

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191020 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.17

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.15

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИММУНОТЕРАПИИ

(31) 62/746,522; 62/747,037

(32) 2018.10.16; 2018.10.17

(33) US

(86) PCT/US2019/056399

(87) WO 2020/081613 2020.04.23

(71) Заявитель:
ИНТЕЛЛИА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

Беккер Эми Мелисса, Гоел
Сурбхи, Хессе Сара, Ластер Трой
Аарон, Шультес Биргит, Язински
Стефани А., Винай Пуджа (US)

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

(57) Представлены композиции и способы для редактирования, например изменения последовательности ДНК в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. Предлагаются, например, композиции и способы иммунотерапии.

A1

202191020

202191020

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568464EA/025

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИММУНОТЕРАПИИ

[0001] В данной заявке заявлен приоритет предварительной заявки на патент США № 62/746 522, поданной 16 октября 2018 г., и на патент № 62/747 037, поданной 17 октября 2018 г., которые включены в данный документ в форме приведенных ссылок.

[0002] Настоящая заявка включает список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен сюда посредством ссылки. Копия ASCII, называется Sequence_Listing.txt, создан 14 октября 2019 года, и имеет размер 272 килобайта.

[0003] CRISPR (регулярные кластеры коротких палиндромных повторов) эволюционировали в бактериях как адаптивная иммунная система для защиты от вирусной атаки. При воздействии вируса короткие сегменты вирусной ДНК интегрируются в локус CRISPR бактериального генома. РНК транскрибируется из части локуса CRISPR, которая включает вирусную последовательность. Эта РНК, которая включает последовательность, комплементарную вирусному геному, опосредует нацеливание белка Cas9 на последовательность в вирусном геноме. Белок Cas9 расщепляет и тем самым ограничивает вирусную мишень.

[0004] Недавно, система CRISPR/Cas была адаптирована для редактирования генома в эукариотических клетках. Введение сайт-специфичных одноцепочечных разрывов (SSB) или двухцепочечных разрывов (DSB) позволяет изменять последовательности-мишени посредством, например, *негомологичного соединения концов* (NHEJ) или репарации путем гомологичной рекомбинации (HDR).

[0005] Эйкем и другие (2017) Nature 543 (7643): 113-117 сообщают, что нацеливание химерного антигенного рецептора (CAR) на локус гена TRAC с помощью системы CRISPR-Cas9 усиливает отторжение опухоли. Кроме того, такое нацеливание на локус TRAC предотвращает передачу тонических сигналов CAR и устанавливает эффективную интернализацию и повторную экспрессию CAR после однократного или многократного воздействия антигена, таким образом задерживая дифференцировку Т-клеток в эффекторные клетки и истощение. Тем не менее, существующие подходы могут производить Т-клетки с менее чем желаемой активностью против намеченной мишени (включая, без ограничения, продуцирование Т-клеток, которые экспрессируют CAR из TRAC локуса, и продукт эндогенного TRBC гена, который может взаимодействовать с CAR и производить Т-клетки с нежелательной реактивностью). Таким образом, существует потребность в улучшенных композициях и способах иммунотерапии.

[0006] Соответственно, предоставляются следующие варианты воплощения изобретения. В некоторых вариантах воплощения данного изобретения предоставляются композиции и способы с применением направляющей (*направляющей*) РНК с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как CRISPR/Cas система, для существенного снижения или нокаута экспрессии TRBC и/или TRAC генов, таким

образом существенно снижая или устраняя производство нативных альфа- и/или бета-субъединиц рецептора Т-клеток, также называемых TCR.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Описанные в данном документе изобретения, относятся к композициям и способам лечения с помощью модифицированных Т-клеток (например, иммуноонкологии и для снижения аутоиммунитета), например, клеток, модифицированных по конкретным последовательностям в их геноме, в том числе модифицированных путем введения систем CRISPR, которые включают молекулы gPHK, которые нацелены на указанные последовательности-мишени, и способы их получения и применения. Например, настоящее изобретение относится к молекулам gPHK, системам CRISPR, клеткам и способам, применимым для редактирования генома клеток, например Т-клеток, например сконструированных Т-клеток, которые не имеют экспрессии эндогенных Т-клеточных рецепторов, например Т-клеток, подходящих для дальнейшей инженерии для вставки интересующей кодирующей последовательности, например Т-клеток дополнительно сконструированных для экспрессии Т-клеточного рецептора, такого как модифицированный или мутантный Т-клеточный рецептор, и полезные для иммунотерапии.

[0008] В первом аспекте изобретение относится к молекуле gPHK, включающей транс-активирующую tracrPHK (tracrRNA) и крисперную crPHK (crRNA), где crPHK включает нацеливающий домен, который связывается с целевой последовательностью Т-клетки. В одном варианте воплощения нацеливающий домен комплементарен целевой последовательности Т-клетки. Т-клетка может быть аутологичной или аллогенной Т-клеткой. Т-клетка может быть CD3⁺, CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеткой.

Изобретение представлено в формуле изобретения, а дополнительные варианты воплощения изобретения изложены ниже.

[0009] Изобретение обеспечивает способ изменения последовательности ДНК в гене TRBC1 и/или TRBC2, включающий доставку композиции в клетку, причем композиция включает:

- (а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:
 - i. направляющей последовательности, отобранной из SEQ ID №: 1-89;
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
 - iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
 - iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и
 - v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6; или
- (б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно
- (в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту,

кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0010] В изобретении дополнительно предлагается способ изменения последовательности ДНК, включающий доставку композиции в клетку, причем композиция включает:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. последовательности, которая включает 15 последовательных нуклеотидов $\pm$ 10 нуклеотидов с координатами генома, перечисленными в любой из Таблиц 1 и/или 3 для SEQ ID №: 1-89 и 179-184;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (i);

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из (i);

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0011] В изобретении дополнительно также предложен способ снижения экспрессии гена TRBC1 и/или TRBC2, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция включает:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6; или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0012] В изобретении дополнительно предлагается способ иммунотерапии, включающий введение композиции субъекту, его аутологичной клетке и/или аллогенной клетке, при этом композиция включает:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6; или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0013] В изобретении дополнительно также предложен способ изменения последовательности ДНК в гене TRAC, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция включает:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; и

v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95; или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0014] В изобретении дополнительно предлагается способ снижения экспрессии гена TRAC, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция включает:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; и

v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95;
или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0015] Изобретение также относится к способу иммунотерапии, включающий введение композиции субъекту, его аутологичной клетке и/или аллогенной клетке, при этом композиция включает:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90 -178, 185 и 213-218;

iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; и

v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95;
или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0016] В изобретении дополнительно предлагается способ изменения последовательности ДНК, включающий доставку композиции в клетку, причем композиция включает:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. последовательности, которая включает 15 последовательных нуклеотидов $\pm$ 10 нуклеотидов с координатами генома, перечисленными в любой из Таблиц 2 и/или 3 для SEQ ID №: 90-218;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (i);

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из (i);

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту,

кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0017] В изобретении дополнительно также предложен способ изменения последовательности ДНК в TRBC1, TRBC2 и/или TRAC генах, включающий доставку в клетку первой направляющей РНК, второй направляющей РНК и, необязательно, РНК-направляемого ДНК-связывающего агента или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, причем первая направляющая РНК включает последовательность, выбранную из:

- i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
 - ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранных из SEQ ID №: 1-89;
 - iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
 - iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и
 - v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6,
- и при этом вторая направляющая РНК включает последовательность, выбранную из:

- i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;
- ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;
- iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;
- iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; и
- v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95.

