1⁺ NYESO⁺; новая TCR- α + новая TCR- β), от тех, которые преимущественно экспрессируют одну из потенциально ошибочных пар цепей TCR

(VB13.1⁺ NYESO⁻; эндогенная TCR- α + новая TCR- β).

[0046] На фиг. 9b-9c представлена замена TCR путем вставки целого нового TCR в *TRAC* (фиг. 9b, также возможно и с мультиплексным нокаутом TCR- β), целого нового TCR в *TRBC1/2* (фиг. 9c) или мультиплексной замены с новой TCR- α в *TRAC* и новой TCR- β в *TRBC1/2*.

[0047] На фиг. 9d показано, что продукция функциональных цитокинов после воздействия антигена наблюдается избирательно в сортированных Т-клетках CD4⁺, аналогично сортированным Т-клеткам CD8⁺ (фиг. 8a).

[0048] На фиг. 9e показано, что через 4 дня после электропорации устойчиво наблюдалась безвирусная замена TCR в Т-клетках CD8⁺ и CD4⁺ во всей когорте из шести здоровых доноров крови.

[0049] На фиг. 9f показано, что во второй когорте из шести дополнительных здоровых доноров крови по 100 миллионов Т-клеток от каждого донора подвергали электропорации с HDR-матрицей для замены TCR NYESO-1 и направленной гидРНК/Cas9 (фиг. 8d). Содержание таких Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, которые были TCR⁺ NYESO-1, было постоянным на протяжении 10 дней экспансии после электропорации.

[0050] На фиг. 9g показано, что на протяжении 10 дней экспансии после безвирусного воздействия на геном проявлялось небольшое пролиферативное преимущество Т-клеток CD8⁺ перед Т-клетками CD4⁺.

[0051] На фиг. 9h представлены результаты совместной инкубации клеток указанных линий меланомы с указанными отсортированными популяциями Т-клеток при соотношении Т-клетки/раковые клетки = 1:5. Через 72 часа после совместной инкубации регистрировали степень конфлюэнтности раковых клеток при помощи автоматической микроскопии (где ядерный RFP маркирует раковые клетки). Т-клетки, экспрессирующие антиген-специфичный TCR NYESO-1, как при ретровирусной трансдукции, так и при безвирусной замене эндогенного TCR, проявляли сильную гибель клеток мишени только в тех линиях раковых клеток, которые экспрессируют как NY-ESO-1, так и аллель HLA-A*0201 MHC класса I.

[0052] На фиг. 9i представлены результаты по использованию матрицы направленных/ненаправленных гидРНК и направленных/ненаправленных HDR-матриц для уничтожения клеток-мишеней из линии A375 раковых клеток NY-ESO-1⁺ HLA-A*0201⁺ (ненаправленная гидРНК и HDR-матрица были специфичны для внедрения слитого белка RAB11A-GFP). Только клетки и с направленной гидРНК, и с направленной HDR-матрицей проявляли уничтожение клеток мишени.

[0053] На фиг. 9j показано, что отсортированные клетки TCR⁺ NYESO-1⁺ из общей

отредактированной популяции Т-клеток (направленная гидРНК, направленная HDR-матрица) проявляют сильную зависимость доза-эффект при уничтожении раковых клеток-мишеней. В пределах 48 часов при соотношении Т-клетки/раковые клетки = 2:1 и более проявлялась почти полная гибель раковых клеток мишени. К 144 часам при соотношении Т-клетки/раковые клетки менее 1:16 проявлялись признаки сильной гибели клеток мишени.

[0054] На фиг. 9к показано, что уничтожение клеток мишени Т-клетками с безвирусной заменой TCR обусловлено именно популяцией распознающих NYESO-1 клеток TCR⁺ при наблюдении методом проточной цитометрии после безвирусной замены TCR. Исходя из общей популяции отредактированных Т-клеток (которые все подвергались электропорации с направленной гидРНК и HDR-матрицей), отсортировывали три отдельные популяции клеток: клетки NYESO-1⁺ TCR⁺ (с безвирусной заменой TCR), клетки NYESO-1⁻ TCR⁻ (с нокаутом TCR) (серые) и клетки NYESO-1⁻ TCR⁺ (клетки, сохранившие свой нативный TCR, но не имеющие внедренного NYESO-специфичного TCR). Только отсортированная популяция NYESO-1⁺ TCR⁺ проявляла уничтожение клеток-мишеней (соотношение Т-клетки/раковые клетки = 4:1). Один репрезентативный донор из n = 2 (a, d) или n = 3 (b, c) независимых здоровых доноров со средними значениями и стандартными отклонениями из трех повторов (d). Представлены средние и стандартные отклонения от n = 6 независимых здоровых доноров (e, f) или из четырех повторов от n = 2 независимых здоровых доноров (i-k); средние и индивидуальные значения для n = 2 независимых здоровых доноров (h).

Определения

[0055] В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и значения множественного числа, если из контекста четко не следует иное.

[0056] Термин “нуклеиновая кислота” или “нуклеотид” относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) и их полимерам в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Если нет особых ограничений, то термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают такими же свойствами связывания, как и эталонные нуклеиновые кислоты, и подвергаются метаболизму таким же образом, как и встречающиеся в природе нуклеотиды. Если не указано иначе, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно охватывает и её консервативно модифицированные варианты (напр., вырожденные замены кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанные

прямо. В частности, вырожденные замены кодонов могут осуществляться путем создания последовательностей, в которых третье положение у одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено остатками 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)).

[0057] Термин “ген” может относиться к сегментам ДНК, участвующим в вырабатывании или кодировании полипептидной цепи. Он может включать участки, предшествующие и следующие за кодирующей областью (лидер и трейлер), а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами). С другой стороны, термин “ген” может относиться к сегментам ДНК, участвующим в вырабатывании или кодировании нетранслируемой РНК типа рРНК, тРНК, направляющей РНК (напр., единой направляющей РНК) или микроРНК.

[0058] Термин “лечение” относится к любым признакам успеха при лечении или улучшении или профилактике заболевания, состояния или расстройства, включая любые объективные или субъективные параметры, такие как ослабление; ремиссия; уменьшение симптомов или улучшение переносимости заболевания для пациента; замедление скорости дегенерации или ухудшения; или уменьшение болезненности в конечной точке дегенерации.

[0059] “Промотор” определяется как одна или несколько контролирующих последовательностей нуклеиновой кислоты, направляющих транскрипцию нуклеиновой кислоты. В настоящем изобретении промотор включает необходимые последовательности нуклеиновой кислоты возле сайта начала транскрипции, такие, в случае промотора полимеразы II типа, как элемент ТАТА. Промотор также необязательно включает и дистальные элементы – энхансеры или репрессоры, которые могут находиться на расстоянии в несколько тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции.

[0060] Нуклеиновая кислота является “функционально связанной”, когда она находится в функциональном отношении с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию этой последовательности; или же сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он располагается так, чтобы способствовать трансляции.

[0061] “Полипептид”, “пептид” и “белок” применяются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимеров из аминокислотных остатков. В настоящем изобретении эти термины охватывают цепочки аминокислот любой длины, включая полноразмерные белки, в которых аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями.

[0062] В настоящем изобретении термин “комплементарный” или “комплементарность” относится к специфичному спариванию оснований между нуклеотидами или нуклеиновыми кислотами. В некоторых воплощениях, к примеру и не в качестве ограничения, описано спаривание оснований между направляющей РНК и целевым участком в экзоне 1 гена TRAC. Комплементарными нуклеотидами, как правило, являются А и Т (либо А и U), а также G и C. Описанные здесь направляющие РНК могут содержать последовательности, к примеру, наводящие на ДНК последовательности, которые полностью комплементарны или практически комплементарны (напр., содержат 1-4 несовпадения) геномной последовательности в экзоне 1 гена TRAC в Т-клетках.

[0063] В настоящем изобретении под субъектом подразумевается индивид. Например, субъектами являются млекопитающие типа приматов, а более конкретно люди. Термин не обозначает конкретный возраст или пол. Таким образом, он должен охватывать взрослых и новорожденных субъектов, будь то мужчин или женщин. В настоящем изобретении пациент или субъект может применяться взаимозаменяемым образом и может относиться к субъектам, страдающим заболеванием или расстройством.

[0064] Система “CRISPR/Cas” относится к широко распространенному классу бактериальных систем для защиты от чужеродной нуклеиновой кислоты. Системы CRISPR/Cas встречаются у широкого спектра эубактериальных и архейных организмов. Системы CRISPR/Cas включают подтипы I, II и III типа. Системы CRISPR/Cas II типа дикого типа используют РНК-опосредованную нуклеазу, к примеру, Cas9, в комплексе с направляющей и активирующей РНК для распознавания и расщепления чужеродной нуклеиновой кислоты. Также в данной области известны направляющие РНК, обладающие активностью как направляющей, так и активирующей РНК. В некоторых случаях такие направляющие РНК двойного действия именуется единой направляющей РНК (sgRNA).

[0065] Гомологи Cas9 встречаются у широкого спектра эубактерий, включая, без ограничения, бактерии следующих таксономических групп: Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes-Chlorobi, Chlamydiae-Verrucomicrobia, Chloflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes и Thermotogae. Типичным белком Cas9 является белок Cas9 *Streptococcus pyogenes*. Другие белки Cas9 и их гомологи описаны, 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. Варианты любых из представленных здесь нуклеаз Cas9 можно оптимизировать для усиления активности или повышения стабильности в клетках хозяина. Таким образом,

предусмотрены и сконструированные нуклеазы Cas9.

[0066] В настоящем изобретении термин “Cas9” относится к РНК-опосредованной нуклеазе (напр., бактериального или архейного происхождения либо полученной из них). Типичные РНК-опосредованные нуклеазы включают вышеуказанные белки Cas9 и их гомологи. Другие РНК-опосредованные нуклеазы включают Cpf1 (напр., см. Zetsche et al., Cell, Volume 163, Issue 3, p.759-771, 22 October 2015) и их гомологи. Точно так же в настоящем изобретении термин “рибонуклеопротеиновый комплекс Cas9” относится к комплексу между белком Cas9 и crРНК (напр., направляющей РНК или единой направляющей РНК), белком Cas9 и трансактивирующей crРНК (tracrРНК), белком Cas9 и направляющей РНК или их комбинации (напр., комплексу, содержащему белок Cas9, tracrRNA и crRNA направляющей РНК). Подразумевается, что в любом из описанных здесь воплощений нуклеаза Cas9 может быть заменена нуклеазой Cpf1.

[0067] 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 последовательности нуклеотидов в геном клетки. Последовательность нуклеотидов может кодировать полипептид или его фрагмент. Такое редактирование может осуществляться, к примеру, путем индуцирования двухцепочечного разрыва в целевом участке генома или пары одноцепочечных надрезов на противоположных нитях, фланкирующих целевой участок генома. Методы индукции 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.

[0068] В настоящем изобретении выражение “введение” в контексте введения нуклеиновой кислоты или комплекса, включающего нуклеиновую кислоту, к примеру, комплекса РНП-ДНК матрицы, означает транслокацию последовательности нуклеиновой кислоты или комплекса РНП-ДНК матрицы снаружи клетки внутрь клетки. В некоторых случаях введение означает транслокацию нуклеиновой кислоты или комплекса снаружи клетки внутрь ядра клетки. Предусмотрены различные методы такой транслокации, включая, без ограничения, электропорацию, контакт с нанопроводниками или нанотрубками, интернализацию через рецепторы, транслокацию посредством проникающих в клетку пептидов, опосредованную липосомами транслокацию и др.

[0069] В настоящем изобретении выражение “гетерологичная” относится к последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида, которая в природе не встречается в Т-клетках человека. Термин “гетерологичная последовательность” означает

такую последовательность, которая в природе обычно не встречается в данных Т-клетках. При этом гетерологичная нуклеотидная или белковая последовательность может быть: (а) чужеродной для клеток своего хозяина (то есть она экзогенна для них); (b) в природе она встречается в клетках хозяина (то есть эндогенна), но присутствует в неестественном количестве в клетках (т.е. в большем или меньшем количестве, чем встречается в природе в клетках хозяина); или (с) в природе она встречается в клетках хозяина, но располагается вне своего естественного локуса.

[0070] В настоящем изобретении выражение “первичные” в контексте первичных клеток означает такие клетки, 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 выделяют из организма, системы, органа или ткани, необязательно сортируют и используют непосредственно без культивирования или субкультивирования. В некоторых случаях первичные клетки стимулируют, активируют или дифференцируют. Например, первичные Т-клетки могут активироваться при контакте (напр., культивировании в присутствии) с CD3, агонистами CD28, IL-2, IFN- γ либо их комбинацией.

[0071] В настоящем изобретении выражение “Т-клетки” относится к таким лимфоидным клеткам, которые экспрессируют молекулы Т-клеточного рецептора. Т-клетки включают Т-клетки альфа-бета ($\alpha\beta$) человека и Т-клетки гамма-дельта ($\gamma\delta$) человека. Т-клетки включают, без ограничения, наивные Т-клетки, стимулированные Т-клетки, первичные Т-клетки (напр., некультивированные), культивируемые Т-клетки, иммортализованные Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки, природные Т-клетки-киллеры, их комбинации либо их популяции. Т-клетки могут быть CD4⁺, CD8⁺ или CD4⁺ и CD8⁺. Т-клетки могут представлять собой хелперные клетки, к примеру, хелперные клетки типа T_H1, T_H2, T_H3, T_H9, T_H17 или T_{FN}. Т-клетки могут представлять собой цитотоксические Т-клетки. Регуляторные Т-клетки могут быть FOXP3⁺ или FOXP3⁻. Т-клетки могут представлять собой Т-клетки альфа/бета или Т-клетки гамма/дельта. 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 регуляторных Т-клеток 1-го типа (Tr1), T_H3, CD8⁺CD28⁻, Treg17 и рестриктивных по Qa-1 Т-клеток либо их комбинаций или субпопуляций. 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., гетерологичный) Т-клеточный рецептор.

[0072] В настоящем изобретении термин “TCR-рецептор” означает гетеродимер, состоящий из двух субъединичных цепей TCR (напр., TCR- α и TCR- β , TCR γ и TCR δ), который функционирует при активации Т-клеток в ответ на антиген. При экспрессии в Т-клетках каждая субъединичная цепь TCR-рецептора содержит константную область, которая заякоривает субъединичную цепь TCR в клеточной мембране, и переменную область, которая функционирует в распознавании и связывании антигена, например, когда первая субъединичная цепь TCR (напр., TCR- α) и вторая субъединичная цепь TCR (напр., TCR- β) образуют гетеродимерный TCR-рецептор.

[0073] В настоящем изобретении термин “негомологичное соединение концов” или NHEJ относится к клеточному процессу, в котором разрезанные или надрезанные концы нити ДНК лигируются непосредственно, не нуждаясь в матрице из гомологичной нуклеиновой кислоты. NHEJ может привести к добавлению, удалению, замене одного или нескольких нуклеотидов в месте репарации либо их комбинации.

[0074] В настоящем изобретении термин “гомологичная репарация” или HDR относится к клеточному процессу, в котором разрезанные или надрезанные концы нити ДНК подвергаются репарации путем полимеризации из гомологичной матричной нуклеиновой кислоты. При этом исходная последовательность заменяется на последовательность матрицы. Гомологичная матричная нуклеиновая кислота может быть представлена гомологичными последовательностями в других местах генома (сестринские хроматиды, гомологичные хромосомы или повторяющиеся участки в одной и той же или в разных хромосомах). С другой стороны, можно ввести экзогенную матричную нуклеиновую кислоту для получения определенного HDR-индуцированного изменения последовательности в целевом сайте. При этом можно вводить определенные мутации по месту разреза.

[0075] В настоящем изобретении одноцепочечная ДНК-матрица или двухцепочечная ДНК-матрица означает ДНК-олигонуклеотид, который может использоваться клеткой в качестве матрицы для редактирования генома Т-клетки, к примеру, посредством HDR. Обычно одноцепочечная ДНК-матрица или двухцепочечная ДНК-матрица содержит по меньшей мере один участок гомологии с целевым сайтом. В некоторых случаях одноцепочечная ДНК-матрица или двухцепочечная ДНК-матрица

содержит два гомологичных участка, к примеру, 5'-концевой и 3'-концевой, фланкирующие участок, содержащий гетерологичную последовательность, подлежащую вставке в целевой сайт разреза или вставки.

РАСКРЫТИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0076] В последующем описании приводятся различные аспекты и воплощения настоящих композиций и способов. Ни одно конкретное воплощение не должно определять рамки этих композиций и способов. Скорее эти воплощения просто представляют неограничительные примеры различных композиций и способов, которые по крайней мере входят в рамки раскрытых композиций и способов. Описание следует читать с точки зрения рядового специалиста в данной области, поэтому не обязательно включена информация, хорошо известная специалистам.

[0077] Здесь представлены композиции и способы редактирования генома Т-клеток человека. Авторы изобретения обнаружили, что можно вставить гетерологичный TCR в целевой участок в геноме Т-клеток так, чтобы гетерологичный TCR был под контролем эндогенного промотора TCR. Представленные здесь способы и композиции можно применять для получения модифицированных Т-клеток с требуемой антигенной специфичностью. Эти модифицированные Т-клетки можно использовать, к примеру, для лечения рака, аутоиммунных заболеваний или инфекций у субъектов.

[0078] В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR и вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR, вставляется в экзон 1 гена TRAC в геноме Т-клеток. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR и вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR, вставляется в экзон 1 гена TRBC, к примеру, в экзон 1 TRBC1 или TRBC2 в геноме Т-клеток. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты вводится посредством гомологичной репарации или же как описано здесь.

[0079] В некоторых воплощениях (a) последовательность первой нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область гетерологичной α -цепи Т-клеточного рецептора; и (b) последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область гетерологичной β -цепи антигенспецифичного Т-клеточного рецептора, вставляют в экзон 1 гена TRAC и экзон 1 гена TRBC, соответственно. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты вводится посредством гомологичной репарации или же как описано здесь.

Способы получения модифицированных Т-клеток человека

[0080] Способы редактирования генома Т-клеток включают способ редактирования генома Т-клеток человека, включающий вставку последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции в целевой участок экзона 1 гена константной области субъединицы Т-клеточного рецептора (TCR) в Т-клетках человека. Конструкция из нуклеиновой кислоты последовательно кодирует, от N-конца к С-концу, первую гетерологичную цепь субъединицы TCR, причем эта цепь субъединицы TCR содержит переменную область и константную область цепи субъединицы TCR, и переменную область второй гетерологичной цепи субъединицы TCR. Конструкция также кодирует первый саморасщепляющийся пептид, который предшествует переменной области первой гетерологичной цепи субъединицы TCR, и второй саморасщепляющийся пептид между первой гетерологичной цепью субъединицы TCR и второй гетерологичной цепью субъединицы TCR. В некоторых способах, если эндогенной субъединицей TCR является альфа-субъединица TCR (TCR- α), то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь бета-субъединицы TCR (TCR- β), а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR. В некоторых способах, если эндогенной субъединицей TCR является β -субъединица TCR, то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR, а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь β -субъединицы TCR.

[0081] В некоторых воплощениях конструкция из нуклеиновой кислоты или последовательность, кодирующая переменную область цепи субъединицы TCR, представляет собой конструкцию или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую эту цепь субъединицы TCR, то есть нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область и константную область цепи субъединицы TCR, напр., полноразмерную цепь субъединицы TCR. В некоторых примерах нуклеиновая кислота кодирует полноразмерную цепь α -субъединицы, β -субъединицы, γ -субъединицы или δ -субъединицы TCR. В некоторых примерах конструкция или последовательность нуклеиновой кислоты кодирует первую гетерологичную цепь субъединицы TCR (напр., полноразмерную цепь субъединицы TCR) и переменную область второй гетерологичной цепи субъединицы TCR. В некоторых примерах первая и вторая гетерологичные цепи субъединиц TCR различны. В некоторых примерах конструкция нуклеиновой кислоты кодирует, от N-конца к С-концу, гетерологичную полноразмерную цепь β -субъединицы TCR и переменную область гетерологичной цепи α -субъединицы TCR. В других примерах конструкция из нуклеиновой кислоты кодирует, от N-конца к С-концу,

гетерологичную полноразмерную цепь α -субъединицы TCR и переменную область гетерологичной цепи β -субъединицы TCR.