[0018] В изобретении дополнительно также предложен способ снижения экспрессии TRBC1, TRBC2 и/или TRAC генов, включающий доставку в клетку первой направляющей РНК, второй направляющей РНК и, необязательно, РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, причем первая направляющая РНК включает последовательность, выбранную из:

- i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
- ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
- iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
- iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6, и при этом вторая направляющая РНК включает последовательность, выбранную из:

i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90 -178, 185 и 213-218;

iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; и

v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95.

[0019] В изобретении дополнительно предлагается способ иммунотерапии, включающий введение композиции субъекту, его аутологичной клетке или аллогенной клетке, при этом композиция включает: первую направляющую РНК, вторую направляющую РНК и, необязательно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, где первая направляющая РНК включает последовательность, выбранную из:

i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1 -89;

iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6, и при этом вторая направляющая РНК включает последовательность, выбранную из:

i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95.

[0020] Не ограничиваясь теорией, отметим, что применение TRAC/TRBC двойного мутанта, например, нокаут-мутанта, в некоторых вариантах воплощения изобретения является выгодным в контексте данного изобретения, поскольку большая часть

сконструированного/введенного TCR достигает поверхности клетки.

[0021] В некоторых вариантах воплощения изобретения TRBC нокаут в сочетании с TRAC-нокаутом экзогенного TCR в сконструированной клетке дает преимущество в обеспечении большей активности экзогенного TCR в сконструированной клетке.

[0022] В некоторых вариантах воплощения изобретения TRBC нокаут в сочетании с TRAC-нокаутом экзогенного TCR в сконструированной клетке дает преимущество в обеспечении большей селективности экзогенного TCR в сконструированной клетке.

[0023] В дополнение к этому, в некоторых вариантах воплощения изобретения нокаут TRBC в сочетании с нокаутом TRAC экзогенного TCR в сконструированной клетке может иметь преимущество в обеспечении большего уничтожения клеток, например, если измерять активность каспазы.

[0024] В некоторых вариантах воплощения изобретения TRBC нокаут в сочетании с TRAC-нокаутом экзогенного Т-клеточного рецептора (TCR) в сконструированной клетке дает преимущество в повышении секреции интерферона гамма (IFN-gamma), например, в ответ на индуцирующий пептид (например, ген опухоли Вильмса (ген WT1)).

[0025] Кроме того, в некоторых вариантах воплощения изобретения двойной нокаут TRAC/TRBC Т-клеточного рецептора (TCR) является преимуществом в обеспечении большей секреции интерферона гамма (IFN-gamma), например, в клетках CD4+.

[0026] В дополнение к этому, преимущественно в некоторых вариантах воплощения изобретения увеличивается интерфероновый ответ (IFN γ и/или TNF α) в редактированных клетках, где транскрипция вставленной конструкции стимулируется эндогенным промотором TRAC.

[0027] Кроме того, в некоторых вариантах воплощения изобретения двойной нокаут TRAC/TRBC с этими конкретными TCR дает преимущество в обеспечении большей секреции IFN- γ в CD4+ клетках. Не ограничиваясь теорией, В некоторых вариантах воплощения изобретения такую активность можно реже наблюдать в клетках CD4+, которые обычно не сильно связаны с активностью с пептидами, представленными HLA класса I.

[0028] Кроме того, в некоторых вариантах воплощения изобретения TRAC/TRBC двойной нокаут с конкретным TCR дает преимущество в получении более высокого ответа в клетках CD4+, например, в анализе дегрануляции. Опять же, не ограничиваясь теорией, В некоторых вариантах воплощения изобретения такую активность можно реже наблюдать в клетках CD4+, которые обычно не сильно связаны с активностью с пептидами, представленными HLA класса I.

[0029] Кроме того, в некоторых вариантах воплощения изобретения мутант с двойным нокаутом TRAC/ TRBC имеет то преимущество, что он дает меньший уровень аллореактивности, чем мутант с одиночным нокаутом TRAC, например, при тесте реакции смешанной культуры лимфоцитов.

[0030] В изобретении дополнительно предложен способ экспрессии

гетерологичного иммунологического рецептора посредством встраивания в TRAC локус, включающий доставку в клетку первой направляющей РНК, второй направляющей РНК и РНК направляющего ДНК-связывающего агента или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, причем первая направляющая РНК включает последовательность, выбранную из:

- i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
 - ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
 - iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
 - iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1, 2, 3, 5, 6; и
 - v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 2, 3, 5, 6
- и

при этом вторая направляющая РНК включает последовательность, выбранную из:

- i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90, 95, 97, 98, 185, 214, 218;
- ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90, 95, 97, 98, 185, 214 и 218;
- iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90, 95, 97, 98, 185, 214 и 218;
- iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90, 95, 97, 185 и 214;
- v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90, 95 и 185; и
- vi) направляющей последовательности, содержащей SEQ ID № 90 или 214.

[0031] Единичное расщепление и/или редактирование может приводить к нокаутированию эндогенного TRAC гена. В качестве дополнительного преимущества, если шаблон вводится или поставляется во время процесса редактирования, экзогенный полипептид, представляющий интерес, может быть вставлен в целевой локус при редактировании. Это преимущество проистекает, в частности, из применения направляющих РНК со следующими SEQ ID №: 90, 95, 97, 185, 203, 204, 205, 206, 210, 211 и/или 214. Эти направляющие РНК также могут быть введены вместе с gРНК, нацеленной на локус или локусы генов TRBC.

[0032] Первая направляющая РНК может включать последовательность SEQ ID № 2, а вторая направляющая РНК включает последовательность SEQ ID № 90.

[0033] Первая направляющая РНК может включать последовательность SEQ ID № 180, а вторая направляющая РНК может включать последовательность SEQ ID № 186.

[0034] Первая направляющая РНК может включать последовательность любой из SEQ ID №: 1, 2, 3, 5, 6, а вторая направляющая РНК может включать последовательность SEQ ID № 90.

[0035] Первая направляющая РНК может включать последовательность любой из SEQ ID №: 1, 2, 3, 5, 6, а вторая направляющая РНК может включать последовательность SEQ ID № 214.

[0036] Первая направляющая РНК, вторая направляющая РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, могут быть введены практически одновременно.

[0037] Последовательности ДНК в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC могут быть изменены одновременно.

[0038] РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, могут быть введены как часть способов модификации.

[0039] Способы могут дополнительно включать:

(а) индукцию двухцепочечного разрыва (DSB) генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в клетке и/или субъекте; или

(б) индукцию одноцепочечного разрыва (SSB) в TRBC1, TRBC2 и/или TRAC генах в клетке и/или субъекте; или

(в) снижение экспрессии TRBC1, TRBC2 и/или TRAC генов в клетке и/или субъекте.

[0040] Способы могут дополнительно включать введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей интересующий полипептид, где необязательно:

(а) один или более полипептидов представляющих интерес включают рецептор;

(б) один или более полипептидов представляющих интерес включают иммунологический рецептор;

(в) один или более полипептидов представляющих интерес, включают рецептор Т-клетки, кроме того, необязательно, в котором Т-клеточный рецептор распознает антиген рака;

(г) один или более полипептидов представляющих интерес содержат, WT1-специфический Т-клеточный рецептор, в котором Т-клеточный рецептор распознает WT1 или его фрагмент;

(д) один или более полипептидов представляющих интерес, включают химерный рецептор антигена, дополнительно, необязательно, в котором химерный рецептор антигена распознает антиген рака; или

(е) один или более представляющих интерес полипептидов содержат химерный рецептор антигена, специфичный к WT1, причем химерный рецептор антигена распознает WT1 или его фрагмент.

[0041] Способы могут дополнительно включать:

а. введение α -цепи и β -цепи TCR;

б. введение одной или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих α -цепь TCR и β -цепь TCR;

в. введение WT1-специфического TCR α -цепи и β -цепи;

г. введение одной или более последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют α -цепь и β -цепь WT1-специфического TCR;

д. введение первой последовательности TCR, выбранной из: (i) SEQ ID № 501 или 504; (ii) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 501 или 504; и (iii) смежной подпоследовательности, по меньшей мере, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, или 250 аминокислот SEQ ID № 501 или 504,

и

введение второй последовательности TCR, выбранной из: (i) SEQ ID № 502 или 505; (ii) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 502 или 505; и (iii) смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или 300 аминокислот SEQ ID № 502 или 505,

е. введение первой последовательности TCR, выбранной из: (i) SEQ ID № 501 или 513; (ii) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 510 или 513; и (iii) смежной последовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 или 250 аминокислот SEQ ID № 510 или 513,

и

введение второй последовательности TCR, выбранной из: (i) SEQ ID № 511 или 514; (ii) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 511 или 514; и (iii) смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или 300 аминокислот SEQ ID № 511 или 514,

ж. введение последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, которая кодирует первую последовательность TCR (д) или (е);

з. введение последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, которая кодирует вторую последовательность TCR (д) - (е);

и. введение последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты из (ж) и (з);

к. введение полипептида, выбранного из SEQ ID № 500, 503, 506, 509, 512, 515, 518 или 521, или аминокислотной последовательности, которая идентична ему по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, необязательно путем введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей то же самое; или

л. введение полипептидов α -цепи TCR и β -цепи TCR, выбранных из (i) - (viii) ниже, или аминокислотной последовательности, которая идентична им по меньшей мере на 99%, 95%, 90%:

SEQ ID № 501 и SEQ ID № 502;
 SEQ ID № 504 и SEQ ID № 505;
 SEQ ID № 507 и SEQ ID № 508;
 SEQ ID № 510 и SEQ ID № 511;
 SEQ ID № 513 и SEQ ID № 514;
 SEQ ID № 516 и SEQ ID № 517;
 SEQ ID № 519 и SEQ ID № 520;

м. введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид α -цепи и β -цепи TCR (μ).

[0042] Первая последовательность нуклеиновой кислоты может быть в окружении фланкирующих последовательностей гомологичных первому целевому локусу. Вторая последовательность нуклеиновой кислоты может быть окружена фланкирующими последовательностями, гомологичными второму целевому локусу. Фланкирующие последовательности могут иметь длину по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов.

[0043] Первым целевым локусом может быть ген TRAC, TRBC1 или TRBC2, например, ген TRAC. Вторым целевым локусом может быть TRAC, TRBC1 или TRBC2 ген, например, TRBC1 или TRBC2 гены.

[0044] Введенная последовательность нуклеиновой кислоты или первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты могут не включать промоторной области, т.е. нуклеиновая кислота может быть «без промотора».

[0045] Введенная последовательность нуклеиновой кислоты или первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты могут быть функционально связаны с промотором, необязательно, промотором является EF-1 α промотор (SEQ ID № 603).

[0046] Введенная последовательность нуклеиновой кислоты или первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты могут быть введены через вектор, через трансфекцию, через липидную наночастицу или через микроинъекцию.

[0047] Вектор может быть вирусным вектором, где дополнительно необязательно, вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный вектор.

[0048] Изобретение также представляет способ встраивания в локус TCR (такого как WT1-специфический TCR), включающий доставку в клетку первой направляющей РНК для вставки TCR, которая включает направляющую последовательность, выбранную из: SEQ ID №: 90, 95, 97, 98, 185, 214 и 218, и необязательно (i) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент; и/или (ii) донорную молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует TCR (такой как WT1-специфический TCR). Способ может дополнительно включать доставку второй направляющей РНК, содержащей последовательность,

выбранную из SEQ ID №: 1-89. Способ может дополнительно включать доставку второй направляющей РНК, содержащей последовательность, выбранную из SEQ ID №: 179-184.

[0049] TCR может быть, WT1-специфическим TCR, который включает:

i) полипептид, выбранный из SEQ ID № 500, 503, 506, 509, 512, 515, 518 или 521, или аминокислотную последовательность, которая идентична ему по меньшей мере на 99%, 95%, 90%; или

ii) полипептиды α -цепи TCR и β -цепи TCR, выбранные из (i) - (viii) ниже, или аминокислотную последовательность, которая идентична им по меньшей мере на 99%, 95%, 90%:

SEQ ID № 502 и SEQ ID № 503;

SEQ ID № 504 и SEQ ID № 505;

SEQ ID № 507 и SEQ ID № 508;

SEQ ID № 510 и SEQ ID № 511;

SEQ ID № 513 и SEQ ID № 514;

SEQ ID № 516 и SEQ ID № 517;

SEQ ID № 519 и SEQ ID № 520;

SEQ ID № 522 и SEQ ID № 523.