[0082] Способы редактирования генома Т-клеток включают способ редактирования генома Т-клеток человека, включающий вставку последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции в целевой участок экзона 1 гена α -субъединицы TCR (TRAC) в Т-клетках человека. В некоторых воплощениях целевой участок находится в экзоне 1 константного домена гена TRAC. В других воплощениях целевой участок находится в экзоне 1, экзоне 2 или экзоне 3, перед началом последовательности, кодирующей трансмембранный домен TCR- α . Конструкция из нуклеиновой кислоты последовательно кодирует, от N-конца к C-концу, переменную область гетерологичной β -цепи Т-клеточного рецептора (TCR), за которой следует переменная область гетерологичной α -цепи TCR. Конструкция также кодирует первый саморасщепляющийся пептид, который предшествует переменной области гетерологичной β -цепи TCR, и второй саморасщепляющийся пептид между переменной областью гетерологичной β -цепи TCR и переменной областью гетерологичной α -цепи TCR. Конструкция также кодирует N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR после переменной области гетерологичной α -цепи TCR. В зависимости от сайта вставки в гене TRAC, размер нуклеиновой кислоты, кодирующей N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR, может варьироваться. Размер нуклеиновой кислоты, кодирующей N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR, будет зависеть от количества нуклеотидов в эндогенной последовательности нуклеиновой кислоты TRAC между началом экзона 1 TRAC и целевым сайтом вставки. Например, см. фиг. 1а, где в конструкцию включены 25 нуклеотидов, кодирующих N-конец эндогенной α -субъединицы TCR, так как число нуклеотидов между началом экзона 1 TRAC и сайтом вставки составляет 25 нуклеотидов. Точно так же, если количество нуклеотидов между началом экзона 1 TRAC и сайтом вставки будет меньше или больше чем 25 нуклеотидов, то в конструкции нуклеиновая кислота, кодирующая N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR, может содержать меньше или больше чем 25 нуклеотидов. В некоторых примерах конструкция из нуклеиновой кислоты кодирует, от N-конца к C-концу, последовательность первого саморасщепляющегося пептида, гетерологичную цепь (т.е. переменную область и константную область) β -субъединицы TCR (напр., полноразмерную цепь β -субъединицы TCR), последовательность второго саморасщепляющегося пептида, переменную область гетерологичной цепи α -субъединицы TCR и N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR. Типичные конструкции включают те, что представлены на фиг. 1а.

[0083] Способы редактирования генома Т-клеток включают способ редактирования

генома Т-клеток человека, включающий вставку последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции в целевой участок экзона 1 гена β -субъединицы TCR (TRBC) в Т-клетках человека. В некоторых воплощениях целевой участок находится в экзоне 1 гена TRBC1 или TRBC2. Конструкция из нуклеиновой кислоты последовательно кодирует, от N-конца к С-концу, вариабельную область гетерологичной α -цепи Т-клеточного рецептора (TCR), за которой следует вариабельная область гетерологичной β -цепи TCR. Конструкция также кодирует первый саморасщепляющийся пептид, который предшествует вариабельной области гетерологичной α -цепи TCR, и второй саморасщепляющийся пептид между вариабельной областью гетерологичной α -цепи TCR и вариабельной областью гетерологичной β -цепи TCR. Конструкция также кодирует N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR после вариабельной области гетерологичной β -цепи TCR. В зависимости от сайта вставки в TRBC1 или TRBC2, размер нуклеиновой кислоты, кодирующей N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR, может варьироваться. Размер нуклеиновой кислоты, кодирующей N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR, будет зависеть от количества нуклеотидов в эндогенной последовательности нуклеиновой кислоты TRBC между началом экзона 1 TRBC1 или TRBC2 и целевым сайтом вставки. Например, см. фиг. 1b, где в конструкцию включены 25 нуклеотидов, кодирующих N-конец эндогенной β -субъединицы TCR, так как число нуклеотидов между началом экзона 1 TRBC и сайтом вставки составляет 25 нуклеотидов. Точно так же, если количество нуклеотидов между началом экзона 1 TRBC1 или TRBC2 и сайтом вставки будет меньше или больше чем 25 нуклеотидов, то в конструкции нуклеиновая кислота, кодирующая N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR, может содержать меньше или больше чем 25 нуклеотидов. В некоторых примерах конструкция из нуклеиновой кислоты кодирует, от N-конца к С-концу, последовательность первого саморасщепляющегося пептида, гетерологичную цепь (т.е. вариабельную область и константную область) α -субъединицы TCR (напр., полную размерную цепь α -субъединицы TCR), последовательность второго саморасщепляющегося пептида, вариабельную область гетерологичной цепи β -субъединицы TCR и N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR. Типичные конструкции включают те, что представлены на фиг. 1b.

[0084] Примеры саморасщепляющихся пептидов включают, без ограничения, саморасщепляющиеся вирусные 2А-пептиды, например, пептид свиного тешовируса-1 (P2A), пептид вируса *Thossea asigna* (T2A), пептид вируса лошадиного ринита А (E2A) или пептид вируса ящура (F2A). Саморасщепляющиеся 2А-пептиды позволяют экспрессировать множественные генные продукты из одной конструкции (напр., см. Chng

et al. "Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells," *MAbs* 7(2): 403-412 (2015)). В некоторых воплощениях первый и второй саморасщепляющиеся пептиды одинаковы. В других воплощениях первый и второй саморасщепляющиеся пептиды различны.

[0085] После вставки конструкция, кодирующая первый саморасщепляющийся пептид, гетерологичную полноразмерную β -цепь TCR, второй саморасщепляющийся пептид, варибельную область α -цепи TCR и N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR, в этом порядке, находится под контролем эндогенного промотора TCR- α и регуляторных элементов TCR- α . После того, как конструкция встроится в геном Т-клеток и будет под контролем эндогенного промотора TCR- α , Т-клетки можно культивировать в условиях, способствующих транскрипции встроенной конструкции в единую последовательность мРНК, кодирующую слитый полипептид. Слитый полипептид содержит первый саморасщепляющийся пептид, гетерологичную полноразмерную β -цепь TCR, второй саморасщепляющийся пептид, гетерологичную полноразмерную α -цепь TCR и N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR, в этом порядке.

[0086] Точно так же, после вставки в TRBC1 или TRBC2 конструкция, кодирующая первый саморасщепляющийся пептид, гетерологичную полноразмерную α -цепь TCR, второй саморасщепляющийся пептид, варибельную область β -цепи TCR и N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR, в этом порядке, находится под контролем эндогенного промотора TCR- β и регуляторных элементов TCR- β . После того, как конструкция встроится в геном Т-клеток и будет под контролем эндогенного промотора TCR- β , Т-клетки можно культивировать в условиях, способствующих транскрипции встроенной конструкции в единую последовательность мРНК, кодирующую слитый полипептид. Слитый полипептид содержит первый саморасщепляющийся пептид, гетерологичную полноразмерную α -цепь TCR, второй саморасщепляющийся пептид, гетерологичную полноразмерную β -цепь TCR и N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR, в этом порядке.

[0087] При вставке конструкции в экзон 1 гена TRAC остальные экзоны гена TRAC (экзоны 2 и 3) сплайсируются вместе с экзоном 1 в конечную последовательность мРНК. Трансляция этой последовательности мРНК приводит к экспрессии одного белка, который сам расщепляется на три отдельные полипептидные последовательности, т.е. неактивный эндогенный пептид варибельной области, лишенный трансмембранного домена (который может, напр., расщепляться в эндоплазматическом ретикулуме или секретироваться после трансляции), полноразмерную гетерологичную антиген-специфичную β -цепь TCR и

полноразмерную гетерологичную антиген-специфичную α -цепь TCR (см. фиг. 1а). Полноразмерная антиген-специфичная β -цепь TCR и полноразмерная антиген-специфичная α -цепь TCR образуют TCR с требуемой антигенной специфичностью.

[0088] Точно так же, при вставке конструкции в экзон 1 гена TRBC1/2 остальные экзоны гена TRBC1/2 (экзоны 2-4) сплайсируются вместе с экзоном 1 в конечную последовательность мРНК. Трансляция этой последовательности мРНК приводит к экспрессии одного белка, который сам расщепляется на три отдельные полипептидные последовательности, т.е. неактивный эндогенный пептид вариабельной области, лишенный трансмембранного домена (который может, напр., расщепляться в эндоплазматическом ретикулуме или секретироваться после трансляции), полноразмерную гетерологичную антиген-специфичную β -цепь TCR и полноразмерную гетерологичную антиген-специфичную α -цепь TCR. Полноразмерная антиген-специфичная β -цепь TCR и полноразмерная антиген-специфичная α -цепь TCR образуют TCR с требуемой антигенной специфичностью.

[0089] В качестве альтернативы в геном Т-клеток вставляется кодирующая последовательность гетерологичной α -цепи TCR, к примеру, последовательность, кодирующая вариабельную область α -цепи TCR, и кодирующая последовательность гетерологичной β -цепи TCR, к примеру, последовательность, кодирующая вариабельную область β -цепи TCR, причем гетерологичная α -цепь TCR вставляется в экзон 1 гена TRAC, а гетерологичная β -цепь TCR вставляется в экзон 1 гена TRBC. В некоторых воплощениях первая последовательность нуклеиновой кислоты или конструкция, кодирующая гетерологичную α -цепь TCR, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты или конструкция, кодирующая гетерологичную β -цепь TCR, используются для вставки гетерологичной α -цепи TCR в экзон 1 гена TRAC и гетерологичной β -цепи TCR в экзон 1 гена TRBC, соответственно.

[0090] В способах с использованием первой и второй конструкции из нуклеиновой кислоты целевой участок для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичную α -цепь TCR, находится в экзоне 1 гена TRAC. В некоторых воплощениях целевой участок для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичную β -цепь TCR, находится ниже эндогенного промотора TRBC1 или TRBC2 и располагается в экзоне 1 гена TRBC1 или TRBC 2. Первая нуклеиновая кислота кодирует последовательно, от N-конца к С-концу, первый саморасщепляющийся пептид, за которым следует гетерологичная α -цепь TCR, а за ней следует N-концевая часть эндогенной α -субъединицы TCR. Вторая конструкция нуклеиновой кислоты кодирует последовательно, от N-конца к С-концу, второй саморасщепляющийся пептид, за которым следует нуклеиновая кислота,

кодирующая гетерологичную β -цепь TCR, а за ней следует N-концевая часть эндогенной β -субъединицы TCR. Типичные конструкции включают те, что представлены на фиг. 2.

[0091] После вставки первая конструкция, кодирующая первый саморасщепляющийся пептид и гетерологичную α -цепь TCR, в этом порядке, находится под контролем эндогенного промотора TCR- α и регуляторных элементов TCR- α . Вторая конструкция, кодирующая второй саморасщепляющийся пептид и гетерологичную β -цепь TCR, в этом порядке, находится под контролем эндогенного промотора TCR- β и регуляторных элементов TCR- β . После того, как конструкции встроятся в геном Т-клеток и будут под контролем эндогенных промоторов TCR- α и TCR- β , Т-клетки культивируют в условиях, способствующих транскрипции первой конструкции и второй конструкции в отдельные последовательности мРНК. При вставке первой конструкции в экзон 1 гена TRAC остальные экзоны гена TRAC (экзоны 2 и 3) сплайсируются вместе с экзоном 1 в конечную последовательность мРНК, кодирующую полноразмерную гетерологичную α -цепь TCR. Точно так же, при вставке второй конструкции в экзон 1 гена TRBC остальные экзоны гена TRBC (экзоны 2 и 3) сплайсируются вместе с экзоном 1 в последовательность мРНК, кодирующую полноразмерную гетерологичную β -цепь TCR.

[0092] Трансляция последовательности мРНК, кодирующей первый саморасщепляющийся пептид и полноразмерную гетерологичную α -цепь TCR, приводит к экспрессии неактивного эндогенного пептида варибельной области, лишённого трансмембранного домена (который может, напр., расщепляться в эндоплазматическом ретикулуме или секретироваться после трансляции), и полноразмерной гетерологичной антиген-специфичной α -цепи TCR. Трансляция последовательности мРНК, кодирующей второй саморасщепляющийся пептид и полноразмерную гетерологичную β -цепь TCR, приводит к экспрессии неактивного эндогенного пептида варибельной области, лишённого трансмембранного домена (который может, напр., расщепляться в эндоплазматическом ретикулуме или секретироваться после трансляции), и полноразмерной гетерологичной антиген-специфичной β -цепи TCR. Полноразмерная гетерологичная антиген-специфичная β -цепь TCR и полноразмерная гетерологичная антиген-специфичная α -цепь TCR образуют TCR с требуемой антигенной специфичностью.

[0093] В приведенных здесь способах варибельная область гетерологичной β -цепи TCR включает варибельные (V), разнообразные (D) и соединительные (J) аллели. В приведенных здесь способах варибельная область гетерологичной α -цепи TCR включает аллели V и J. Напр., см. Kuby J., Immunology, 7th Ed., W.H. Freeman & Co., New York (2013).

[0094] В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты вставляется в геном Т-клеток путем введения вектора, к примеру, вирусного вектора, содержащего эту нуклеиновую кислоту. Примеры вирусных векторов включают, без ограничения, аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы, ретровирусные векторы или лентивирусные векторы. В некоторых воплощениях лентивирусный вектор представляет собой дефектный по интегразе лентивирусный вектор.

[0095] В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты вставляется в геном Т-клеток посредством безвирусной доставки. В безвирусных способах доставки нуклеиновая кислота может представлять собой голую ДНК либо невирусную плазмиду или вектор.

[0096] В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота вставляется в Т-клетки путем введения в них (а) направленной нуклеазы, которая расщепляет целевой участок в экзоне 1 гена TRAC, создавая сайт вставки в геноме Т-клетки; и (b) последовательности нуклеиновой кислоты, причем последовательность нуклеиновой кислоты включается в сайт вставки по механизму HDR. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота вставляется в Т-клетки путем введения в них (а) направленной нуклеазы, которая расщепляет целевой участок в экзоне 1 гена TRBC, создавая сайт вставки в геноме Т-клетки; и (b) последовательности нуклеиновой кислоты, причем последовательность нуклеиновой кислоты включается в сайт вставки по механизму HDR.

[0097] В некоторых воплощениях способ дополнительно включает введение в клетки направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком экзона 1 гена TRAC. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает введение в клетки направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком экзона 1 гена TRBC.

[0098] В воплощениях с использованием первой и второй последовательности нуклеиновой кислоты для вставки гетерологичной α -цепи TCR и гетерологичной β -цепи TCR в экзон 1 гена TRAC и экзон 1 гена TRBC, соответственно, первая и вторая нуклеиновая кислота вводятся в Т-клетки путем введения в них: (а) одной или нескольких направленных нуклеаз, которые создают первый сайт вставки в экзоне 1 гена TRAC и второй сайт вставки в экзоне 1 гена TRBC; (b) первой последовательности нуклеиновой кислоты; и (c) второй последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает введение в клетки направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком экзона 1 гена TRAC, и направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком экзона 1 гена TRBC.

[0099] В некоторых воплощениях каждый из 5'- и 3'-концов последовательности нуклеиновой кислоты содержит последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим целевой участок в геноме Т-клеток, к примеру, целевой участок в экзоне 1 гена TRAC или целевой участок в экзоне 1 гена TRBC. В некоторых случаях последовательность нуклеотидов, которая гомологична геномной последовательности, имеет длину от 50 до 300 нуклеотидов. В некоторых случаях последовательность нуклеотидов, которая гомологична геномной последовательности или её части, по меньшей мере на 80, 90, 95% комплементарна геномной последовательности. В некоторых воплощениях 5'- и 3'-концы последовательности нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям на сайте вставки в экзоне 1 гена TRAC. В некоторых воплощениях 5'- и 3'-концы последовательности нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в экзоне 1 гена TRBC.

[0100] В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты вводится в клетки в виде линейной ДНК-матрицы. В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты вводится в клетки в виде двухцепочечной ДНК-матрицы. В некоторых случаях ДНК-матрица представляет собой одноцепочечную ДНК-матрицу. В некоторых случаях одноцепочечная ДНК-матрица представляет собой чистую одноцепочечную ДНК-матрицу. В настоящем изобретении “чистая одноцепочечная ДНК” означает такую одноцепочечную ДНК, которая практически лишена другой или противоположной нити ДНК. “Практически лишена” означает то, что чистая одноцепочечная ДНК содержит по меньшей мере в 100 раз больше одной нити, чем другой нити ДНК. В некоторых случаях ДНК-матрица представляет собой двухцепочечную или одноцепочечную плазмиду или мини-кольцо.

[0101] В некоторых воплощениях направленная нуклеаза выбирается из группы, состоящей из РНК-направляемого нуклеазного домена, эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), нуклеаз типа цинкового пальца (ZFN) и мега-TAL (к примеру, см. Merkert and Martin “Site-specific genome engineering in human pluripotent stem cells”

Int. J. Mol. Sci. 18(7): 1000 (2016)). В некоторых воплощениях РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, а способ дополнительно включает введение в клетки направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в геноме Т-клеток, к примеру, с целевым участком в экзоне 1 гена TRAC. В других воплощениях РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, а способ дополнительно

включает введение в клетки направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 гена TRBC.

[0102] В настоящем изобретении последовательность направляющей РНК (гидРНК) представляет собой последовательность, которая взаимодействует с сайт-специфичной или направленной нуклеазой и специфически связывается или гибридизуется с целевой нуклеиновой кислотой в геноме клетки так, что гидРНК и направленная нуклеаза локализуются вместе с целевой нуклеиновой кислотой в геноме клетки. Каждая гидРНК включает в себя наводящую на ДНК последовательность или последовательность протоспейсера длиной от 10 до 50 нуклеотидов, которая специфически связывается или гибридизуется с целевой последовательностью ДНК в геноме. Например, наводящая на ДНК последовательность имеет длину в 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов. В некоторых воплощениях гидРНК содержит последовательность sgРНК и последовательность трансактивирующей sgРНК (tracrРНК). В некоторых воплощениях гидРНК не содержит последовательности tracrRNA.

[0103] Как правило, нацеливающая на ДНК последовательность составляется так, чтобы она была комплементарна (напр., полностью комплементарна) или практически комплементарна целевой последовательности ДНК. В некоторых случаях нацеливающая на ДНК последовательность может включать в себя неоднозначные или вырожденные основания для связывания множественных генетических элементов. В некоторых случаях 19 нуклеотидов на 3'- или 5'-конце участка связывания полностью комплементарны целевому генетическому элементу или элементам. В некоторых случаях участок связывания может быть изменен для повышения стабильности. Например, для повышения устойчивости РНК к деградации могут быть включены неприродные нуклеотиды. В некоторых случаях участок связывания может быть изменен или спроектирован так, чтобы избежать или уменьшить образование вторичной структуры в участке связывания. В некоторых случаях участок связывания может быть спроектирован для оптимизации содержания G-C. В некоторых случаях содержание G-C предпочтительно составляет от 40% до 60% (напр., 40%, 45%, 50%, 55%, 60%). 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 в составе комплекса с ДНК-матрицей вводится двухцепочечный разрыв в целевую нуклеиновую кислоту. В приведенных здесь способах в Т-клетки может вводиться полипептид Cas9 или нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид Cas9. Двухцепочечный разрыв может подвергаться репарации по HDR для вставки ДНК-матрицы в геном Т-клеток. В

описанных здесь способах могут использоваться различные нуклеазы Cas9. Например, может использоваться нуклеаза Cas9, которой требуется прилегающий к протоспейсеру мотив (PAM) NGG непосредственно 3' от участка, на который нацелена направляющая РНК. Такие нуклеазы Cas9 могут быть нацелены на участок в экзоне 1 TRAC или экзоне 1 TRBC, содержащий последовательность NGG. В качестве другого примера могут использоваться белки Cas9 с потребностью в ортогональных мотивах PAM для наведения на последовательности, не содержащие прилегающей к PAM последовательности NGG. Типичные белки Cas9 со специфичностью к ортогональным последовательностям PAM включают, без ограничения, описанные в Esvelt et al., *Nature Methods* 10: 1116-1121 (2013).