[0050] К изобретению также относится композиция, содержащая:

а. направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-89; или

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1-24; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1-6; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0051] Композиция может использоваться для изменения последовательности ДНК в генах TRBC1 и/или TRBC2 в клетке. Композиция может использоваться для снижения экспрессии генов TRBC1 и/или TRBC2 в клетке. Направляющая РНК в композиции может включать последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 196-200.

[0052] Изобретение также обеспечивает композицию, содержащую:

а. направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218; или

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 90-95; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0053] Композиция может быть применена для изменения последовательности ДНК внутри гена TRAC в клетке. Композиция может быть применена для снижения экспрессии гена TRAC в клетке. Направляющая РНК может быть выбрана из любой из SEQ ID №: 185-192 и 201-212.

[0054] Изобретение также относится к клетке, измененной способами, описанными в данном документе. Клетка может быть изменена *ex vivo*.

[0055] Клетка может быть Т-клеткой. Клетка может быть CD3⁺, CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеткой. Клетка может быть клеткой млекопитающего, примата или человека.

[0056] Клетка может не иметь эндогенного Т-клеточного рецептора. Клетка может быть подходящей для получения Т-клетки, экспрессирующей неэндогенный Т-клеточный рецептор. Таким образом, клетка может быть применена для приготовления Т-клетки, экспрессирующей ХАР.

[0057] Клетка, измененная, как описано в данном документе, может быть CD3⁻ клеткой. Клетка может быть клеткой CD3⁺ до изменения.

[0058] Клетка может дополнительно включать одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, представляющий интерес, необязательно где:

(а) один или более интересующих полипептидов содержат рецептор;

(б) один или более представляющих интерес полипептидов содержат иммунологический рецептор;

(в) один или более представляющих интерес полипептидов содержат Т-клеточный рецептор, дополнительно необязательно, где Т-клеточный рецептор специфичен для WT1; или

(г) один или более представляющих интерес полипептидов содержат химерный рецептор антигена, дополнительно необязательно, где химерный рецептор антигена специфичен для WT1.

[0059] Клетка может дополнительно включать одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих α - и β -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора. Клетка может дополнительно включать одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих γ - и δ -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора.

[0060] Одна или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих α - и

β -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора клеток, описанных в данном документе, могут находиться в локусе TRAC генома. Одна или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих γ - и δ -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора клеток, описанных в данном документе, могут находиться в локусе TRAC генома.

[0061] Последовательность α -цепи TCR может быть выбрана из: (i) SEQ ID № 501 или 504; (ii) последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 501 или 504; и непрерывной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 или 250 аминокислот из SEQ ID № 501 или 504; и

последовательность β -цепи TCR может быть выбрана из: (i) SEQ ID № 502 или 505; (ii) последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 502 или 505; и непрерывной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или 300 аминокислот SEQ ID № 502 или 505.

[0062] α -цепь TCR клетки может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с любой из SEQ ID №: 500, 501, 503 и 504, а β -цепь TCR кодируется в соответствии с любой из SEQ ID №: 500, 502, 503 и 505.

[0063] Последовательность α -цепи TCR может быть выбрана из: (i) SEQ ID № 513; (ii) последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 513; и непрерывной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот из SEQ ID № 513 и где последовательность β -цепи TCR выбрана из: (i) SEQ ID № 514; (ii) последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% или 60% идентична SEQ ID № 514; и непрерывной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот SEQ ID № 514.

[0064] α цепь TCR может быть SEQ ID № 513 и цепь β TCR может быть SEQ ID № 514.

[0065] Один или более генов клеток, описанных в данном документе, экспрессируются под контролем эндогенного промотора.

[0066] Один или более генов клеток, описанных в данном документе, экспрессируются под контролем гетерологичного промотора, где необязательно, гетерологичный промотор является EF-1 α промотором.

[0067] Измененная клетка может включать гены, кодирующие α - и β -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора, и/или гены, кодирующие γ - и δ -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора. Подходящие цепи α , β , γ и δ известны в данной области техники. См. например, WO2018/197492.

[0068] Цепи α и β экзогенного Т-клеточного рецептора могут находиться в TRAC локусе генома. Цепи α и β экзогенного Т-клеточного рецептора, представленные в транскрипте, разделены P2A или другой последовательностью расщепления.

[0069] Изобретение также относится к популяции клеток, включающей описанные в данном документе, где в более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 55%, более чем приблизительно 60%, более чем приблизительно 65%, более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 75%, более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 85%, более чем приблизительно 90%, более чем приблизительно 95%, более чем приблизительно 98% или более чем приблизительно 99% от измененной популяции - это CD3⁺ клетки.

[0070] Изобретение также относится к популяции клеток, содержащей описанные в данном документе, где более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 55%, более чем приблизительно 60%, более чем приблизительно 65%, более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 75%, более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 85%, более чем приблизительно 90%, более чем приблизительно 95%, более чем приблизительно 98% или более чем приблизительно 99% популяции не имеет эндогенного Т-клеточного рецептора.

[0071] В изобретении также предлагается популяция клеток, включающих описанные в данном документе, где экспрессия генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в популяции снижена по сравнению с неизменной популяцией той же клетки по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%.

[0072] Может быть снижена экспрессия TRBC1 гена. Может быть снижена экспрессия TRBC2 гена. Может быть снижена экспрессия TRAC гена.

[0073] От 10 до 100% от популяции клеток, например, от 30 до 99% популяции могут иметь вставки или делеции в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

[0074] Кроме того, между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95% или 95 и 99% популяции клеток могут иметь вставки или делеции в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

[0075] *Инсерции (вставки-делеции)* или вставки могут быть в гене TRBC1. *Вставки-делеции* или вставки могут быть в гене TRBC2. *Вставки-делеции* или вставки могут быть в гене TRAC.

[0076] Способ или композиция для применения, описанные в данном документе, могут привести к редактированию генов TRBC1 и/или TRBC2. Способ или композиция для применения, описанные в данном документе, могут привести к редактированию гена TRAC. Способ или композиция для применения, описанные в данном документе, могут привести к редактированию гена TRBC и гена TRAC.

[0077] Редактирование популяции клеток может быть рассчитано как процентное соотношение (процент редактирования или процент инсерций). Процент редактирования

может быть между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95% или 95 и 99% популяции.

[0078] Композиция, представленная в данном изобретении, может включать sgPHK, содержащую:

(д) любую из SEQ ID №: 179-184 и 196-200;

(е) направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 1-89;

или

(ж) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-24; или

(з) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-6.

[0079] Композиция, описанная в данном документе, может включать sgPHK, содержащую:

(и) любую из SEQ ID №: 186-192 и 201-212; или

(к) направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218; или

(л) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; или

(м) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 90-95.