[0104] В некоторых случаях белок Cas9 представляет собой никазу, так что при связывании с целевой нуклеиновой кислотой в составе комплекса с направляющей РНК в целевую нуклеиновую кислоту вводится одноцепочечный разрыв или надрез (“ник”). Пара никаз Cas9, каждая из которых связана со структурно другой направляющей РНК, может быть нацелена на два проксимальных сайта целевой области генома и тем самым вводит пару проксимальных одноцепочечных разрывов в целевой участок генома, например, экзон 1 гена TRAC или экзон 1 гена TRBC. Пары никаз могут обеспечить повышенную специфичность, так как внецелевые эффекты могут приводить к появлению одиночных надрезов, которые обычно подвергаются репарации без повреждения по механизмам репарации с выщеплением оснований. Типичные никазы Cas9 включают нуклеазы Cas9 с мутацией D10A или H840A (к примеру, см. Ran et al. “Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity” *Cell* 154(6): 1380-1389 (2013)).

[0105] В некоторых воплощениях нуклеаза Cas9, направляющая РНК и последовательность нуклеиновой кислоты вводятся в клетки в виде комплекса рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) с ДНК-матрицей, причем комплекс РНП-ДНК матрицы содержит: (i) РНП, причем РНП содержит нуклеазу Cas9 и направляющую РНК; и (ii) ДНК-матрицу, кодирующую гетерологичную β -цепь TCR и гетерологичную α -цепь TCR, причем ДНК матрицы вставляется в экзон 1 гена TRAC посредством HDR. В некоторых воплощениях нуклеаза Cas9, направляющая РНК и последовательность нуклеиновой кислоты вводятся в клетки в виде комплекса рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) с ДНК-матрицей, причем комплекс РНП-ДНК матрицы содержит: (i) РНП, причем РНП содержит нуклеазу Cas9 и направляющую РНК; и (ii) ДНК-матрицу, кодирующую гетерологичную β -цепь TCR и гетерологичную α -цепь TCR, причем ДНК матрицы вставляется в экзон 1 гена TRBC посредством HDR.

[0106] В некоторых воплощениях с использованием отдельных конструкций для вставки гетерологичной α -цепи TCR в экзон 1 гена TRAC в Т-клетках и гетерологичной β -

цепи TCR в экзон 1 гена TRBC в Т-клетках в клетки вводятся: (a) первый комплекс РНП-ДНК матрицы, причем первый комплекс РНП-ДНК матрицы содержит: (i) первый РНП, причем РНП содержит нуклеазу Cas9 и первую направляющую РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 гена TRAC; и (ii) ДНК-матрицу, кодирующую гетерологичную α -субъединицу TCR; и (b) второй комплекс РНП-ДНК матрицы, причем второй комплекс РНП-ДНК матрицы содержит: (i) второй РНП, причем второй РНП содержит нуклеазу Cas9 и вторую направляющую РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 гена TRBC; и (ii) ДНК-матрицу, кодирующую гетерологичную β -субъединицу TCR. В некоторых воплощениях нуклеаза Cas9 в первом комплексе РНП-ДНК матрицы и нуклеаза Cas9 во втором комплексе РНП-ДНК матрицы одинаковы. В некоторых воплощениях нуклеаза Cas9 в первом комплексе РНП-ДНК матрицы и нуклеаза Cas9 во втором комплексе РНП-ДНК матрицы различны.

[0107] В некоторых воплощениях молярное соотношение РНП к ДНК матрицы 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.

[0108] В некоторых воплощениях ДНК-матрица в комплексе РНП-ДНК матрицы находится в концентрации от 2,5 до 25 пМ. В некоторых воплощениях содержание ДНК-матрицы составляет от 1 мкг до 10 мкг.

[0109] В некоторых случаях комплекс РНП-ДНК матрицы образуется при инкубации РНП с ДНК-матрицей в течение от менее 1 мин до 30 мин при температуре от 20°C до 25°C. В некоторых воплощениях комплекс РНП-ДНК матрицы смешивают с клетками перед введением комплекса РНП-ДНК матрицы в клетки.

[0110] В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты или комплекс РНП-ДНК матрицы вводится в Т-клетки путем электропорации. Способы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса РНП-ДНК матрицы могут включать те, что описаны в приведенных здесь примерах. Дополнительные или альтернативные способы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса РНП-ДНК матрицы могут включать те, что описаны в WO 2006/001614 или Kim J.A. et al., Biosens. Bioelectron. 23, 1353-1360 (2008). Дополнительные или альтернативные способы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса РНП-ДНК матрицы могут включать те, что описаны в U.S. Patent Appl. Pub. Nos. 2006/0094095; 2005/0064596; или 2006/0087522. Дополнительные или альтернативные способы, композиции и устройства для

электропорации клеток для введения комплекса РНП-ДНК матрицы могут включать те, что описаны 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; U.S. Patent Appl.Pub.Nos. 2014/0017213; и 2012/0088842. Дополнительные или альтернативные способы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса РНП-ДНК матрицы могут включать те, что описаны в Geng T. et al., *J. Control Release* 144, 91-100 (2010); и Wang J. et al., *Lab. Chip* 10, 2057-2061 (2010).

[0111] В некоторых воплощениях в клетки вводятся несколько комплексов РНП-ДНК матрицы, содержащих по меньшей мере два структурно различных комплекса РНП-ДНК матрицы. В настоящем изобретении выражение “несколько” означает два или больше. В некоторых воплощениях эти по меньшей мере два структурно различных комплекса РНП-ДНК матрицы содержат структурно разные направляющие РНК. В некоторых воплощениях, в которых эти по меньшей мере два структурно различных комплекса РНП содержат структурно разные направляющие РНК, каждый из структурно различных комплексов РНП содержит ниразу Cas9, а структурно разные направляющие РНК гибридизуются с противоположными нитями целевого участка.

[0112] В некоторых воплощениях по меньшей мере две структурно разные нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR и вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR, вводятся в экзон 1 гена TRAC в популяции Т-клеток. Таким образом в популяцию Т-клеток можно вводить несколько последовательностей нуклеиновых кислот, причем каждая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует уникальную комбинацию гетерологичной β -цепи TCR и гетерологичной α -цепи TCR. Каждая из последовательностей нуклеиновых кислот может вводиться в клетки в составе комплекса РНП-ДНК матрицы.

[0113] Например, направленная нуклеаза может образовать комплекс с множеством (напр., 2, 3, 4, 5 или больше, напр., 2-10, 5-100, 20-100) уникальных ДНК-матриц, кодирующих вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR и вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR. Это множество комплексов можно одновременно ввести в популяцию Т-клеток для вставки единых ДНК-матриц, кодирующей уникальную комбинацию вариабельной области гетерологичной β -цепи TCR и вариабельной области гетерологичной α -цепи TCR, в экзон 1 гена TRAC в индивидуальных Т-клетках. Хотя каждая Т-клетка будет приобретать только одну матрицу ДНК, но во всей популяции клеток многие уникальные, структурно разные ДНК-матрицы будут встраиваться в Т-клетки, создавая библиотеку гетерологичных последовательностей TCR.

[0114] В некоторых воплощениях с использованием отдельных конструкций для

вставки гетерологичной α -цепи TCR в экзон 1 гена TRAC и гетерологичной β -цепи TCR в экзон 1 гена TRBC первая направленная нуклеаза может образовывать комплекс с множеством уникальных ДНК-матриц, кодирующих вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR, образуя множество первых комплексов РНП-ДНК матрицы, а вторая направленная нуклеаза может образовывать комплекс с множеством уникальных ДНК-матриц, кодирующих вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR, образуя множество вторых комплексов РНП-ДНК матрицы. Первое и второе множество комплексов можно одновременно ввести в популяцию Т-клеток для создания библиотеки гетерологичных последовательностей TCR.

[0115] Гетерологичный Т-клеточный репертуар можно разработать и составить из ранее известных последовательностей TCR, а также из природных репертуаров, обнаруженных в представляющих интерес эндогенных популяциях Т-клеток. Например, последовательности TCR могут представлять собой последовательности TCR, полученные из инфильтрирующих опухоли лимфоцитов, из аутореактивных Т-клеток в очагах аутоиммунных заболеваний или из реагирующих на патоген Т-клеток.

[0116] В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты или комплекс РНП-ДНК матрицы вводят в клетки от 1×10^5 до 2×10^6 Т-клеток. Например, последовательность нуклеиновой кислоты или комплекс РНП-ДНК-матрицы можно вводить в клетки от 1×10^5 клеток до 5×10^5 клеток, от 1×10^5 клеток до 1×10^6 клеток, от 1×10^5 клеток до $1,5 \times 10^6$ клеток, от 1×10^5 клеток до 2×10^6 клеток, от 1×10^6 клеток до $1,5 \times 10^6$ клеток или от 1×10^6 клеток до 2×10^6 клеток.

[0117] В представленных здесь способах и композициях Т-клетки человека могут представлять собой первичные Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки. В некоторых воплощениях эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки CD8⁺. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки CD4⁺CD8⁺. Также предусмотрены популяции любых клеток, модифицированных каким-либо из описанных здесь способов. Клетки могут быть *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых случаях Т-клетки извлекают у субъекта, модифицируют любым из описанных здесь способов и вводят пациенту.

[0118] В некоторых воплощениях модифицированные Т-клетки культивируют в условиях, способствующих экспрессии гетерологичной β -цепи TCR и гетерологичной α -цепи TCR с образованием гетерологичного антиген-специфичного Т-клеточного рецептора. В других воплощениях Т-клетки культивируют в условиях, эффективных для размножения популяции модифицированных клеток. В некоторых воплощениях Т-клетки,

экспрессирующие антиген-специфичный Т-клеточный рецептор, очищают.

Композиции

[0119] Также предусмотрены Т-клетки человека, полученные любым из представленных здесь способов. Также предусмотрены популяции Т-клеток человека, полученных любым из представленных здесь способов. А также предусмотрены множества Т-клеток человека, в которых геном по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% и более клеток содержит целевую вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, причем нуклеиновая кислота вставлена в экзон 1 TRAC или экзон 1 TRBC. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки. В некоторых воплощениях эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки CD8⁺. В некоторых воплощениях Т-клетки представляют собой Т-клетки CD4⁺CD8⁺.

[0120] Также предусмотрены Т-клетки, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) первую гетерологичную цепь субъединицы TCR, причем эта цепь субъединицы TCR содержит константную область и вариабельную область субъединицы TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) вариабельную область второй гетерологичной цепи субъединицы TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной субъединицы TCR, причем, если эндогенной субъединицей TCR является альфа-субъединица TCR (TCR- α), то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь бета-субъединицы TCR (TCR- β), а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR, а если эндогенной субъединицей TCR является β -субъединица TCR, то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR, а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь β -субъединицы TCR. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты кодирует, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) гетерологичную цепь β -субъединицы TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) вариабельную область гетерологичной цепи α -субъединицы TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной цепи α -субъединицы TCR. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты кодирует, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) гетерологичную цепь α -субъединицы TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) вариабельную область гетерологичной цепи β -субъединицы TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной β -

субъединицы TCR.

[0121] Также предусмотрены модифицированные Т-клетки, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR, причем последовательность нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRAC. В некоторых примерах нуклеиновая кислота кодирует, от N-конца к С-концу: последовательность первого саморасщепляющегося пептида, гетерологичную (напр., полноразмерную) цепь β -субъединицы TCR, последовательность второго саморасщепляющегося пептида и вариабельную область гетерологичной цепи α -субъединицы TCR.

[0122] Также предусмотрены модифицированные Т-клетки, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR, причем последовательность нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRBC. В других примерах нуклеиновая кислота кодирует, от N-конца к С-концу: последовательность первого саморасщепляющегося пептида, гетерологичную (напр., полноразмерную) цепь α -субъединицы TCR, последовательность второго саморасщепляющегося пептида и вариабельную область гетерологичной цепи β -субъединицы TCR.

[0123] Также предусмотрены модифицированные Т-клетки, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR; (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида; (iv) вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR; и (v) N-концевую часть эндогенной γ -субъединицы TCR, причем последовательность нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRGC.

[0124] А также предусмотрены модифицированные Т-клетки, содержащие: а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR; и (iii) N-концевую часть эндогенной α -цепи TCR; и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу: (i)

последовательность первого саморасщепляющегося пептида; (ii) вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR; и (iii) N-концевую часть эндогенной β -цепи TCR; причем последовательность первой нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRAC, а последовательность второй нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRBC.

Способы лечения

[0125] Любые из описанных здесь способов и композиций можно использовать для лечения или профилактики заболеваний (напр., рака, инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, отторжения трансплантатов, реакций трансплантат против хозяина или других воспалительных заболеваний у субъектов). В представленных здесь способах лечения можно получить последовательность нуклеиновой кислоты, включающую α -цепь или β -цепь TCR из T-клеток у субъекта, страдающего, к примеру, раком, инфекционным заболеванием, аутоиммунным заболеванием, возможным отторжением трансплантата, реакцией трансплантат против хозяина или другим воспалительным заболеванием. Например, можно выделить инфильтрующие опухоль лимфоциты, T-клетки в аутоиммунных очагах или из чувствительных к патогену лимфоцитов у субъекта для получения последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей α -цепь или β -цепь TCR. В некоторых воплощениях можно использовать моноклональные или поликлональные последовательности TCR, идентифицированные из образцов пациента. Например, можно получить репертуары TCR из опухолей или воспаленных участков и получить клетки со специфичностью к этим антигенам путем синтеза последовательностей TCR и использования их в качестве ДНК-матриц. С другой стороны, можно амплифицировать эти последовательности, к примеру, методом ПЦР, из клонов/отдельных клеток от субъекта и использовать амплифицированные последовательности в качестве ДНК-матриц. После получения последовательностей α -цепей и β -цепей TCR эти последовательности можно вставить в популяцию T-клеток у субъекта или от субъекта для замены эндогенного TCR T-клеток у субъекта на гетерологичный TCR с требуемой антигенной специфичностью. В некоторых воплощениях популяцию модифицированных T-клеток можно ввести субъекту для лечения заболевания. К примеру, см. фиг. 3В.

[0126] Предусмотрен способ лечения рака у человека, включающий модификацию T-клеток субъекта любым из описанных здесь способов для экспрессии антиген-специфичного T-клеточного рецептора, причем T-клеточный рецептор распознает опухолеспецифичный антиген у субъекта.

[0127] В некоторых воплощениях подлежащий лечению рак выбирают из рака В-клеточного происхождения, рака молочной железы, рака желудка, нейробластомы,

остеосаркомы, рака легких, рака толстой кишки, хронического миелоидного рака, лейкемии (напр., острой миелоидной лейкемии, хронической лимфоцитарной лейкемии (CLL) или острой лимфоцитарной лейкемии (ALL)), рака простаты, рака толстой кишки, почечно-клеточного рака, рака печени, рака почек, рака яичников, рака желудка, рака яичек, рабдомиосаркомы и лимфомы Ходжкина. В некоторых воплощениях рак В-клеточного происхождения выбирают из группы, состоящей из В-клеточной острой лимфобластной лейкемии, В-клеточной хронической лимфоцитарной лейкемии и В-клеточной неходжкинской лимфомы.

[0128] В некоторых воплощениях описанных здесь способов лечения, к примеру, лечения рака, инфекционных заболеваний или аутоиммунных заболеваний, Т-клетки подвергаются модификации *in vivo*. Пациентам вводят любые из описанных здесь конструкций *in vivo*. К примеру, 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).

[0129] В некоторых воплощениях способ лечения рака у человека включает: а) получение Т-клеток от субъекта; б) модификацию Т-клеток любым из приведенных здесь способов для экспрессии гетерологичного антиген-специфичного Т-клеточного рецептора, причем Т-клеточный рецептор распознает опухолеспецифичный антиген у субъекта; и с) введение модифицированных Т-клеток субъекту. В настоящем изобретении выражение “опухолеспецифичный антиген” означает антиген, который уникален для раковых клеток или экспрессируется сильнее в раковых клетках, чем в нераковых клетках.

[0130] Также предусмотрен способ лечения аутоиммунных заболеваний у человека, включающий модификацию Т-клеток субъекта любым из описанных здесь способов для экспрессии гетерологичного антиген-специфичного Т-клеточного рецептора, причем Т-клеточный рецептор распознает антиген, связанный с аутоиммунным заболеванием.

[0131] В некоторых воплощениях способ лечения аутоиммунных заболеваний у человека включает: а) получение Т-клеток от субъекта; б) модификацию Т-клеток любым из приведенных здесь способов для экспрессии гетерологичного антиген-специфичного Т-клеточного рецептора, причем Т-клеточный рецептор распознает антиген, связанный с аутоиммунным заболеванием у субъекта; и с) введение модифицированных Т-клеток субъекту. В некоторых воплощениях Т-клетки представляет собой регуляторные Т-клетки.

[0132] Также предусмотрен способ лечения инфекций у человека, включающий модификацию Т-клеток субъекта любым из описанных здесь способов для экспрессии гетерологичного антиген-специфичного Т-клеточного рецептора, причем Т-клеточный

рецептор распознает антиген, связанный с инфекцией у субъекта.

[0133] В некоторых воплощениях способ лечения инфекций у человека включает:

а) получение Т-клеток от субъекта; б) модификацию Т-клеток любым из приведенных здесь способов для экспрессии гетерологичного антиген-специфичного Т-клеточного рецептора, причем Т-клеточный рецептор распознает антиген, связанный с инфекцией у субъекта; и с) введение модифицированных Т-клеток субъекту.

[0134] Любые из представленных здесь способов лечения могут также включать размножение популяции Т-клеток перед заменой эндогенного TCR на гетерологичный TCR. Любые из представленных здесь способов лечения могут также включать размножение популяции Т-клеток после замены эндогенного TCR на гетерологичный TCR и перед введением субъекту.

[0135] Раскрыты материалы, композиции и компоненты, которые могут применяться, могут применяться в сочетании, могут применяться при получении или являются продуктами раскрытых способов и композиций. Эти и другие материалы раскрыты здесь и подразумевается, что если раскрыты комбинации, подмножества, взаимодействия, группы и т.д. этих материалов, то, хотя конкретные ссылки на различные индивидуальные и коллективные комбинации и перестановки этих соединений могут и не быть изложены в явном виде, но каждый из них специально предусмотрен и описан здесь. Например, если раскрыт и обсужден способ и обсуждается ряд модификаций, которые могут быть внесены в одну или несколько молекул, входящих в этот способ, то специально предусмотрены всевозможные комбинации и перестановки способа и возможные модификации, если специально не указано иначе. Точно так же специально предусмотрены и раскрыты любые их подмножества или комбинации. Эта концепция применима ко всем аспектам настоящего изобретения, включая, без ограничения, стадии способов с использованием раскрытых композиций. Таким образом, если существуют различные дополнительные стадии, которые могут выполняться, то подразумевается, что каждая из этих дополнительных стадий может выполняться с любыми конкретными стадиями способа или комбинациями стадий раскрытых способов, а каждая такая комбинация или группа комбинаций специально предусмотрена и должна рассматриваться как раскрытая.

[0136] Цитируемые здесь публикации и материалы, по поводу которых они цитируются, специально включены сюда путем ссылки во всей полноте.

ПРИМЕРЫ

[0137] Следующие примеры приводятся только для иллюстрации, а не для ограничения. Специалисты в данной области смогут легко распознать различные

некритические параметры, которые можно изменять или модифицировать с получением практически таких же или близких результатов.

Выделение первичных Т-клеток человека для работы с генами

[0138] Первичные Т-клетки человека от здоровых доноров крови выделяли из свежих образцов цельной крови, остатков из лейкоредукционных камер после афереза Trima (Blood Centers of the Pacific) либо из продуктов лейкоафереза (StemCell). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из образцов цельной крови путем центрифугирования в фиколле с использованием пробирок SepMate (StemCell, согласно инструкциям производителя). Т-клетки выделяли из PBMC от всех источников клеток путем магнитно-негативного отбора с помощью набора EasySep Kit для выделения Т-клеток человека (StemCell, согласно инструкциям производителя). Если не указано иначе, выделенные Т-клетки стимулировали и использовали напрямую (свежими). При использовании замороженных клеток оттаивали выделенные ранее Т-клетки, которые были заморожены в замораживающей среде Vambanker (Bulldog Bio) согласно инструкциям производителя, и культивировали в среде без стимуляции в течение 1 дня, а затем стимулировали и обрабатывали, как описано для свежевыделенных образцов. Здоровые доноры свежей крови человека давали согласие в соответствии с протоколом, утвержденным Комитетом UCSF по исследованиям на людях (CHR). Образцы пациентов для редактирования генов получали в соответствии с протоколом, утвержденным Yale Internal Review Board (IRB).

Культивирование первичных Т-клеток

[0139] Если не указано иначе, массу Т-клеток культивировали в среде XVivo™ 15 (StemCell) с 5% фетальной телячьей сыворотки, 50 мМ 2-меркаптоэтанола и 10 мМ N-ацетил-L-цистина. В указанных экспериментах (фиг. 15) использовали бессывороточные среды (среда для размножения Т-клеток ImmunoCult XF, StemCell) без добавок, а также RPMI + 10% FBS. Сразу после выделения Т-клетки стимулировали в течение 2 дней с помощью магнитных шариков 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. Во время всего культивирования Т-клетки поддерживали при плотности примерно 1 миллион 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 переносили клетки в более крупные культуральные сосуды по мере необходимости для поддержания плотности в 1 миллион клеток/мл.

Получение РНП

[0140] РНП получали путем отжига двухкомпонентной рНК с Cas9, как описано ранее (Schumann et al. PNAS 112: 10437-10442 (2015); и Hultquist et al. Cell Rep. 17: 1438-1452 (2016)). Вкратце, химически синтезировали crRNAs и tracrRNAs (Dharmacon, IDT) и получали рекомбинантно и очищали рекомбинантные Cas9-NLS, D10A-NLS или dCas9-NLS (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 80 мкМ раствор гидРНК. 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 мРНК (молярное соотношение гидРНК и Cas9 = 2:1) при 37°C в течение 15 мин, получая РНП при 20 мкМ. РНПs обычно подвергали электропорации сразу после образования комплекса.

Получение дцДНК HDRT

[0141] Двухцепочечные последовательности ДНК для HDR-матриц (HDRT) получали из продуктов ПЦР. Новые последовательности для HDR конструировали с помощью Gibson Assemblies и вставляли последовательности HDR-матриц, состоящих из гомологических плеч (обычно синтезированных в виде gBlocks от 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 (дцДНК HDRT) очищали на шариках SPRI (×1,0) и элюировали в конечном объеме 3 мкл H₂O на 100 мкл продукта реакции ПЦР. Концентрации HDRT определяли методом Nanodrop при разведении 1:20. Размер амплифицированных HDRT проверяли методом гель-электрофореза в 1,0% агарозном геле.

Получение оцДНК HDRT путем расщепления экзонуклеазой

[0142] Для получения длинной оцДНК в качестве донора для HDR нужную ДНК амплифицировали методом ПЦР, используя один обычный немодифицированный ПЦР-праймер и второй фосфорилированный ПЦР-праймер. Нить ДНК, которая будет амплифицирована с помощью фосфорилированного праймера, будет той нитью, которая будет разрушаться в этом методе. Это позволяет получать либо одноцепочечную смысловую, либо одноцепочечную антисмысловую ДНК, используя соответствующий фосфорилированный праймер для ПЦР. Для получения нужной нити оцДНК фосфорилированную нить продукта ПЦР расщепляли путем последовательной обработки 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 оцДНК HDR-матриц очищали на шариках SPRI ($\times 1,0$) и элюировали в H₂O. Более подробный протокол для системы Guide-it™ для получения длинной оцДНК (Takara Bio USA, Inc., кат. № 632644) можно найти на веб-сайте производителя.

Получение оцДНК HDRT путем обратного синтеза

[0143] Доноры из оцДНК синтезировали путем обратной транскрипции промежуточной РНК с последующим гидролизом нити РНК в полученном гибридном продукте РНК:ДНК, как описано в Leonetti et al. на <http://www.biorxiv.org/content/early/2017/08/21/178905>). Вкратце, сначала клонировали требуемый донор для HDR ниже промотора T7, а затем амплифицировали последовательность T7-донор HDR методом ПЦР. РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 HiScribe (New England Biolabs) и подвергали обратной транскрипции с помощью TGIRT-III (InGex). После обратной транскрипции добавляли NaOH и EDTA 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, а конечный продукт оцДНК очищали на магнитных шариках Ampure XP (Beckman Coulter) и элюировали в стерильной, свободной от РНКазы H₂O. Качество оцДНК анализировали методом капиллярного электрофореза (Bioanalyzer, Agilent).

Электропорация первичных Т-клеток

[0144] РНП и HDR-матрицы подвергали электропорации через 2 дня после начальной стимуляции Т-клеток. Т-клетки собирали из культуральных сосудов и удаляли магнитные шарики Dynabeads CD3/CD28, помещая клетки на магнит на 2 минуты. Непосредственно перед электропорацией клетки без шариков центрифугировали 10 минут при 90×g, всасывали и ресуспендировали в буфере для электропорации Р3 фирмы Lonza по 20 мкл буфера на 1 миллион клеток. Для оптимального редактирования проводили электропорацию 1 миллиона Т-клеток на лунку, используя 96-луночную систему электропорации Lonza 4D с импульсным кодом EH115. Альтернативные концентрации клеток от 200 000 до 2 миллионов клеток на лунку проявляли меньшую эффективность. Альтернативные буферы для электропорации использовались, как указано, но они имели другие оптимальные настройки импульсов (EO155 для буфера OMEM). Если не указано иначе, подвергали электропорации 2,5 мкл РНП (то есть 50 пмоль) вместе с 2 мкл HDR-матрицы при 2 мкг/мкл (то есть 4 мкг HDR-матрицы).

[0145] Для 96-луночных экспериментов сначала вносили HDRT в лунки 96-луночного полипропиленового планшета с V-образным дном. Затем добавляли РНП к HDRT и инкубировали вместе при комнатной температуре в течение как минимум 30 сек.

Наконец, добавляли клетки, ресуспендированные в буфере для электропорации, быстро смешивали пипеткой с HDRT и РНП и переносили 24 мкл общего объема (клетки + РНП + HDRT) в 96-луночный планшет типа кюветы для электропорации. Сразу же после электропорации в каждую лунку добавляли 80 мкл предварительно нагретой среды (без цитокинов) и оставляли клетки в покое на 15 минут при 37°C в инкубаторе для клеточных культур, оставаясь в кюветах для электропорации. Через 15 минут клетки переносили в конечные культуральные сосуды.

Безвирусная замена эндогенного Т-клеточного рецептора с помощью единой HDR-матрицы

[0146] И α -цепи TCR, и β -цепи TCR могут быть внедрены одновременно за один мультиплексный цикл редактирования (фиг. 2). Это аналогично стратегии внедрения на фиг. 1a и фиг. 1b, за исключением того, что в локусы константных областей TCR- α и TCR- β вставляются только переменные области требуемого антиген-специфичного TCR. Это дает преимущество в уменьшении общего размера вставок (с одной вставки в 1,5 т.п.н. до двух вставок по 500 п.н.), а также означает, что любая Т-клетка, экспрессирующая обе цепи требуемого антиген-специфичного TCR, будет иметь нокаут обеих ранее сочетавшихся эндогенных α - и β -цепей TCR, предотвращая, к примеру, возможное нежелательное спаривание вставленной антиген-специфичной α -цепи TCR с эндогенной β -цепью TCR.

Замена эндогенного TCR с помощью поликлональной библиотеки Т-клеточных рецепторов

[0147] Поскольку гидРНК и гомологические плечи одинаковы для замены эндогенного TCR на любую требуемую новую гетерологичную последовательность TCR, то можно одновременно проводить электропорацию множества различных ДНК-матриц, содержащих множество требуемых TCR. Хотя любая конкретная Т-клетка будет приобретать только один TCR из множества требуемых TCR, однако во всей популяции электропорированных клеток будут встраиваться многие ДНК-матрицы TCR, создавая тем самым синтетический репертуар Т-клеток с требуемыми последовательностями (фиг. 3a).

[0148] Можно разработать и составить синтетический репертуар Т-клеток из ранее известных последовательностей TCR либо из природных репертуаров, встречающихся в представляющих интерес эндогенных популяциях Т-клеток (фиг. 3b). Некоторые примеры включают TCR, экспрессируемые инфильтрирующими опухолю лимфоцитами (для вставки в новую популяцию эффекторных Т-клеток CD8⁺ или CD4⁺), TCR, экспрессируемые аутореактивными Т-клетками в очагах аутоиммунных заболеваний (для вставки в популяцию регуляторных Т-клеток) или TCR из реагирующих на патогены Т-

клеток (для вставки в эффекторные Т-клетки CD8⁺ или CD4⁺).

Безвирусная замена эндогенного Т-клеточного рецептора с помощью единой HDR-матрицы

[0149] Геномный локус Т-клеточного рецептора чрезвычайно сложен, с большим разнообразием вариабельных аллелей (называемых аллелями V и J для α-цепи TCR и аллелями V, D и J для β-цепи TCR), которые подвергаются соматической перестройке генов при развитии Т-клеток для получения функционального Т-клеточного рецептора. Важные для разнообразия репертуара TCR, но проблемные для направленного редактирования генома в локусе TCR (будь то нокаут или нокин), эти рекомбинированные последовательности различны по всей поликлональной популяции Т-клеток. Для целевого применения как у α-цепей TCR, так и у β-цепей TCR имеется константный домен на С-конце белка, который является общим для всех Т-клеток, независимо от того, какие сегменты V-J или V-D-J подвергались перегруппировке. Локус *TCR-β* имеет две константные области (TRBC1 и TRBC2), на которые можно воздействовать, как показано на фиг. 1b. Эта константная последовательность (константные экзоны, помеченные как экзон 1, экзон 2 TRAC или TRBC и т.д.) позволяет использовать единый набор реагентов для геномного наведения (система CRISPR/Cas9 в данной заявке, т.е. единая последовательность гидРНК) для модификации каждой Т-клетки, независимо от того, какой перестроенный TCR они экспрессируют.

[0150] Используя изложенные выше методы, получали ДНК-матрицу, кодирующую гетерологичный TCR, который специфически связывается с опухолевым антигеном, и использовали её для замены эндогенного TCR в Т-клетках человека. Матрица для гомологичной репарации (либо дцДНК, полученная методом ПЦР, либо оцДНК, полученная различными описанными здесь способами), используемая для замены эндогенного TCR, имеет длину ~2,1 т.н., включая 5'- и 3'-гомологические плечи (~300 п.н.), которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт разрезания гидРНК (фиг. 1a). Между этими гомологическими плечами находится последовательность в ~1,5 т.н., которая была вставлена в сайт разрезания гидРНК посредством гомологичной репарации. Эта вставленная последовательность начинается с мультицистронного элемента (самовырезающегося пептида T2A), за которым следует полноразмерная последовательность β-цепи требуемого антиген-специфичного Т-клеточного рецептора (в данном примере TCR, специфичного к неоантигену меланомы NY-ESO-1). Второй мультицистронный элемент (самовырезающегося пептида P2A) следует за β-цепью TCR и отделяет её от вариабельной последовательности (рекомбинированные аллели V и J) α-цепи требуемого антиген-специфичного TCR.

Вставляли только переменную область α -цепи TCR и последовательность экзона 1 TRAC вплоть до (5'-конца) сайта разрезания гидРНК, так как остальные экзоны TRAC были сплайсированы вместе в конечную последовательность мРНК. ДНК-матрицу вводили в Т-клетки в составе комплекса РНП:ДНК матрицы, как описано выше.

[0151] Транскрипция в клетках с успешной HDR давала полицистронную мРНК, кодирующую β - и α -цепи TCR. Эта стратегия нацеливания позволяла получить три пептидные цепи: (1) остаточный пептид эндогенной переменной области, который не имеет трансмембранного пролета (и поэтому не должен экспрессироваться на клеточной поверхности) и деградирует в эндоплазматическом ретикулуме или секретируется после транскрипции; (2) полноразмерную β -цепь требуемого антиген-специфичного TCR; и (3) полноразмерную α -цепь требуемого антиген-специфичного TCR. В результате получали Т-клетки, которые экспрессировали обе цепи требуемого антиген-специфичного TCR под контролем эндогенного промотора TCR. Обе цепи экспрессировались Т-клетками с образованием гетерологичного TCR, который специфически распознает неоантиген меланомы NY-ESO-1.

[0152] Как видно из фиг. 4а, через 4 дня после электропорации описанной выше конструкции Т-клетки CD4⁺ и CD8⁺ от двух здоровых доноров крови окрашивались флуоресцентно меченным МНС-декстрамером, содержащим пептид, распознаваемый встроенным специфичным к NY-ESO-1 TCR (NYESO). На фиг. 4б представлен второй эксперимент, дающий аналогичные результаты на других здоровых донорах, свидетельствуя тем самым о надежности и воспроизводимости безвирусной замены эндогенного TCR.

[0153] Замена TCR также осуществлялась в локусе *TCR- β* по такой же стратегии, что и в локусе *TCR- α* , хотя locus β более сложен, так как существуют две константные области (*TRBC1* и *TRBC2*), которые сильно гомологичны друг другу. HDR-матрица вставляла новую полноразмерную TCR- α и области VDJ новой TCR- β на 5'-конце первого экзона *TRBC1* при использовании гидРНК, нацеленной на последовательность, встречающуюся и в *TRBC1*, и в *TRBC2*. Вследствие сходства последовательностей между геномными областями *TRBC1* и *TRBC2*, 3'-гомологическое плечо этой конструкции было также почти полностью гомологично эквивалентной области в *TRBC2*, тогда как 5'-гомологическое плечо было на ~85% гомологично геномному участку *TRBC2* в 150 п.н., ближайшему к месту вставки. При этом, вероятно, преобладает вставка в *TRBC1*, но она возможна и в *TRBC2* или с промежуточной делецией между *TRBC1* и *TRBC2*. Также вместо гидРНК, нацеленной на обе, можно использовать гидРНК, которые специфически делают разрезы в *TRBC1* или *TRBC2*.

[0154] На фиг. 9а представлен анализ ошибочных пар цепей TCR после ретровирусной доставки специфичного к NYESO-1 TCR или безвирусной замены TCR при гейтировании Т-клеток CD4⁺ или CD8⁺. Безвирусная замена TCR приводит к меньшему неправильному спариванию TCR по сравнению с ретровирусной доставкой TCR. Мультиплексная замена TCR со вставкой нового VJ-домена TCR- α в *TRAC* и нового VDJ-домена TRB- β в *TRBC1* также возможна и могла бы представлять стратегию для дальнейшего снижения ошибочных пар цепей TCR (фиг. 9b-c).

Замена TCR с окрашиванием на декстрамер и TCR

[0155] Т-клетки CD4⁺ и CD8⁺ от двух здоровых доноров крови подвергали электропорации единой конструкцией, как описано выше. Через 4 дня после электропорации проводили окрашивание на экспрессию TCR (с помощью антитела, связывающего все возможные TCR человека) и антиген-специфичное окрашивание с помощью МНС-декстрамера NYESO. У большинства Т-клеток, где не было замены эндогенного TCR по гомологии (фиг. 5), эндогенный TCR подвергается нокауту вследствие разрезания гидРНК экзона 1 *TRAC* и введения небольших инделей путем негомологичного соединения концов. Как и ожидалось, почти все положительные по NYESO клетки также были положительны по экспрессии TCR.

Уничтожение раковых клеток in vitro первичными Т-клетками человека с внедренным TCR

[0156] Анализ уничтожения раковых клеток in vitro продемонстрировал функциональную способность к уничтожению клеток мишени у клеток с внедренным (нокин) TCR. Как описано выше, вставляли последовательность TCR 1G4 (NYSEO-специфичную) в эндогенный локус TCR- α в первичных Т-клетках CD3⁺ от здоровых доноров. Через 7 дней после электропорации клетки окрашивали с помощью МНС-декстрамера с флуоресцентным пептидом NYESO и отсортировывали клетки NYESO⁺ путем флуоресцентно-активируемой сортировки клеток для получения чистой популяции. Далее эту популяцию культивировали при стандартных условиях культивирования Т-клеток (среда и IL-2) еще в течение 5 дней. Через 12 дней после электропорации отсортированные Т-клетки с заменой своего эндогенного TCR на TCR 1G4 культивировали совместно с линией раковых клеток, презентующих антиген NYESO на своем МНС (клетки A375, полученные из меланомы и эндогенно экспрессирующие антиген NYESO, а также МНС-A2 – аллель МНС, распознаваемый TCR 1G4). Через каждые 12 часов подсчитывали количество раковых клеток по количественной флуоресцентной визуализации (клетки A375 экспрессируют красный флуоресцентный белок, что позволяет подсчитывать их специфически отдельно от Т-клеток). Подсчет по

флуоресценции автоматизировали с помощью автоматического флуоресцентного микроскопа Incucyte. В культуры высевали по 3000 раковых клеток при указанном соотношении Т-клеток 1G4⁺ (см. фиг. 4а). У отредактированных Т-клеток от двух здоровых доноров наблюдалось сильное зависимое от дозы и от времени уничтожение раковых клеток мишени, что указывает на функциональность Т-клеток с внедренным TCR 1G4. Степень гибели раковых клеток определяли путем деления числа живых раковых клеток в данной лунке на количество живых раковых клеток в контрольных лунках, не содержащих Т-клеток. При высоких соотношениях (~10:1) Т-клеток к раковым клеткам отмечалась быстрая (<24 часов) гибель почти всех раковых клеток, но даже при очень низких соотношениях (~0,1:1) Т-клеток к раковым клеткам проявлялась сильная гибель при дополнительном времени культивирования (см. фиг. 6а).