[0080] Целевая последовательность может находиться в экзоне 1, 2, 3 или 4 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. Целевая последовательность может находиться в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC человека.

[0081] Целевая последовательность может находиться в экзоне 1 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. Целевая последовательность может находиться в экзоне 2 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. Целевая последовательность может находиться в экзоне 3 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. Целевая последовательность может находиться в экзоне 4 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

[0082] Направляющая последовательность может быть комплементарной последовательности-мишени в положительной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. Направляющая последовательность может быть комплементарной последовательности-мишени в отрицательной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

[0083] Первая направляющая последовательность может быть комплементарной первой целевой последовательности в положительной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, и при этом композиция дополнительно включает вторую направляющую последовательность, которая комплементарна второй целевой последовательности в отрицательной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

[0084] Направляющая PHK может включать направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-178, и дополнительно включает нуклеотидную последовательность SEQ ID № 400, где нуклеотиды SEQ ID № 400 следуют за направляющей последовательностью в ее 3'-конец.

[0085] Направляющая PHK может включать направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-178, и дополнительно включает нуклеотидную

последовательность SEQ ID № 401, где нуклеотиды SEQ ID № 401 следуют за направляющей последовательностью в ее 3'-конец.

[0086] Направляющая РНК может быть изменена в соответствии с паттерном SEQ ID № 300, где N вместе представляют любую из направляющих последовательностей SEQ ID №: 1-89. Каждый N в SEQ ID № 300 может быть любым природным или неприродным нуклеотидом, где N образуют направляющую последовательность и направляющая последовательность нацеливает Cas9 на гены TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

[0087] Первая направляющая РНК может включать последовательность SEQ ID № 2, а вторая направляющая РНК может включать последовательность SEQ ID № 90.

[0088] Любой из вышеуказанных способов может дополнительно включать:

(а) введение первой последовательности нуклеиновой кислоты, включающей последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из: (i) SEQ ID № 250; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, или 60% идентична SEQ ID № 250; и (iii) непрерывной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700 или 800 нуклеотидов SEQ ID № 250,

и

введение второй последовательности нуклеиновой кислоты, включающей последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из: (i) SEQ ID № 252; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, или 60% идентична SEQ ID № 252; и (iii) непрерывной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800 или 900 нуклеотидов SEQ ID № 252,

(б) введение первой последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из: (i) SEQ ID № 513; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, или 60% идентична SEQ ID № 513; и (iii) непрерывной подпоследовательности по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700 или 800 нуклеотидов SEQ ID № 513,

и

введение второй последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из: (i) SEQ ID № 514; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, или 60% идентична SEQ ID № 514; и (iii) непрерывной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800 или 900 нуклеотидов SEQ ID № 514,

(в) введение последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей первую последовательность нуклеиновой кислоты из (а) и вторую последовательность нуклеиновой кислоты из (а); или

(г) введение последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей первую

последовательность нуклеиновой кислоты из (b) и вторую последовательность нуклеиновой кислоты из (б).

[0089] sgРНК может включать направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89.

[0090] Направляющая РНК может быть химически синтезирована. Направляющая РНК может включаться в RNP-комплекс. Матричная нуклеиновая кислота может входить в состав вирусного вектора. Матричная нуклеиновая кислота может входить в конструкцию для невирусной доставки. Подходящие вирусные векторы известны в данной области техники, например, ретровирусы, аденовирус, лентивирус, аденоассоциированный вирус и их гибриды. Вирусный вектор может быть лентивирусным (LV) вектором или вектором аденоассоциированного вируса (AAV).

[0091] Направляющая РНК может включать необязательно одну или более из следующих модификаций:

- i) 2'-О-метил (2'-O-Me) модифицированный нуклеотид.
- ii) фосфоротиоатная связь (PS) между нуклеотидами.
- iii) 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.
- iv) модификация одного или более из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК.
- v) модификация одного или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК.
- vi) связь PS между первыми четырьмя нуклеотидами на 5'-конце направляющей РНК.
- vii) связь PS между последними четырьмя нуклеотидами на 3'-конце направляющей РНК.
- viii) 2'-О-Ме модифицированный нуклеотид на первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей РНК.
- ix) 2'-О-Ме модифицированный нуклеотид на последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК.

[0092] Направляющая РНК может включать нуклеотиды SEQ ID № 300 с модификациями, изложенными выше.

[0093] Композиции могут дополнительно включать фармацевтический приемлемый наполнитель.

[0094] LNP может включать биоразлагаемый, ионизируемый липид, например, ионизируемый липид, который представляет собой (9Z, 12Z)-3-(((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил)октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-(((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил (9Z, 12Z)-октадека-9,12-диеноат.

[0095] LNP может включать нейтральный липид, например, нейтральный липид

представляет собой DSPC.

[0096] LNP может включать вспомогательный липид, например, вспомогательный липид представляет собой холестерин.

[0097] LNP может включать скрытый липид, например, скрытый липид представляет собой PEG2k-DMG.

[0098] Композиция может дополнительно включать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. Композиция направляющей РНК и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента может включаться в рибонуклеопротеин (RNP).

[0099] Композиция может включать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, например, Cas9 или иРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, например, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может кодироваться Cas9 геном или быть Cas9 белком.

[0100] Композиция может быть фармацевтическим составом и дополнительно включать фармацевтический приемлемый носитель.

[0101] Настоящее изобретение также предусматривает применение композиции, состава, популяции или клетки, которые описаны в данном документе, для приготовления лекарственного средства.

[0102] Настоящее изобретение также предусматривает применение композиции, состава, популяции или клетки, описанных в данном документе, для лечения рака.

[0103] Настоящее изобретение также предусматривает применение композиции, состава, популяции или клетки, описанных в данном документе, в иммунотерапии субъекта.

[0104] Настоящее изобретение также предусматривает применение композиции, состава, популяции или клетки, описанных в данном документе, для лечения опухолей, которые сверхэкспрессируют опухолевый антиген Вильмса (WT1).

[0105] Настоящее изобретение также предусматривает композицию, состав, популяцию или клетку, описанных в данном документе, для применения при лечении заболевания или расстройства.

[0106] Настоящее изобретение также предусматривает композицию, состав, популяцию или клетку, описанных в данном документе, для применения в иммунотерапии.

[0107] Настоящее изобретение также предусматривает композицию, состав, популяцию или клетку, описанных в данном документе, для применения при лечении рака.

[0108] Настоящее изобретение также предусматривает композицию, состав, популяцию или клетку, описанных в данном документе, для применения при лечении опухолей, которые сверхэкспрессируют опухолевый антиген Вильмса (WT1).