[0157] Продемонстрировано уничтожение раковых клеток *in vitro* Т-клетками с внедренным (нокин) TCR 1G4 в одной временной точке (см. фиг. 6b). Брали сводные данные из одной временной точки в описанных выше анализах гибели клеток (через 36 часов после совместной инкубации). Отсортировывали Т-клетки NYESO-декстрамер⁺ (1G4⁺), как описано выше, получая 100% 1G4-положительную популяцию, которую затем разбавляли Т-клетками NYESO-декстрамер⁻ (1G4⁻) от того же донора, получая указанный процент Т-клеток с окрашиванием NYESO⁺ (10%, 1% или 0%). Затем каждую из этих популяций культивировали вместе с раковыми клетками при анализе уничтожения раковых клеток *in vitro*, как описано выше, при соотношении 8 Т-клеток на 1 раковую клетку (получая соотношения Т-клетки 1G4⁺:раковые клетки = 8:1, 0,8:1, 0,08:1 и 0:1 для популяций со 100%, 10%, 1% и 0% Т-клеток NYESO⁺, соответственно). В качестве положительного контроля на уничтожение раковых клеток брали клетки от еще одного здорового донора и трансдуцировали их лентивирусом, который случайным образом встраивает экспрессирующую TCR 1G4 кассету в геном Т-клеток (отметим, что в этом случае TCR встраивается и экспрессируется случайным образом, в отличие от Т-клеток с внедренным TCR 1G4, где TCR 1G4 заменяет эндогенный локус TCR, так что он экспрессируется вне эндогенного промотора TCR и одновременно вызывает нокаут эндогенного TCR). Трансдуцированные лентивирусом Т-клетки от этого дополнительного донора точно так же отсортировывали для получения 100% популяции 1G4⁺ и точно так же культивировали вместе с целевой линией раковых клеток A375 при соотношении 8 Т-клеток на 1 раковую клетку.

Модель солидных опухолей у мышей *in vivo*

[0158] Все эксперименты на мышях выполнялись в соответствии с протоколом ведомственного Комитета по уходу и использованию животных UCSF. Для всех

экспериментов использовали 8–12-недельных самцов мышей NOD/SCID/IL-2R γ -null (NSG) (Jackson Laboratory). Мышам прививали опухоли путем подкожной инъекции в выбритый правый бок 1×10^6 клеток меланомы A375 человека (ATCC CRL-1619). Через 7 дней после прививания оценивали размер опухолей и мышей с объемом опухолей в 15–30 мм³ случайным образом распределяли в группы экспериментальной и контрольной обработки. Указанные количества Т-клеток ресуспендировали в 100 мкл бессывороточной среды RPMI и вводили ретроорбитально. Для экспериментов по определению размера опухолей измеряли длину и ширину опухолей электронным штангенциркулем и рассчитывали объем как $v = 1/6 \times \pi \times \text{длина} \times \text{ширина} \times (\text{длина} + \text{ширина})/2$. При измерении размеров исследователям не были известны группы экспериментальной обработки. Проводили перенос общей популяции отредактированных Т-клеток (5×10^6) или отсортированной популяции NY-ESO-1 TCR⁺ (3×10^6), как указано на фигурах и в подписях к ним. При переносе общей популяции отредактированных Т-клеток, поскольку редактированные лентивирусом клетки обычно содержали больше NY-ESO-1-положительных клеток, то добавляли ложно-инфицированные клетки, чтобы довести общее содержание Т-клеток NY-ESO-1⁺ до их уровня в общей популяции редактированных безвирусно Т-клеток (~10% NY-ESO-1⁺). При переносе отсортированных Т-клеток проводили сортировку Т-клеток NY-ESO-1⁺ методом FACS через 8 дней после электропорации, размножали в течение еще двух дней и замораживали (замораживающая среда Vambanker, Bulldog Bio). Затем модифицированные безвирусно или лентивирусом Т-клетки человека оттаивали и оставляли в среде на ночь перед адоптивным переносом. Для анализа Т-клеток после адоптивного переноса методом проточной цитометрии получали суспензии одиночных клеток из опухолей и селезенки путем механической диссоциации ткани через фильтр на 70 мкм. Все эксперименты на животных проводились с соблюдением соответствующих этических норм согласно утвержденному IACUC протоколу (UCSF), включая ограничение размера опухолей до 2,0 см в любом измерении.

Функциональность Т-клеток *in vivo* с безвирусной заменой TCR

[0159] Для оценки функциональности Т-клеток *in vivo* с безвирусной заменой TCR использовали модель ксенотрансплантатов антиген-специфичных опухолей человека (фиг. 7а). 8–12-недельным мышам NSG вводили подкожно в выбритый бок 1×10^6 клеток A375 (линия клеток меланомы человека; антиген NY-ESO-1⁺ и HLA-A*0201⁺). Получали первичные Т-клетки человека, отредактированные для экспрессии TCR, специфичного к антигену NY-ESO-1 (посредством лентивирусной трансдукции либо безвирусной замены TCR), размножали в течение 10 дней после трансдукции или электропорации и

замораживали. Использовали либо общую отредактированную популяцию (фиг. 7b-c), либо отсортированную популяцию NY-ESO-1 TCR⁺ (фиг. 7d-f). Через 7 дней после прививания опухолей оттаивали Т-клетки и проводили адоптивный перенос посредством ретроорбитальной инъекции. Как видно из фиг. 7b, через два дня после переноса 5×10^6 общих Т-клеток с безвирусной заменой (~10% TCR⁺ NYESO-1⁺ (красные), ~10% TCR⁺ NYESO-1⁻ (оранжевые) и ~80% TCR⁻ NYESO-1⁻ (зеленые), см. фиг. 7b)), Т-клетки NYESO-1⁺ с безвирусным редактированием преимущественно накапливались в опухолях по сравнению с селезенкой (n = 5 мышей для каждого из 4 доноров Т-клеток человека). Через 10 дней после переноса 5×10^6 общих Т-клеток с безвирусной заменой, помеченных CFSE, клетки TCR⁺ NYESO-1 проявляли большую пролиферацию, чем Т-клетки TCR⁻ или TCR⁺ NYESO-1⁻, и большую пролиферацию (низкий CFSE) в опухолях, чем в селезенке (фиг. 7c). Через 10 дней после переноса в опухолях с трудом выявлялись Т-клетки TCR⁻ и TCR⁺ NYESO⁻ (фиг. 7c). На фиг. 7d представлены индивидуальные графики изменения объема опухолей для данных, приведенных на фиг. 8f. Проводили перенос 3×10^6 сортированных Т-клеток NY-ESO-1 TCR⁺, полученных при лентивирусной трансдукции или безвирусной замене TCR, на 7-й день после прививания опухолей и сравнивали с введением одного лишь носителя вплоть до 24 дней после прививки опухолей. Отметим, что для каждого донора представлены одни и те же данные для контроля на носитель при сравнении с лентивирусной доставкой (вверху) и безвирусной заменой TCR (внизу). В этих экспериментах (фиг. 7e-f) через 17 дней после переноса Т-клеток клетки с безвирусной заменой TCR проявляли большую экспрессию TCR NYESO-1 и меньшую экспрессию маркеров истощения. При переносе как трансдуцированных лентивирусом, так и клеток с безвирусной заменой TCR проявлялось значительное снижение опухолевой нагрузки на 24-й день. На этой экспериментальной модели при безвирусной замене TCR проявлялось дальнейшее снижение по сравнению с лентивирусной трансдукцией (фиг. 8f). n = 4 (фиг. 7b), n = 2 (фиг. 7d-f) или n = 1 (фиг. 7c) независимых здоровых донора по 5 (фиг. 7b, 7c) или 7 мышей (фиг. 7d-f) на донора со средним значением (фиг. 7b, 7e, 7f) и стандартным отклонением (фиг. 7b).

Специфичные для опухолевого антигена функции

[0160] Также оценивали специфичные для опухолевого антигена функции направленных Т-клеток человека. При совместном культивировании направленных Т-клеток с клетками NY-ESO-1⁺ двух разных линий меланомы, M257 и M407, модифицированные Т-клетки сильно и специфически вырабатывали IFN- γ и TNF- α и индуцировали дегрануляцию Т-клеток (измеряли по поверхностной экспрессии CD107a) (фиг. 8a). Продукция цитокинов и дегрануляция происходила только тогда, когда Т-клетки

NY-ESO-1 TCR экспонировали с клетками линий, экспрессирующих соответствующий аллель HLA-A*0201 МНС класса I, необходимый для презентации когнатного пептида NY-ESO-1. Реакция Т-клеток CD8⁺ и CD4⁺ была последовательной у всех здоровых доноров и была сравнима с реакцией Т-клеток от тех же здоровых доноров, в которых TCR NY-ESO-1 был трансдуцирован при помощи ретровируса и экспрессировался гетерологически с помощью вирусного промотора (фиг. 8a и фиг. 9d). Т-клетки с внедренным TCR NY-ESO-1 быстро уничтожали целевые раковые клетки M257-HLA-A*0201 *in vitro* со скоростью, близкой к положительному контролю – Т-клеткам с ретровирусной трансдукцией (фиг. 8b). Уничтожение было специфичным для клеток мишени, экспрессирующих антиген NY-ESO-1 и аллель HLA-A*0201, последовательным у всех доноров и зависело от Т-клеток, модифицированных с использованием правильной гидРНК и HDR-матрицы (фиг. 9h-k).

[0161] Наконец, проверяли, что безвирусное воздействие на геном может применяться для получения клеток TCR NY-ESO-1 в масштабе и что эти клетки обладают противоопухолевым действием *in vivo* (фиг. 8c и фиг. 7a). Учитывая, что эффективность внедрения была ниже при безвирусном нацеливании, чем при сравнимых по размеру AAV-матрицах, обеспечивали достаточное количество NY-ESO-1-положительных клеток для адоптивной клеточной терапии. 100 миллионов Т-клеток от 6 здоровых доноров после 10 дней экспансии давали в среднем 385 миллионов Т-клеток NY-ESO-1 TCR на донора (фиг. 8d). Т-клетки с внедренным TCR NY-ESO-1 преимущественно локализовались, сохранялись и пролиферировали в опухолях, а не в селезенке, подобно Т-клеткам положительного контроля с лентивирусной трансдукцией (фиг. 8e и фиг. 7b-f). Адоптивный перенос отсортированных Т-клеток NY-ESO-1 TCR также снижал опухолевую нагрузку у обработанных животных (фиг. 8f).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ редактирования генома Т-клеток человека, который включает вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области субъединицы Т-клеточного рецептора (TCR) в Т-клетке человека

последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу:

- (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида;
- (ii) первую гетерологичную цепь субъединицы TCR, причем эта цепь субъединицы TCR содержит переменную область и константную область субъединицы TCR;
- (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида;
- (iv) переменную область второй гетерологичной цепи субъединицы TCR; и
- (v) N-концевую часть эндогенной субъединицы TCR,

причем, если эндогенной субъединицей TCR является альфа-субъединица TCR (TCR- α), то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь бета-субъединицы TCR (TCR- β), а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR, а если эндогенной субъединицей TCR является β -субъединица TCR, то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR, а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь β -субъединицы TCR.

2. Способ по п. 1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирует, от N-конца к С-концу:

- (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида;
- (ii) гетерологичную β -цепь TCR;
- (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида;
- (iv) переменную область гетерологичной α -цепи TCR; и
- (v) N-концевую часть эндогенной α -субъединицы TCR,

вставляется в экзон 1 гена константной области альфа-субъединицы TCR (TRAC) в Т-клетках человека.

3. Способ по п. 1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу:

- (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида;
- (ii) гетерологичную α -цепь TCR;
- (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида;
- (iv) переменную область гетерологичной β -цепи TCR; и
- (v) N-концевую часть эндогенной β -субъединицы TCR,

вставляется в экзон 1 гена константной области бета-субъединицы TCR (TRBC) в Т-клетках человека.

4. Способ по любому из пп. 1-3, при этом последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность двухцепочечной или одноцепочечной нуклеиновой кислоты, причем последовательность нуклеиновой кислоты вставляется путем введения этой последовательности нуклеиновой кислоты в Т-клетки.

5. Способ по любому из пп. 1-4, при этом нуклеиновая кислота вставляется путем введения в Т-клетки вирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту.

6. Способ по любому из пп. 1, 2, 4 или 5, при этом нуклеиновая кислота вставляется в Т-клетки путем введения в них:

(a) направленной нуклеазы, расщепляющей целевой участок в экзоне 1 гена TRAC, создавая сайт вставки в геноме Т-клетки; и

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, причем последовательность нуклеиновой кислоты вставляется в сайт вставки путем гомологичной репарации (HDR).

7. Способ по любому из пп. 1, 3, 4 или 5, при этом нуклеиновая кислота вставляется в Т-клетки путем введения в них:

(a) направленной нуклеазы, расщепляющей целевой участок в экзоне 1 гена TRBC, создавая сайт вставки в геноме Т-клетки; и

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, причем последовательность нуклеиновой кислоты вставляется в сайт вставки путем гомологичной репарации (HDR).

8. Способ по любому из пп. 1-7, при этом 5'-конец и 3'-конец последовательности нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим целевой участок.

9. Способ по п. 8, при этом 5'-конец и 3'-конец последовательности нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки.

10. Способ по любому из пп. 6-9, при этом направленная нуклеаза вводит двухцепочечный разрыв на сайте вставки.

11. Способ по любому из пп. 1-10, при этом последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК-матрицу.

12. Способ по любому из пп. 1-11, при этом последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой линейную ДНК-матрицу.

13. Способ по любому из пп. 1-12, при этом первый саморасщепляющийся пептид и второй саморасщепляющийся пептид представляют собой одинаковые или разные вирусные 2А-пептиды.

14. Способ по любому из пп. 6-13, при этом направленная нуклеаза выбрана из группы, состоящей из РНК-направляемого нуклеазного домена, эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), нуклеаз типа цинкового пальца (ZFN) и мега-TAL.

15. Способ по п. 14, при этом РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9, а способ дополнительно включает введение в клетки направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 TRAC.

16. Способ по п. 14, при этом РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9, а способ дополнительно включает введение в клетки направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 TRBC.

17. Способ по п. 15 или 16, при этом нуклеаза Cpf1 или нуклеаза Cas9, направляющая РНК и нуклеиновая кислота вводятся в клетки в виде комплекса рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) с ДНК-матрицей, причем комплекс РНП-ДНК матрицы содержит:

(i) РНП, причем РНП содержит нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9 и направляющую РНК; и

(ii) ДНК-матрицу.

18. Способ по п. 17, при этом молярное соотношение РНП и ДНК матрицы в комплексе составляет от 3:1 до 100:1.

19. Способ по п. 17 или 18, при этом комплекс РНП-ДНК матрицы образуется при инкубации РНП с ДНК-матрицей в течение от 10 до 30 минут при температуре от 20° до 25°С.

20. Способ по любому из пп. 17-19, при этом комплекс РНП-ДНК матрицы смешивают с клетками перед введением комплекса РНП-ДНК матрицы в клетки.

21. Способ по любому из пп. 17-20, при этом комплекс РНП-ДНК матрицы содержит по меньшей мере два структурно различных комплекса РНП.

22. Способ по п. 21, при этом эти по меньшей мере два структурно различных комплекса РНП содержат структурно разные Направляющие РНК.

23. Способ по п. 21, при этом каждый из структурно различных комплексов РНП содержит нуклеазу Cas9, причем структурно разные направляющие РНК гибридизуются с противоположными нитями целевого участка.

24. Способ по любому из пп. 4-23, при этом введение включает электропорацию.

25. Способ по любому из пп. 4-24, при этом нуклеиновая кислота или комплекс

РНП-ДНК матрицы вводится в популяцию от 1×10^5 до 2×10^6 Т-клеток.

26. Способ по п. 25, при этом в клетки вводятся по меньшей мере две структурно разные ДНК-матрицы.

27. Способ по п. 26, при этом каждая из по меньшей мере двух структурно разных ДНК-матриц кодирует уникальную комбинацию вариабельной области гетерологичной β -цепи TCR специфичного к антигену Т-клеточного рецептора и вариабельной области гетерологичной α -цепи TCR специфичного к антигену Т-клеточного рецептора.

28. Способ по любому из пп. 1-27, при этом Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки.

29. Способ по п. 28, при этом Т-клетки представляют собой эффекторные Т-клетки, причем эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD8^+$ или Т-клетки $CD4^+$.

30. Способ по п. 29, при этом эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD4^+CD8^+$.

31. Способ по любому из пп. 1-30, дополнительно включающий культивирование Т-клеток в условиях, способствующих экспрессии гетерологичной β -цепи TCR и гетерологичной α -цепи TCR с образованием антиген-специфичного Т-клеточного рецептора.

32. Способ по п. 31, дополнительно включающий культивирование модифицированных Т-клеток в условиях, эффективных для экспансии популяции модифицированных клеток.

33. Способ по п. 31 или 32, дополнительно включающий очистку Т-клеток, экспрессирующих антиген-специфичный Т-клеточный рецептор.

34. Модифицированная Т-клетка, полученная любым из способов по пп. 1-33.

35. Модифицированная Т-клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу:

- (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида;
- (ii) первую гетерологичную цепь субъединицы TCR;
- (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида;
- (iv) вариабельную область второй гетерологичной цепи субъединицы TCR; и
- (v) N-концевую часть эндогенной субъединицы TCR,

причем, если эндогенной субъединицей TCR является альфа-субъединица TCR (TCR- α), то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь бета-субъединицы TCR (TCR- β), а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR, а если

эндогенной субъединицей TCR является β -субъединица TCR, то первая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь α -субъединицы TCR, а вторая гетерологичная цепь субъединицы TCR представляет собой гетерологичную цепь β -субъединицы TCR.

36. Модифицированная Т-клетка по п. 35, при этом последовательность нуклеиновой кислоты кодирует, от N-конца к С-концу:

- (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида;
- (ii) гетерологичную β -цепь Т-клеточного рецептора (TCR);
- (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида;
- (iv) вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR; и
- (v) N-концевую часть эндогенной альфа-субъединицы TCR,

причем последовательность нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRAC.

37. Модифицированная Т-клетка по п. 35, при этом последовательность нуклеиновой кислоты кодирует, от N-конца к С-концу:

- (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида;
- (ii) гетерологичную α -цепь Т-клеточного рецептора (TCR);
- (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида;
- (iv) вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR; и
- (v) N-концевую часть эндогенной бета-субъединицы TCR,

причем последовательность нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRBC1 или TRBC2.

38. Модифицированная Т-клетка по п. 35, при этом последовательность нуклеиновой кислоты кодирует, от N-конца к С-концу:

- (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида;
- (ii) гетерологичную α -цепь Т-клеточного рецептора (TCR);
- (iii) последовательность второго саморасщепляющегося пептида;
- (iv) вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR; и
- (v) N-концевую часть эндогенной бета-субъединицы TCR,

причем последовательность нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRBC.

39. Способ редактирования генома Т-клеток, который включает:

а) вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области альфа-субъединицы TCR (TRAC) в Т-клетках человека последовательности первой нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к С-концу:

- (i) последовательность первого саморасщепляющегося пептида;
- (ii) гетерологичную α -цепь TCR антиген-специфичного Т-клеточного рецептора; и

(iii) N-концевую часть экзона 1 эндогенной альфа-субъединицы TCR; и

b) вставку в целевой участок экзона 1 гена константной области бета-субъединицы TCR (TRBC) в Т-клетках человека последовательности второй нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу:

(i) последовательность второго саморасщепляющегося пептида;

(ii) гетерологичную β -цепь TCR антиген-специфичного Т-клеточного рецептора; и

(iii) N-концевую часть экзона 1 эндогенной бета-субъединицы TCR.

40. Способ по п. 39, при этом последовательность первой и/или второй нуклеиновой кислоты представляет собой двухцепочечную или одноцепочечную нуклеиновую кислоту, причем первая и/или вторая нуклеиновая кислота вставляется путем введения в Т-клетки первой и/или второй нуклеиновой кислоты.

41. Способ по п. 40, при этом последовательность первой и/или второй нуклеиновой кислоты вставляется путем введения в Т-клетки вирусного вектора, содержащего первую и/или вторую нуклеиновую кислоту.

42. Способ по п. 40 или 41, при этом первая и вторая нуклеиновая кислота вставляются в Т-клетки путем введения в них:

(a) одной или нескольких направленных нуклеаз, создающих первый сайт вставки в экзоне 1 гена TRAC и второй сайт вставки в экзоне 1 гена TRBC;

(b) последовательности первой нуклеиновой кислоты и

(c) последовательности второй нуклеиновой кислоты.