[0109] Настоящее изобретение также относится к композиции, составу, популяции или клетке описанных в данном документе, в способе лечения человека или животного, включающем введение композиции, состава, популяции или клетки, как описано в данном

документе.

[00110] Настоящее изобретение относится к композиции, составу, популяции или клетке, описанных в данном документе, в способе лечения рака у человека или животного, включающем введение композиции, состава, популяции или клетки, как описано в данном документе.

[00111] Настоящее изобретение также относится к композиции, составу, популяции или клетке описанных в данном документе, в способе иммунотерапии человека или животного, включающем введение композиции, состава, популяции или клетки, как описано в данном документе.

[00112] Настоящее изобретение также относится к композиции, составу, популяции или клетке, описанных в данном документе, в способе лечения опухолей, которые сверхэкспрессируют опухолевый антиген Вильмса (WT1) у человека или животного, включающем введение композиции, состава, популяции или клетки, как описано в данном документе.

[00113] Направляющая РНК может иметь последовательность, выбранную из любой SEQ ID №: 1-89.

[00114] Направляющая РНК может иметь последовательность, выбранную из любой SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218.

[00114] Также раскрыты варианты воплощения изобретения, в которых направляющая последовательность выбрана из группы направляющих последовательностей, дающих частоту вставок/делеций в измененных продуктах, соответственно, 20% или больше, 30% или больше, 40% или больше, или 50% или больше.

[00115] Также раскрыты варианты воплощения изобретения, в которых направляющая последовательность выбрана из группы направляющих последовательностей, дающих частоту вставки молекул донорской нуклеиновой кислоты в измененных продуктах, соответственно, 20% или более, 30% или более, 40% или более или 50% или более.

[00116] Также раскрыто применение композиции, состава, популяции или клетки любого из вышеупомянутых вариантов воплощения изобретения для приготовления лекарственного средства, для лечения субъекта. Субъект может быть человеком или животным (например, человеком; яванской обезьяной). В некоторых вариантах воплощения изобретения субъект является человеком.

[00117] Также раскрыты любые из вышеупомянутых композиций или составов для применения при лечении или для применения в модификации (например, образовании инсерций или формировании сдвига рамки считывания или нонсенс-мутации) любого одного или более из генов TRBC1, TRBC2 и TRAC.

[00118] В любом из вышеупомянутых аспектов и вариантов воплощения клеток, ген, включающий целевую последовательность, комплементарную нацеливающему домену первой молекулы gРНК, и, необязательно, ген, включающий целевую

последовательность, комплементарную нацеливающему домену второй молекулы gРНК, и/или ген, включающий целевую последовательность, комплементарную нацеливающему домену третьей молекулы gРНК, был изменен таким образом, что экспрессия функционального продукта гена, включающего целевую последовательность, комплементарную нацеливающему домену первой молекулы gРНК, и, необязательно, ген, включающий последовательность-мишень, комплементарную домену нацеливания второй молекулы gРНК, и/или функциональный продукт гена, включающий последовательность-мишень, комплементарную домену нацеливания третьей молекулы gРНК, был сокращен или удален.

[00119] В другом *аспекте изобретения, предоставляется* способ обеспечения иммунотерапии у субъекта, способ включает введение субъекту эффективного количества клетки, как описано в данном документе, например, клетки по любому из вышеупомянутых аспектов и вариантов воплощения изобретения.

[00120] В вариантах воплощения способов, способ включает введение лимфодеплецирующего агента или иммунодепрессанта перед введением субъекту эффективного количества клетки, как описано в данном документе, например клетки любого из вышеупомянутых клеточных аспектов и вариантов воплощения. В другом аспекте настоящее изобретение, составляет способ получения клеток (например, популяции клеток).

[00121] Иммунотерапия является лечением заболевания путем активации или подавления иммунной системы. Иммунотерапия, предназначенная для вызова или усиления иммунного ответа, классифицируется как активационная иммунотерапия. Доказана эффективность клеточной иммунотерапии при лечении некоторых видов рака. Иммунные эффекторские клетки, такие как лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры (NK-клетки) и/или цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), могут быть запрограммированы на действие в ответ на аномальные антигены, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток. Таким образом, иммунотерапия рака позволяет компонентам иммунной системы уничтожать опухоли или другие раковые клетки.

[00122] В другом аспекте изобретение обеспечивает способ подготовки клеток (например, популяции клеток) для иммунотерапии, способ, включающий: (а) модификацию клеток путем снижения или устранения экспрессии одного или более, или всех компонентов Т-клеточного рецептора (TCR), например, путем введения в указанные клетки молекулы gРНК (как описано в данном документе) или более чем одной молекулы gРНК, как описано в данном документе; и (б) расширение указанных клеток. Клетки изобретения подходят для дальнейшей инженерии, например путем введения гетерологичной последовательности, кодирующей полипептид, который опосредует передачу сигнала дзета-цепи TCR/CD3. В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептид представляет собой дикий тип или вариант TCR. Клетки изобретения также могут быть подходящими для дальнейшей инженерии путем введения гетерологичной

последовательности, кодирующей альтернативный антигенсвязывающий фрагмент, например, путем введения гетерологичной последовательности, кодирующей альтернативный (неэндогенный) Т-клеточный рецептор, например, химерные антигенные рецепторы (CAR), сконструированные для нацеливания на конкретный белок. CAR также известны как химерные иммунорецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или искусственные Т-клеточные рецепторы.

[00123] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нуждающегося субъекта, который включает введение клеток (например, популяции клеток), полученных способом получения клеток, описанным в данном документе, например, по любому из указанных выше аспектов и вариантов воплощения способов получения клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00124] ФИГ. 1 иллюстрирует уровень редактирования TRAC в клетках HEK-Cas9.

[00125] ФИГ. 2 иллюстрирует уровень редактирования TRAC в человеческих CD3⁺ Т-клетках.

[00126] ФИГ. 3 иллюстрирует количество экспрессии TCR после редактирования TRAC в человеческих CD3⁺ Т-клетках.

[00127] ФИГ. 4А-В иллюстрируют уровень редактирования TRBC в клетках HEK-Cas9. ФИГ. 4А иллюстрирует редактирование в TRBC1, а ФИГ. 4В иллюстрирует редактирование в TRBC2.

[00128] ФИГ. 5 иллюстрирует уровень редактирования TRBC в человеческих CD3⁺ Т-клетках.

[00129] ФИГ. 6 иллюстрирует количество экспрессии TCR после редактирования TRBC в CD3⁺ Т-клетках человека.

[00130] ФИГ. 7А-В иллюстрируют биохимический анализ нецелевых (измерение потенциальных нецелевых сайтов редактирования) для TRBC, TRAC и контрольных направляющих (SEQ ID №: 193 и 194).