43. Способ по любому из пп. 39-42, при этом 5'- и 3'-концы первой последовательности нуклеиновой кислоты содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим первый целевой участок в экзоне 1 TRAC.

44. Способ по п. 43, при этом 5'- и 3'-концы второй ДНК-матрицы содержат последовательности нуклеотидов, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим второй целевой участок в экзоне 1 TRBC.

45. Способ по любому из пп. 42-44, при этом одна или несколько направленных нуклеаз вводят двухцепочечные разрывы в первом и втором сайтах вставки.

46. Способ по любому из пп. 39-45, при этом последовательность первой и/или второй нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК-матрицу.

47. Способ по любому из пп. 39-46, при этом первая и/или вторая нуклеиновая кислота представляет собой линейную ДНК-матрицу.

48. Способ по любому из пп. 39-47, при этом первый саморасщепляющийся пептид и второй саморасщепляющийся пептид представляют собой одинаковые или разные

вирусные 2А-пептиды.

49. Способ по любому из пп. 42-48, при этом одна или несколько направленных нуклеаз выбраны из группы, состоящей из РНК-направляемого нуклеазного домена, эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), нуклеаз типа цинкового пальца (ZFN) и мега-TAL.

50. Способ по п. 49, при этом РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9, а способ дополнительно включает введение в клетки первой направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 TRAC, и второй направляющей РНК, которая специфически гибридизуется с целевым участком в экзоне 1 TRBC.

51. Способ по п. 50, при этом нуклеаза Cpf1 или нуклеаза Cas9, первая направляющая РНК и последовательность нуклеиновой кислоты вводятся в клетки в виде комплекса рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) с ДНК-матрицей, причем комплекс РНП-ДНК матрицы содержит:

(i) РНП, причем РНП содержит нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9 и первую направляющую РНК; и

(ii) первую ДНК-матрицу.

52. Способ по п. 50, при этом нуклеаза Cpf1 или нуклеаза Cas9, вторая направляющая РНК и вторая последовательность нуклеиновой кислоты вводятся в клетки в виде комплекса РНП с ДНК-матрицей, причем комплекс РНП-ДНК матрицы содержит:

(i) РНП, причем РНП содержит нуклеазу Cpf1 или нуклеазу Cas9 и вторую направляющую РНК; и

(ii) вторую ДНК-матрицу.

53. Способ по п. 51 или 52, при этом молярное соотношение РНП и ДНК матрицы в комплексе составляет от 3:1 до 100:1.

54. Способ по любому из пп. 51-53, при этом комплекс РНП-ДНК матрицы образуется при инкубации РНП с ДНК-матрицей в течение от 10 до 30 минут при температуре от 20° до 25°С.

55. Способ по любому из пп. 51-54, при этом комплекс РНП-ДНК матрицы содержит по меньшей мере два структурно различных комплекса РНП.

56. Способ по п. 55, при этом каждый из структурно различных комплексов РНП содержит нуклеазу Cas9, причем структурно разные направляющие РНК гибридизуются с противоположными нитями целевого участка.

57. Способ по любому из пп. 39-56, при этом введение включает электропорацию.

58. Способ по любому из пп. 39-57, при этом последовательности нуклеиновой

кислоты или комплексы РНП-ДНК матрицы вводятся в популяцию от 1×10^5 до 2×10^6 Т-клеток.

59. Способ по п. 58, при этом в клетки вводятся по меньшей мере две структурно различные первые ДНК-матрицы.

60. Способ по п. 59, при этом по меньшей мере две структурно различные первые ДНК-матрицы содержат разные переменные области α -цепи TCR антиген-специфического Т-клеточного рецептора.

61. Способ по п. 60, при этом в клетки вводятся по меньшей мере две структурно различные вторые ДНК-матрицы.

62. Способ по п. 61, при этом по меньшей мере две структурно различные вторые ДНК-матрицы содержат разные переменные области β -цепи TCR антиген-специфического Т-клеточного рецептора.

63. Способ по любому из пп. 39-62, при этом Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки.

64. Способ по п. 63, при этом Т-клетки представляют собой эффекторные Т-клетки, причем эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD8^+$ или Т-клетки $CD4^+$.

65. Способ по п. 64, при этом эффекторные Т-клетки представляют собой Т-клетки $CD4^+CD8^+$.

66. Способ по любому из пп. 39-65, дополнительно включающий культивирование Т-клеток в условиях, способствующих экспрессии гетерологичной β -цепи TCR и гетерологичной α -цепи TCR с образованием антиген-специфического Т-клеточного рецептора.

67. Способ по п. 66, дополнительно включающий культивирование Т-клеток в условиях, способствующих экспрессии гетерологичной β -цепи TCR и гетерологичной α -цепи TCR с образованием антиген-специфического Т-клеточного рецептора.

68. Способ по п. 67, дополнительно включающий культивирование модифицированных Т-клеток в условиях, эффективных для расширения популяции модифицированных клеток.

69. Способ по п. 67 или 68, дополнительно включающий очистку Т-клеток, экспрессирующих антиген-специфический Т-клеточный рецептор.

70. Модифицированная Т-клетка, полученная любым из способов по пп. 39-69.

71. Модифицированная Т-клетка, содержащая:

а) последовательность первой нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к C-концу:

- (i) первую саморасщепляющуюся последовательность;
 - (ii) вариабельную область гетерологичной α -цепи TCR; и
 - (iii) N-концевую часть эндогенной α -цепи TCR; и
- b) последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующей, от N-конца к

C-концу:

- (i) первую саморасщепляющуюся последовательность;
- (ii) вариабельную область гетерологичной β -цепи TCR; и
- (iii) N-концевую часть эндогенной β -цепи TCR,

причем последовательность первой нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRAC, а последовательность второй нуклеиновой кислоты встроена в экзон 1 гена TRBC.

72. Способ лечения рака у человека, включающий:

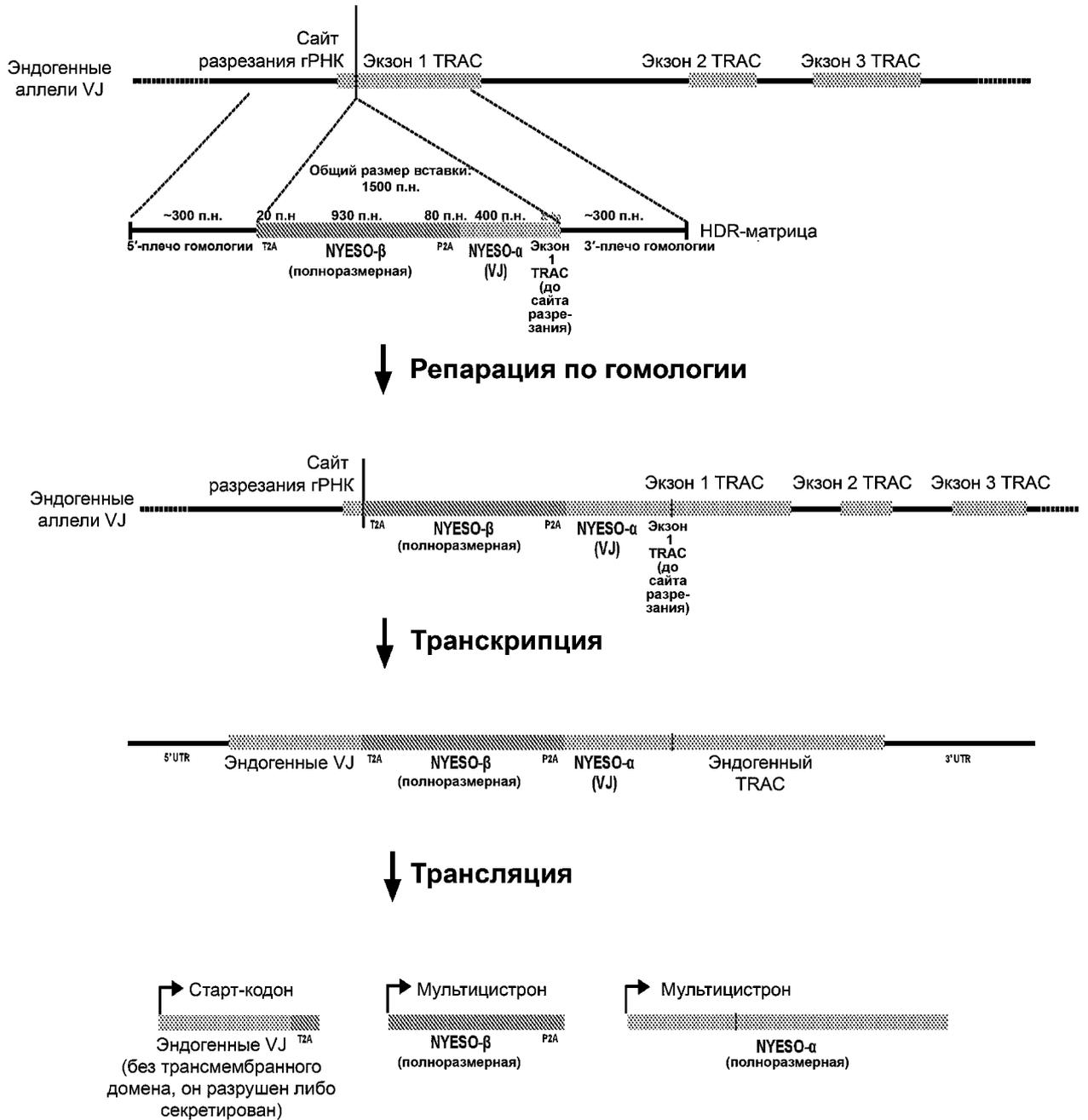
a) модифицирование T-клеток субъекта любым из способов по пп. 1-33 или 39-69 для экспрессии антиген-специфичного T-клеточного рецептора, причем T-клеточный рецептор распознает опухолеспецифичный антиген у субъекта.

73. Способ по п. 72, при этом T-клетки субъекта модифицируют *in vivo*.

74. Способ по п. 72, который включает:

- a) получение T-клеток от субъекта;
- b) модифицирование T-клеток любым из способов по пп. 1-33 или 39-69 для экспрессии антиген-специфичного T-клеточного рецептора, причем T-клеточный рецептор распознает опухолеспецифичный антиген у субъекта; и
- c) введение модифицированных T-клеток субъекту.

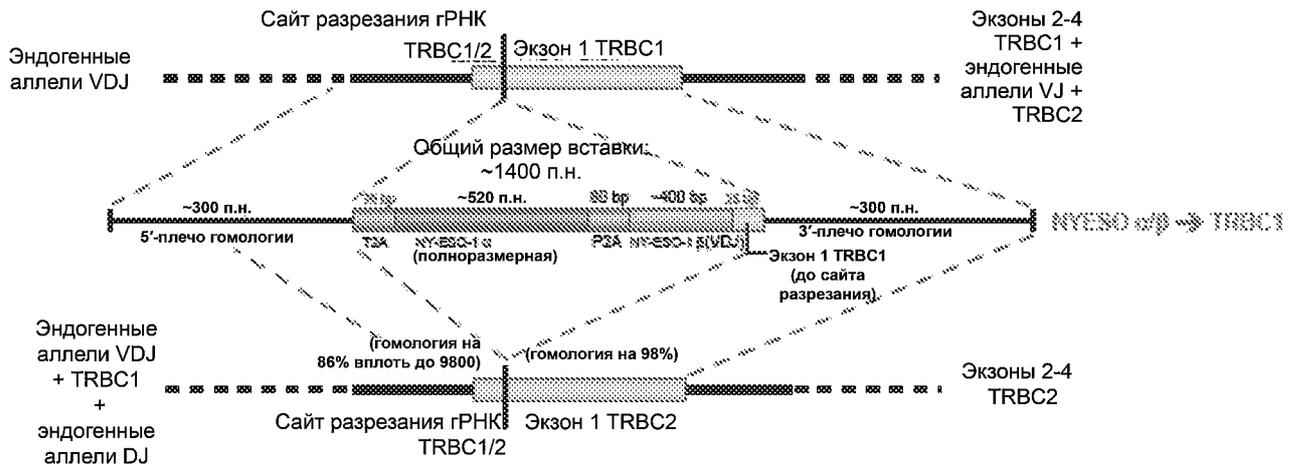
Геномный локус TRAC



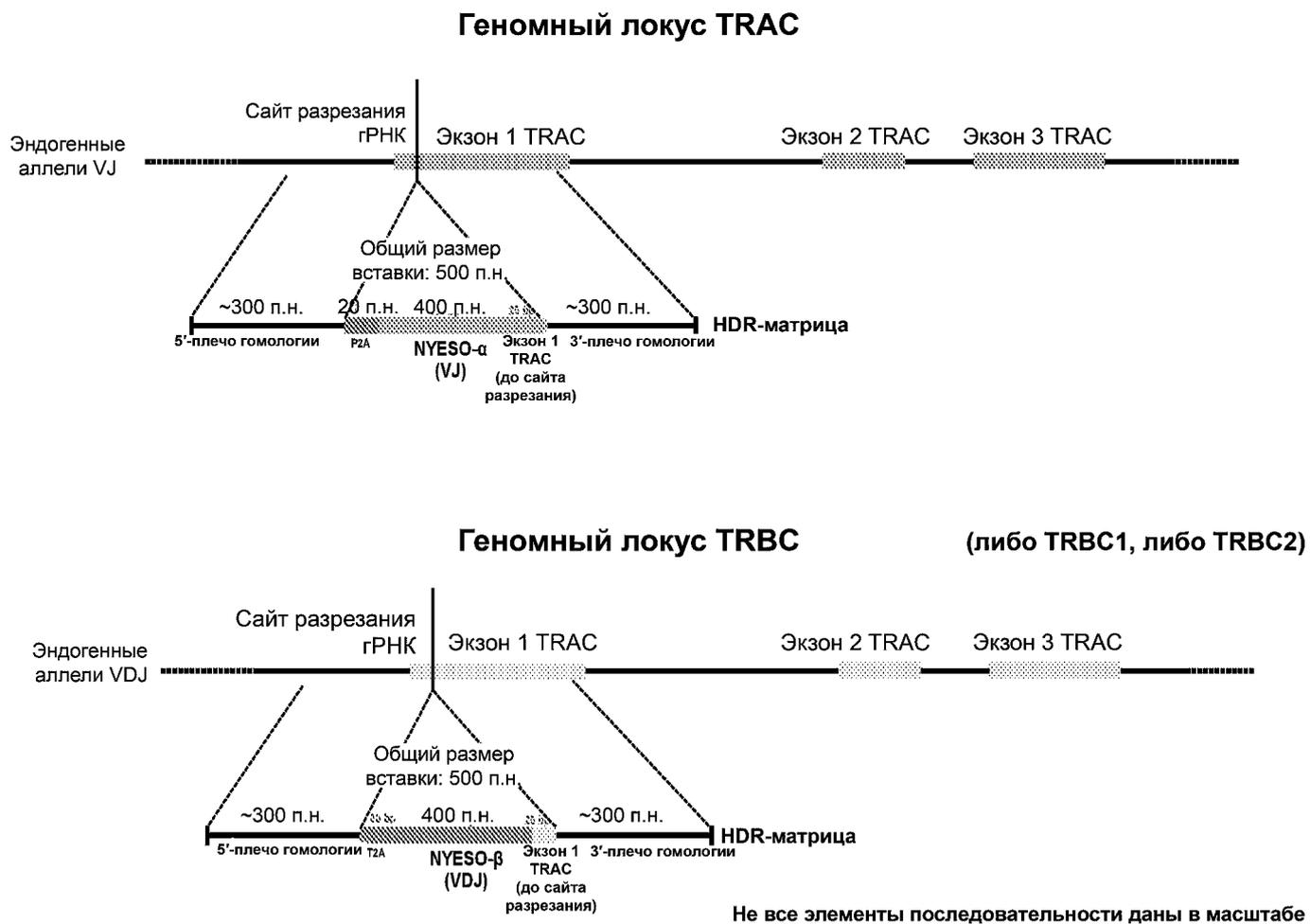
Не все элементы последовательности даны в масштабе

Фиг. 1А

Геномный локус TRBC1/2

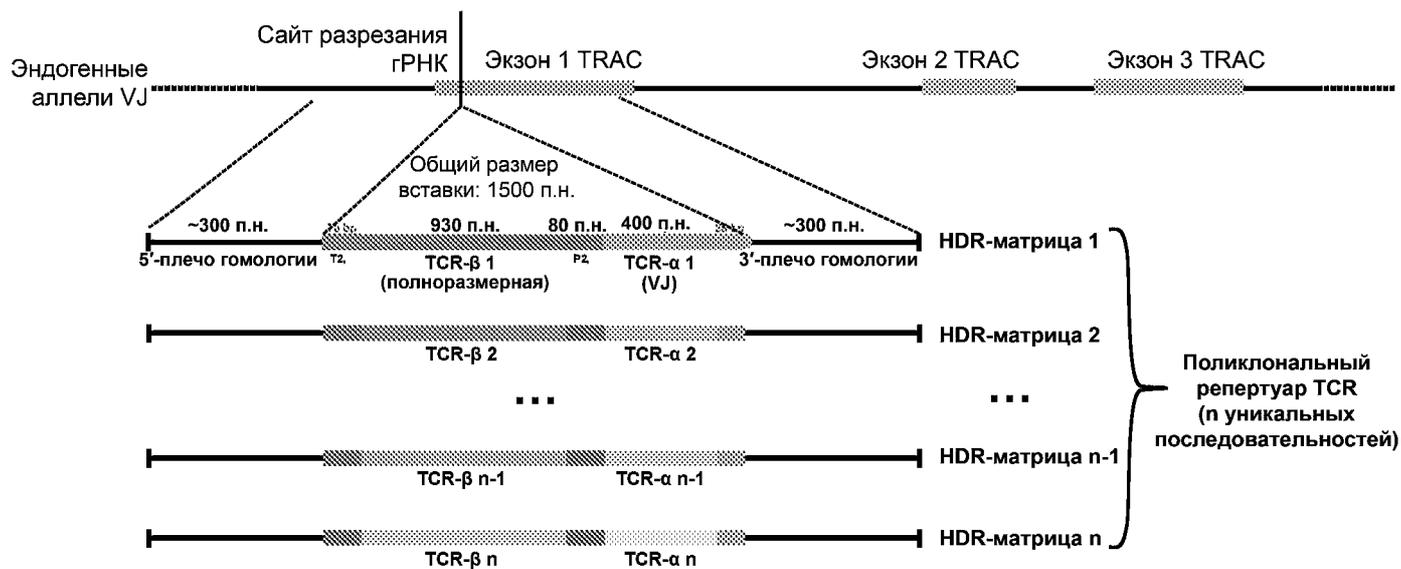


Фиг. 1В



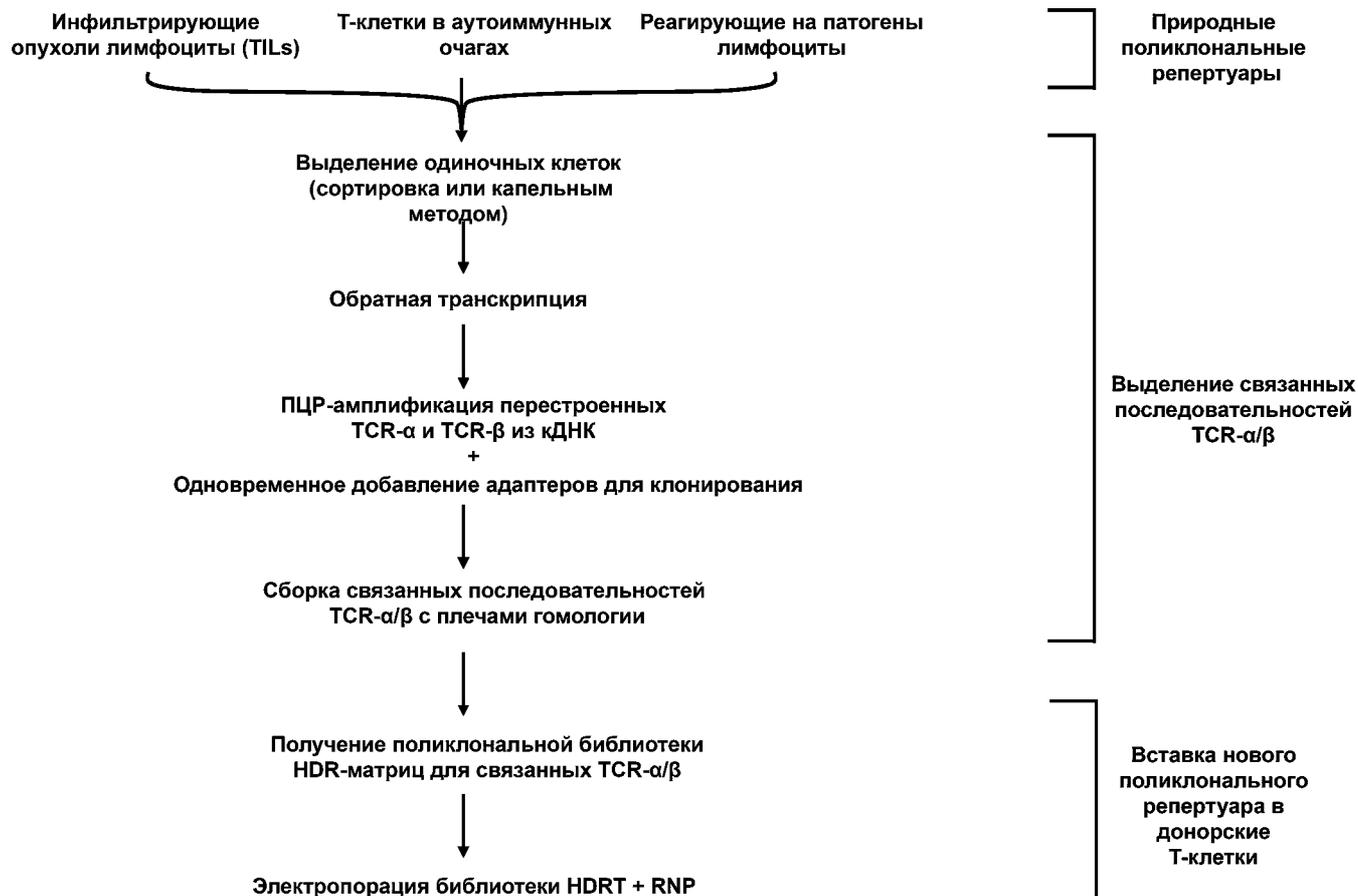
Фиг. 2

Геномный локус TRAC

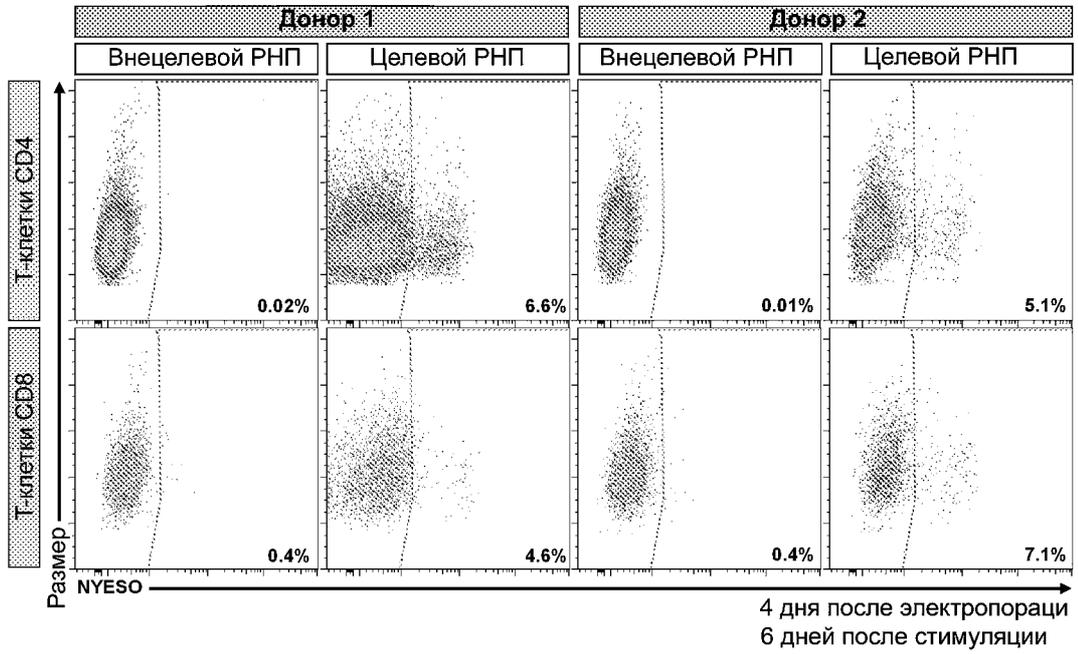


Не все элементы последовательности даны в масштабе

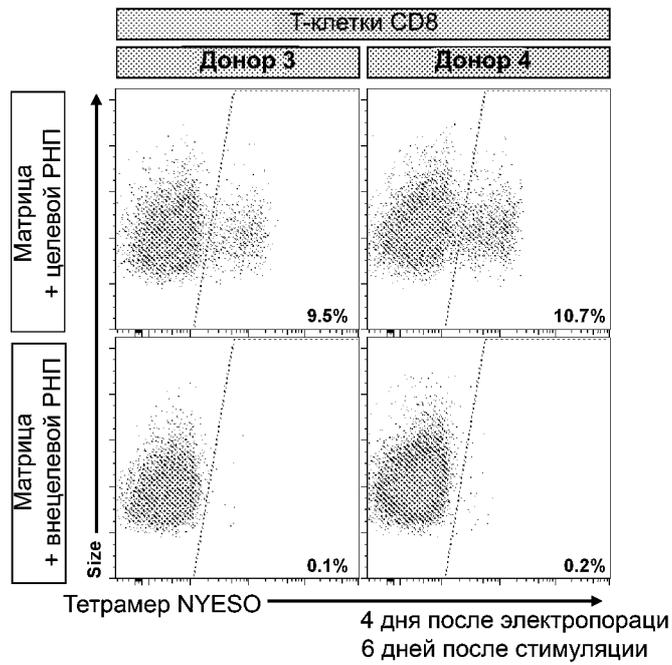
Фиг. 3А



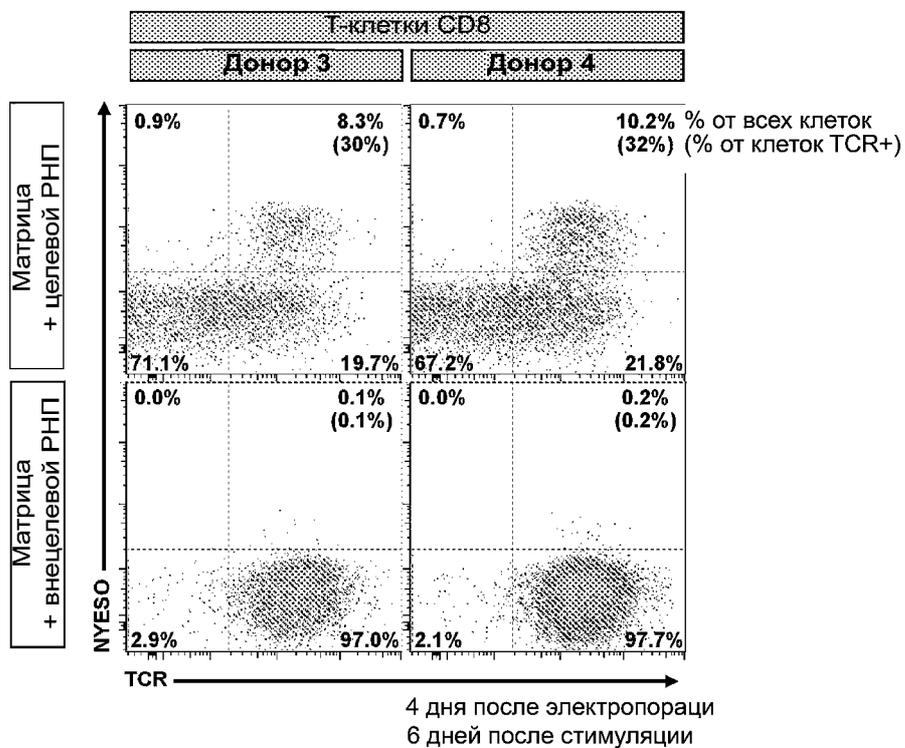
Фиг. 3В



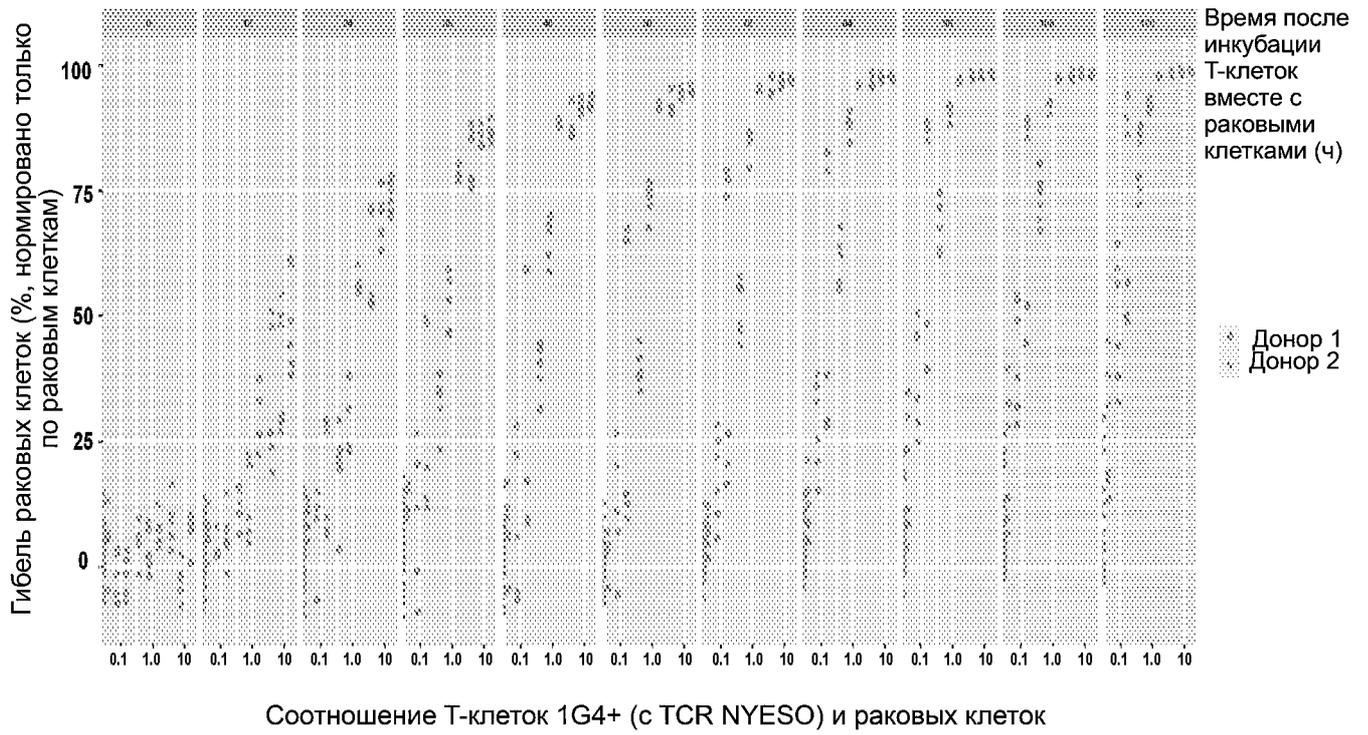
Фиг. 4А



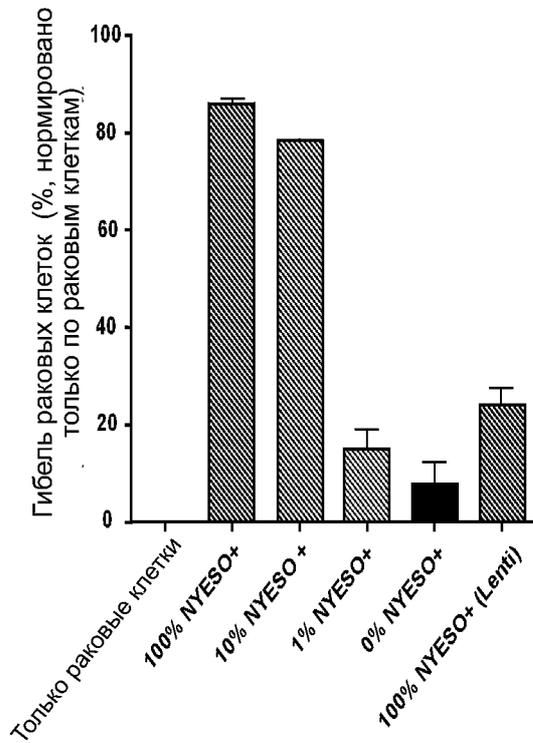
Фиг. 4В



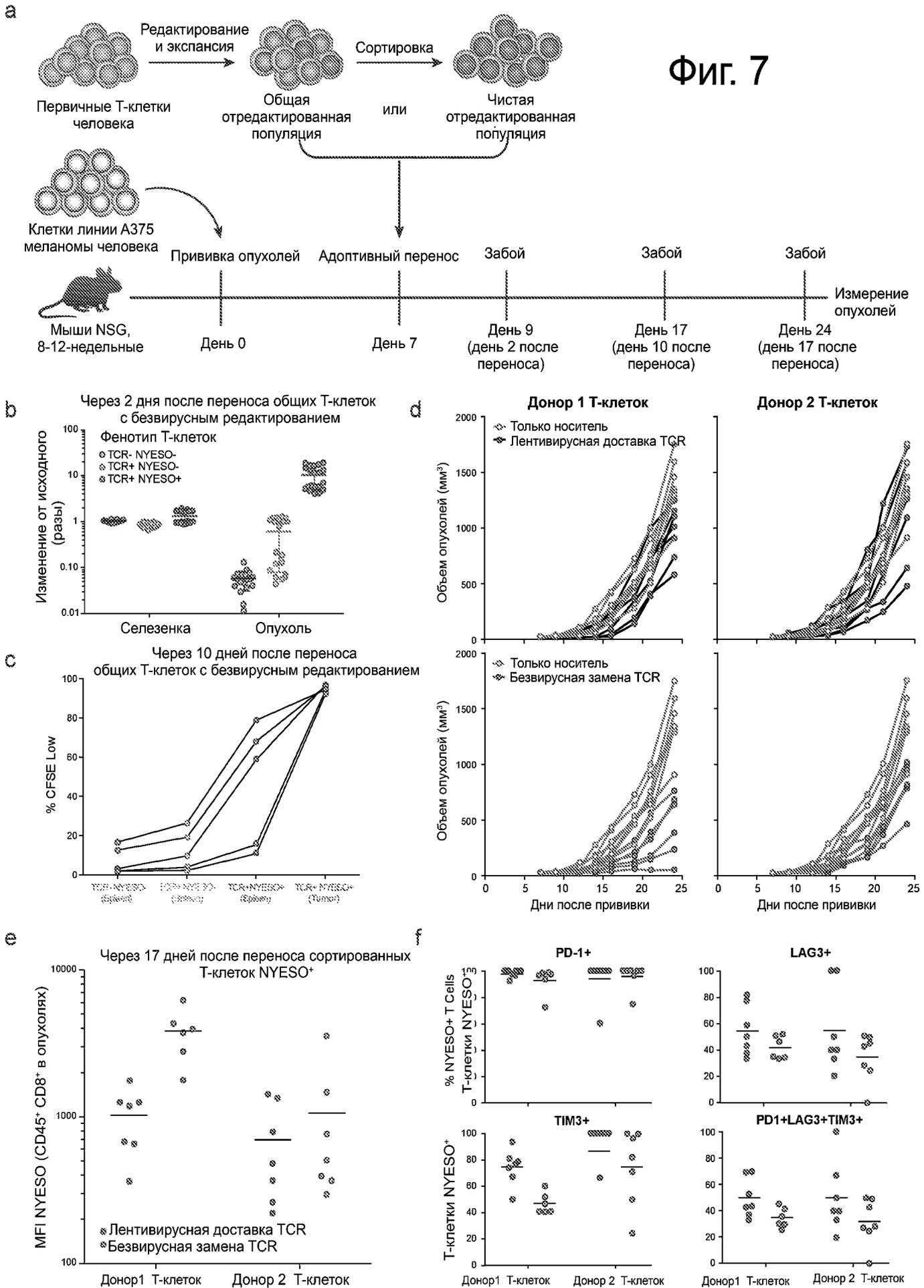
Фиг. 5

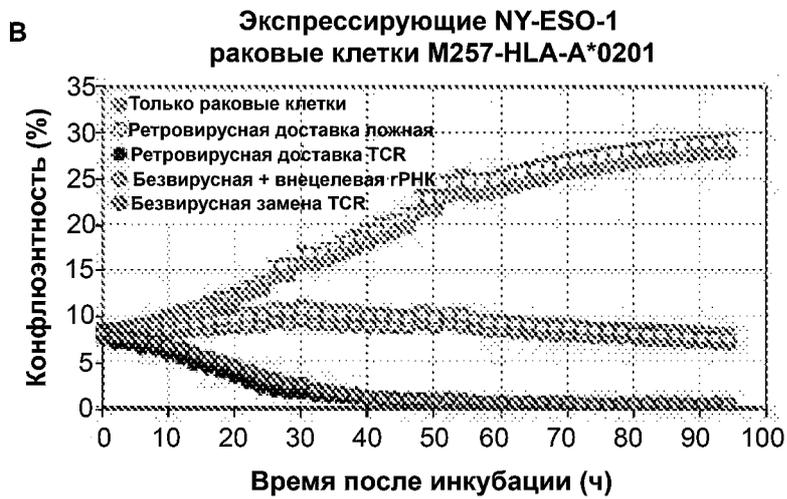
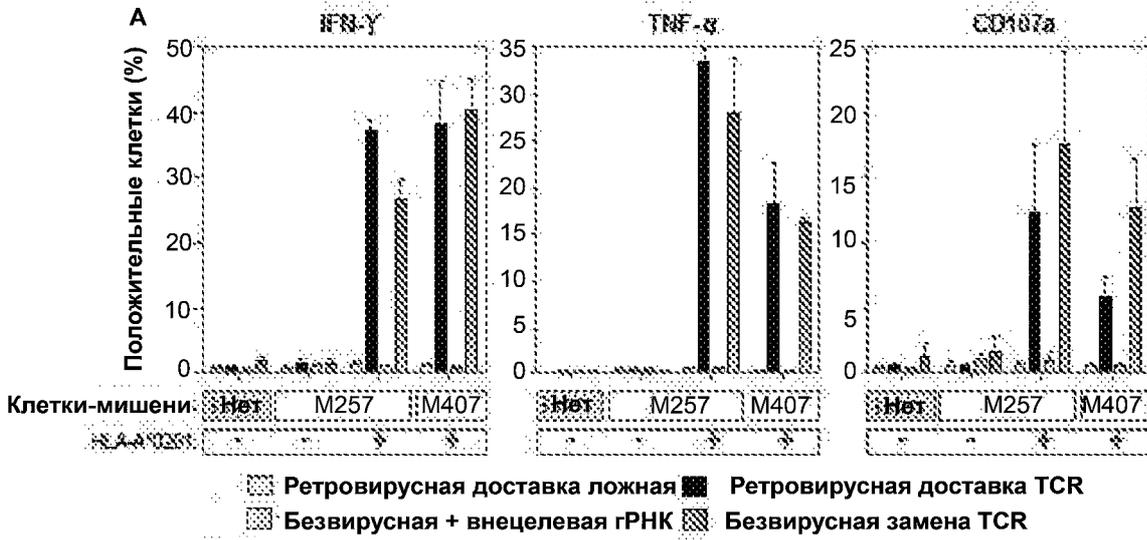