[00131] ФИГ. 8А-Д иллюстрируют нокаут Т-клеточного рецептора и вставку конструкции TCR для получения отредактированных Т-клеток с TCR. На ФИГ. 8А показана эффективность нокаута Т-клеточного рецептора. ФИГ. 8В иллюстрирует эффективность лентивирусной трансдукции конструкции TCR. ФИГ. 8С иллюстрирует экспрессию вставки TCR в отредактированных Т-клетках. ФИГ. 8Д иллюстрирует фенотип Т-клеток, отредактированных TCR.

[00132] ФИГ. 9А-Д иллюстрируют способность Т-клеток со вставкой TCR убивать первичные бластные клетки AML. ФИГ. 9А-9С иллюстрируют результаты, полученные с первичными бластными клетками AML, полученными от 3 разных пациентов, несущих аллель HLA-A*02:01. ФИГ. 9Д иллюстрирует результаты применения контрольного образца: первичные бластные клетки, не несущие специфического аллеля HLA.

[00133] ФИГ. 10 иллюстрирует частоту редактирования, полученную при одновременном редактировании локусов TRAC и TRBC с применением нескольких

двойных направляющих РНК.

[00134] ФИГ. 11А-Д иллюстрируют результаты применения sgРНК, нацеленных на TRAC и TRBC, для комбинированного редактирования. ФИГ. 11А иллюстрирует эффективность нокаута Т-клеточного рецептора. ФИГ. 11В иллюстрирует лентивирусную трансдукцию конструкции HD1-TCR в клетках. ФИГ. 11С иллюстрирует экспрессию вставки TCR в отредактированные Т-клетки. ФИГ. 11D иллюстрирует фенотип отредактированных Т-клеток TCR.

[00135] ФИГ.12А-В иллюстрируют частоту редактирования, полученную одновременным редактированием локусов TRAC и TRBC с применением нескольких одиночных направляющих РНК. ФИГ. 12А иллюстрирует фенотипические изменения, процент CD3⁺ Т-клеток после редактирования локусов TRAC и TRBC. ФИГ. 11В иллюстрирует генотипические изменения, процент формирования инсерций в локусах TRAC и TRBC CD3⁺ Т-клетках человека.

[00136] ФИГ. 13А-В иллюстрируют уровень вставки GFP в локус TRAC с применением двойных направляющих РНК и вектора AAV (AV9) с шаблоном гэповой вставки (ФИГ.13А) и уровень нокаута TRAC с применением этих двойных направляющих РНК и вектора AAV, которые представляют CD3⁺ (ФИГ. 13В). Гэп шаблон вставки (или просто гэп шаблон) включает две последовательности которые фланкируют «Гэп», то есть область в соответствующей последовательности-мишени, не присутствующую в шаблоне гэп вставки. Гэп шаблон вставки совместим с направляющими, которые нацелены на сайт внутри гэпа для расщепления, и полезен для количественного сравнения таких направляющих, независимо от того, нацелены ли они на один и тот же сайт расщепления, при условии, что они оба нацелены на сайт расщепления в гэпе.

[00137] ФИГ. 14А-14В иллюстрируют уровень вставки GFP в локусе TRAC с sgРНК и гэп матрицей AV9 (ФИГ. 14А), а также процент клеток, сконструированных с применением этих sgРНК и гэп матрицы AV9, которые фенотипически являются CD3⁺ (ФИГ. 14В).

[00138] ФИГ. 15А-В сравнивают различных промоторов и инвертированных концевых повторов (ITR) для вставки TCR, измеренные по положительному окрашиванию тетрамера (ФИГ. 15А) и средней интенсивности флуоресценции (СИФ) (ФИГ. 15В) во время анализа FACS.

[00139] На ФИГ. 16А-С показано количество экспрессии GFP, вызванной эндогенным промотором TRAC в сконструированных клетках, с помощью протокола вставки с вставкой AAV конструкции GFP без промотора в локусе TRAC. ФИГ. 16А иллюстрирует имитационный контроль трансфекции (надпись является имитацией), ФИГ. 16В иллюстрирует RNP-комплекс, а ФИГ. 16С иллюстрирует RNP+AV10-EGFP. Ось X: выражено экспрессию GFP; Ось Y: экспрессия CD3ε; по данным FACS.

[00140] ФИГ. 17А-С иллюстрируют эффективность вставки матричной конструкции TCR с промоторными последовательностями и без них (PL - без промотора; EF1α - промотор EF1α или EF-1α) в локусе TRAC.

[00141] ФИГ. 18А-В измеряют дегрануляцию инсерционных трансформантов с промоторами и без них, содержащихся в трансформирующих конструкциях, с применением двух разных TCR.

[00142] ФИГ. 19А-В измеряют экспрессию гамма-интерферона в инсерционных трансформантах с промотором и без них, содержащихся в трансформирующих конструкциях, с применением двух разных TCR.

[00143] ФИГ. 20А-Д иллюстрируют присутствие на поверхности двух конструкций TCR, одна с модификациями Cys и одна без них.

[00144] ФИГ. 21А-В иллюстрируют уровень нарушения комплементарности между вставленными конструкциями цепей TCR и эндогенными TCR цепями, что измерено с помощью проточной цитометрии. Данные FACS на ФИГ. 21А и ФИГ. 21В иллюстрируют долю сконструированных клеток, экспрессирующих трансгенные или неправильно спаренные TCR, и интенсивность экспрессии TCR в сконструированных клетках ФИГ. 21А и ФИГ. 21В изображены как СИФ на ФИГ. 21С и ФИГ. 21D, соответственно.

[00145] ФИГ. 22 измеряет уровень неправильного спаривания между TCR цепями встроенных конструкций и эндогенных TCR цепей, измеренных с помощью проточной цитометрии в клетках CD8⁺ или CD4⁺.

[00146] На ФИГ. 23 показано окрашивание тетрамера VLD (опухолевый антиген Вильмса) для четырех различных версий TCR с нокаутом TRBC и без него, что указывает на уровень неправильного спаривания для WT1-TCR сконструированных клеток CD8⁺.

[00147] ФИГ. 24 иллюстрирует окрашивание тетрамера VLD (опухолевый антиген Вильмса) для четырех различных TCR с нокаутом TRBC и без него, что указывает на уровень нарушения комплементарности для WT1-TCR сконструированных клеток CD4⁺.

[00148] ФИГ. 25 иллюстрирует интенсивность экспрессии TCR в клетках CD8⁺ с четырьмя конструкциями TCR, вставленными в локус TRAC вместе с нокаутом TRBC, что измерено с помощью СИФ тетрамерного красителя.

[00149] ФИГ. 26 иллюстрирует интенсивность экспрессии TCR в клетках CD4⁺ с четырьмя конструкциями TCR, вставленными в локус TRAC вместе с нокаутом TRBC, что измерено с помощью СИФ тетрамерного красителя.