Фиг. 6А

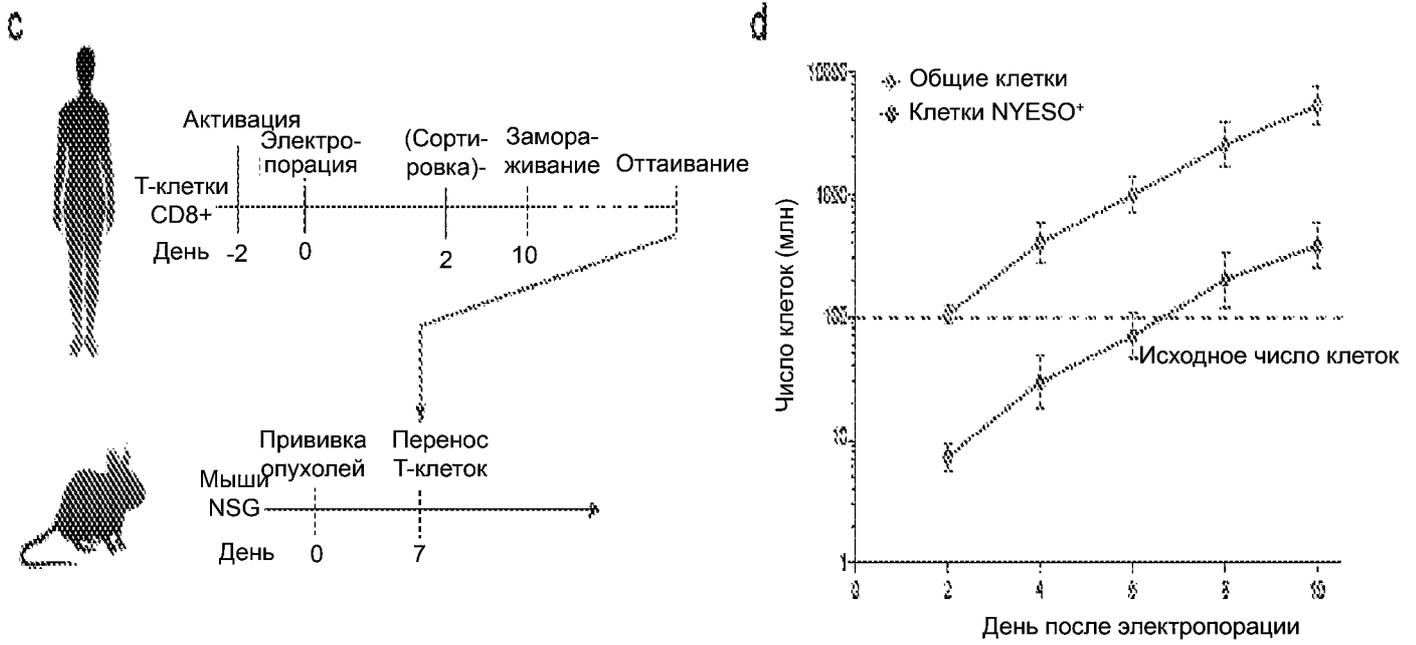


Фиг. 6В

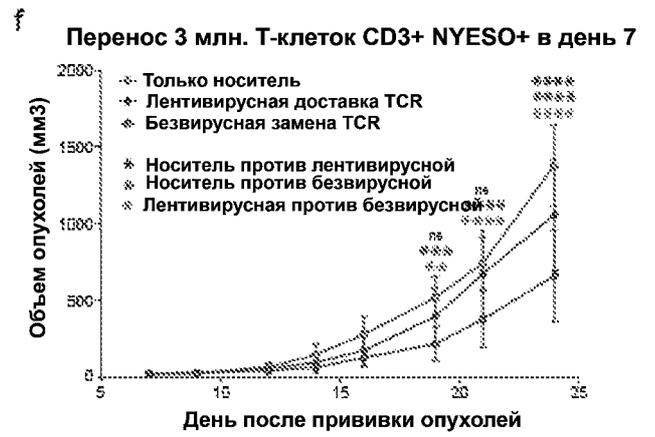
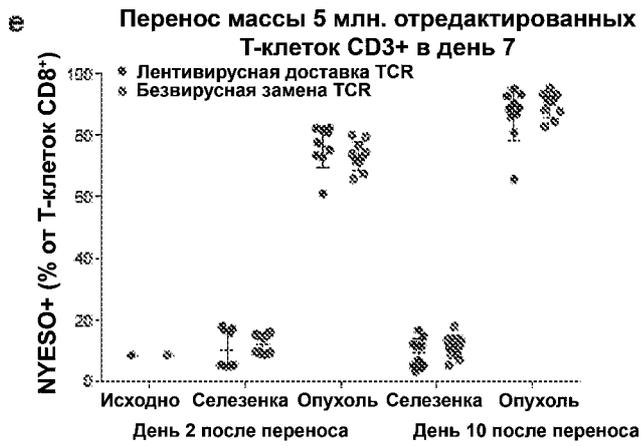




Фиг. 8А-8В

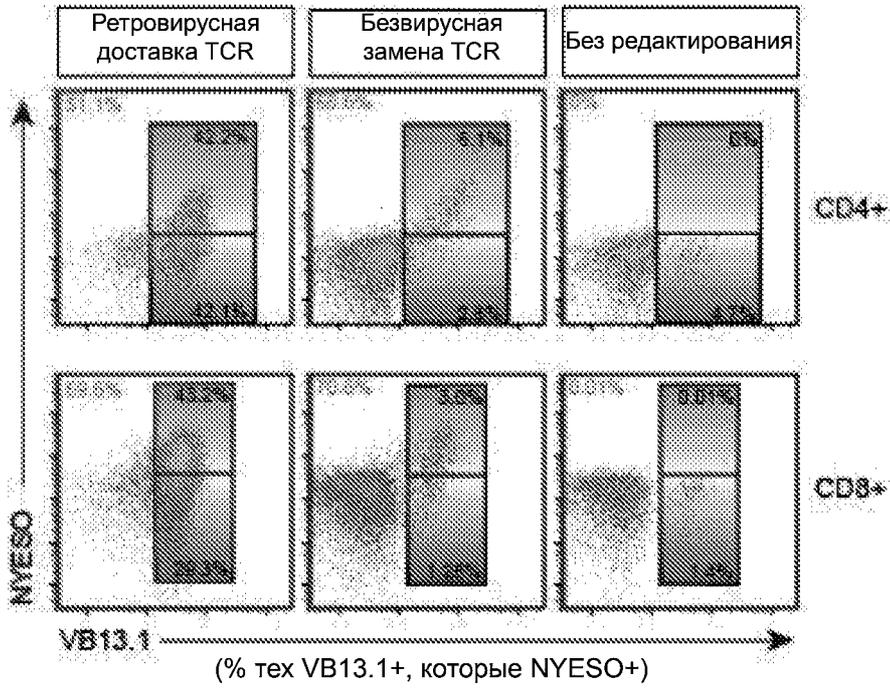


Фиг. 8С-8D

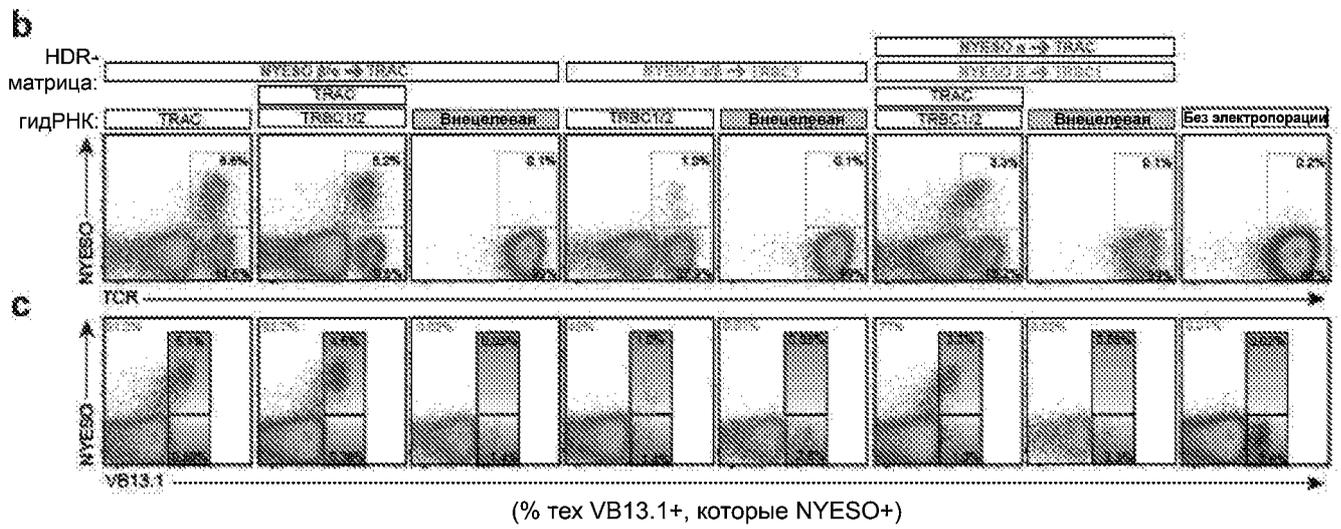


Фиг. 8E - 8F

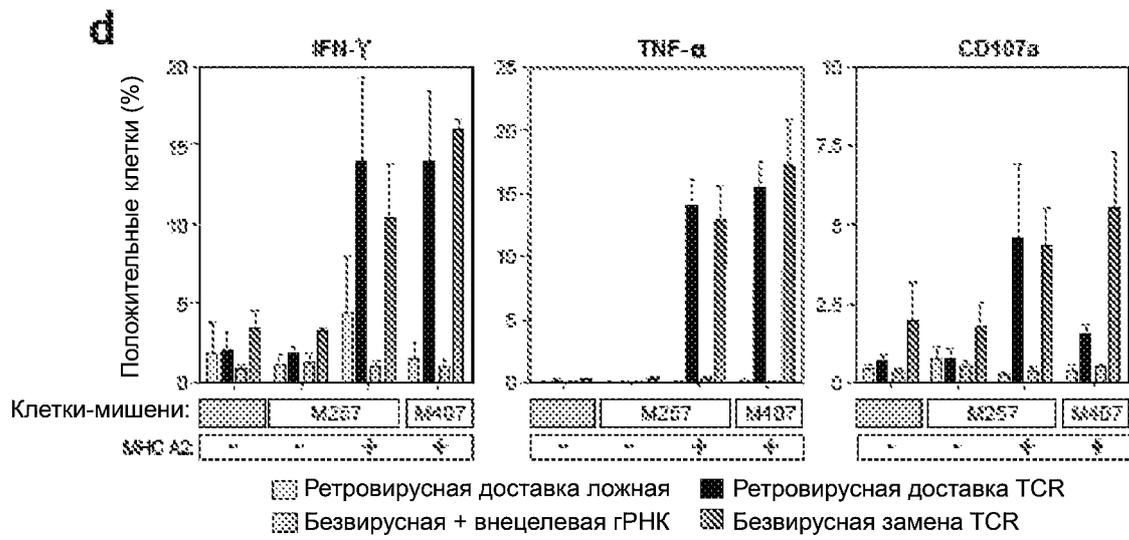
a



Фиг. 9А



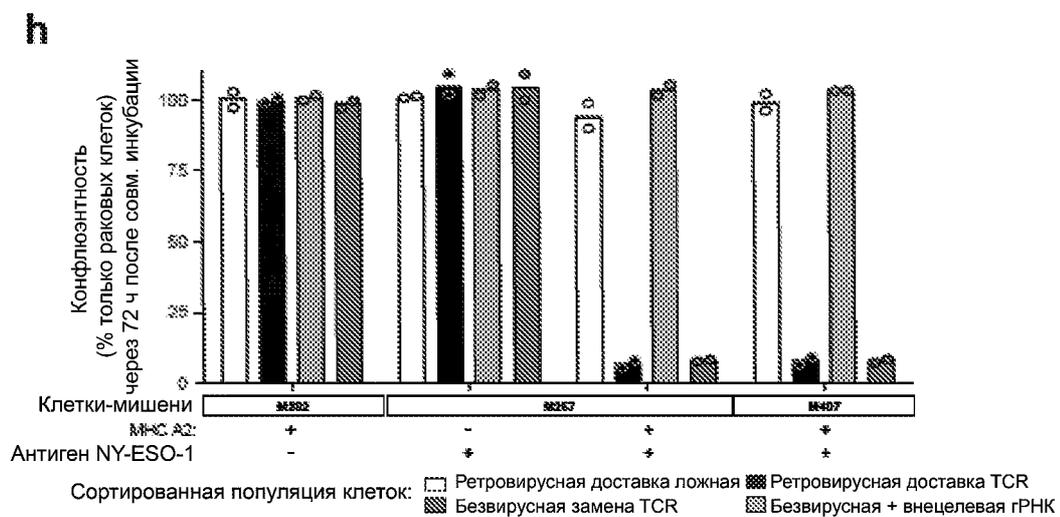
Фиг. 9В-С



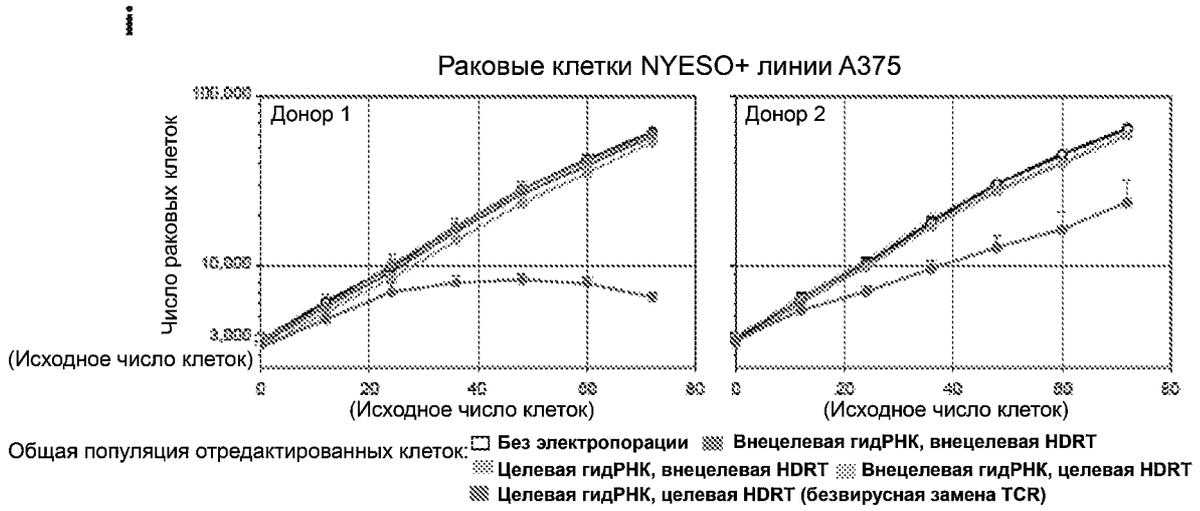
Фиг. 9D



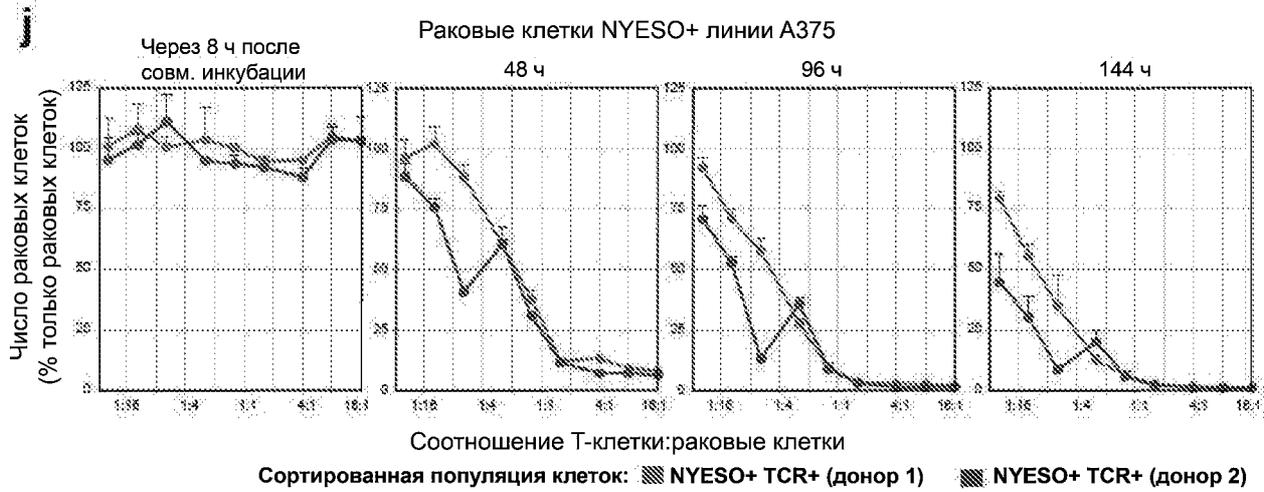
Фиг. 9E-G



Фиг. 9H

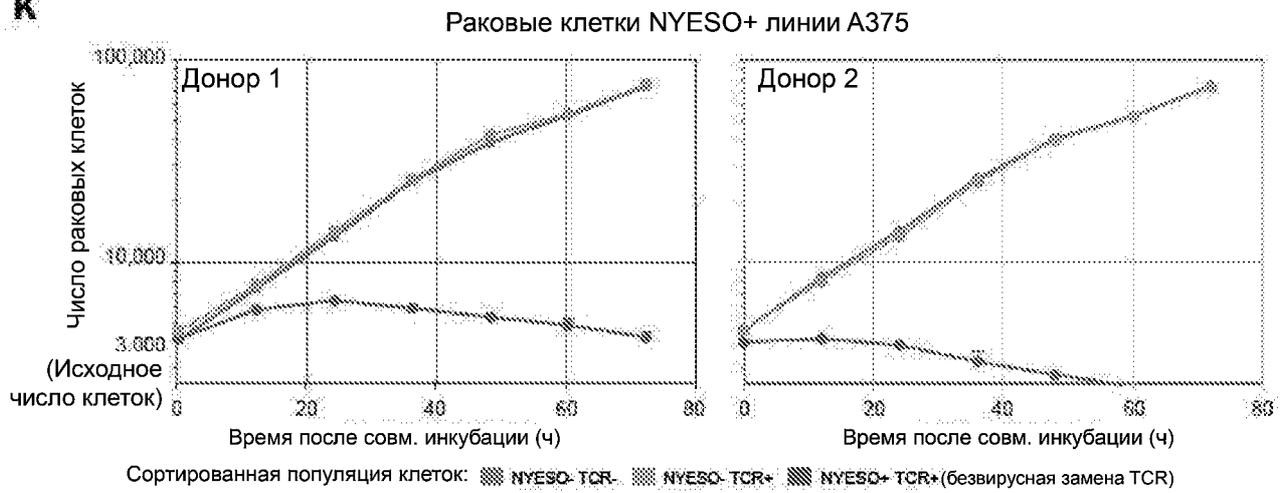


Фиг. 9I



Фиг. 9J

k



Фиг. 9К