[00150] ФИГ. 27 иллюстрирует цитотоксичность Т-клеток, содержащих встроенные трансгенные TCR (AV11-TCR-A, AV13-TCR-B, AV12-TCR-C, которые также являются двойными нокаутами TRAC/TRBC или одиночными нокаутами TRAC. Цитотоксичность измеряли с помощью измерения флуоресценции для апоптотических клеток в ответ на 3/7 апоптотические клетки каспазы через 6 часов.

[00151] ФИГ. 28 иллюстрирует цитотоксичность Т-клеток, содержащих встроенные трансгенные TCR (AV11-TCR-A, AV14-TCR-F, AV15-TCR-G, AV16-TCR-H), которые также являются двойными нокаутами TRAC/TRBC или TRAC одиночными нокаутами. Цитотоксичность измеряли путем измерения флуоресценции апоптотических клеток в ответ на апоптотические клетки каспазы 3/7 через 6 часов.

[00152] ФИГ. 29А-Г иллюстрируют уровень пептид-специфической IL-2 секреции

для Т-клеток, содержащих вставленный трансгенный TCR (AV11-TCR-A, AV13-TCR-B, AV12-TCR-C, AV14-TCR-F, AV15-TCR-G, AV16-TCR-H), которые также являются двойными нокаутами TRAC/TRBC или одиночными нокаутами TRAC; как измерено с помощью ELISA.

[00153] ФИГ. 30A-D иллюстрируют уровень пептид-специфической секреции IFN- γ из Т-клеток, содержащих вставленный трансгенный TCR (AV11-TCR-A, AV14-TCR-F, AV15-TCR-G, AV16-TCR-H), которые также являются двойными нокаутами TRAC/TRBC или одиночными нокаутами TRAC; что измерено с помощью ELISA.

[00154] ФИГ. 31A-B иллюстрируют уровень пептид-специфического окрашивания IFN- γ в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, содержащих встроенные трансгенные (AV11-TCR-A, AV14-TCR-F, AV15-TCR-G, AV16-TCR-H), которые также являются двойными нокаутами TRAC/TRBC или одиночными нокаутами TRAC.

[00155] ФИГ. 32A-B иллюстрируют результаты анализа дегрануляции CD107a, демонстрирующие уровень аллореактивности CD4⁺ и CD8⁺ клеток с трансгенным TCR в локусе TRAC, где нативный TRAC нокаутирован, и в присутствии или в отсутствие нокаута TRBC (AV11-TCR-A, AV14-TCR-F, AV15-TCR-G, AV16-TCR-H). На ФИГ. 32A показан процент CD107a⁺ окрашенных клеток в CD8⁺ Т-клетках. ФИГ. 31B иллюстрирует процент окрашенных CD107a⁺ клеток в CD4⁺ Т-клетках.

[00156] ФИГ. 33A-D иллюстрируют результаты смешанной реакции лимфоцитов, демонстрирующие уровень аллореактивности клеток CD4⁺ и CD8⁺ с трансгенным TCR в локусе TRAC, где нативный TRAC нокаутирован в присутствии или в отсутствие нокаута TRBC. CTV, CellTrace Violet (ThermoFisher).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00157] Теперь будет сделана подробная ссылка на определенные варианты воплощения изобретения, примеры которых проиллюстрированы на прилагаемых чертежах. Хотя настоящие идеи описаны в связи с различными вариантами воплощения изобретения, они не предназначены для ограничения настоящих идей этими вариантами воплощения изобретения. Напротив, настоящее изобретение охватывает различные альтернативы, модификации и эквиваленты, что будет понятно специалистам в данной области техники.

[00158] Перед подробным описанием настоящих идей следует понимать, что изобретение не ограничивается конкретными композициями или стадиями процесса, поскольку таковые могут варьироваться. Следует отметить, что используемые в данной заявке и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа означают один или более, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на «конъюгат» включает множество конъюгатов, а ссылка на «клетку» включает множество клеток и т.п.

[00159] Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Измеренные и измеряемые значения считаются приблизительными с учетом значащих цифр и погрешности, связанной с измерением. Кроме того, применение слов «включать»,

«включает», «содержащий», «включать», «включает» и «включающий» не предназначено для ограничения. Следует понимать, что как вышеизложенное общее описание, так и подробное описание, являются только иллюстративными и пояснительными, и не ограничивают изобретение.

[00160] Если специально не указано в описании, варианты воплощения изобретения в описании, которые повторяют «содержащие» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие по существу из» перечисленных компонентов; варианты воплощения изобретения в описании, которые повторяют «состоящие из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие по существу из» перечисленных компонентов; и варианты воплощения изобретения в описании, которые повторяют «состоящие по существу из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» перечисленные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к применению этих терминов в формуле изобретения). Термин «или» используется в описании во включительном смысле, то есть эквивалентен «и/или», если контекст явно не указывает иное. Термин «приблизительно» когда он используется перед списком, изменяет каждый член списка.

[00161] Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и их никоим образом не следует истолковывать как ограничение желаемого предмета. В случае, если какой-либо материал, включенный посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в этой спецификации, или любому другому явному содержанию этой спецификации, данная спецификация имеет преимущественную силу.

I. Определения

[00162] Если не указано иное, следующие термины и фразы, используемые в данном документе, имеют следующие значения:

[00163] Термин «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота», используются в данной заявке, для обозначения мультимерного соединения, включающего нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, которые имеют азотистые гетероциклические основания или аналоги оснований, связанные вместе вдоль скелета, включая обычную РНК, ДНК, смешанную РНК-ДНК, и полимеры, являющиеся их аналогами. «Скелет» (“backbone”) нуклеиновой кислоты может состоять из множества связей, в том числе одной или более сахара-*фосфодиэфирных* связей, связей пептидо-нуклеиновой кислотой («пептидные нуклеиновые кислоты» или PNA; PCT No. WO 95/32305), фосфоротиоатных связей, метилфосфонатных связей или их комбинаций. Сахарные компоненты нуклеиновой кислоты могут быть рибозу, дезоксирибозу или аналогичные соединения с замещениями, например, 2' метокси или 2' галогенидные замены. Азотистые основания могут быть обычными основаниями (A, G, C, T, U), их аналогами (например, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин или N1-метилпсевдоуридин, или другие); инозин; производными пуринов или пиримидинов (например, N⁴-

метилдезоксигуанозин, деаза- или азапурины, деаза- или азапиримидины), пиримидиновыми основаниями с группами заместителей в 5-м или 6-м положении (например, 5-метилцитозин), пуриновыми основаниями с заместителем в положениях 2, 6 или 8, 2-амино-6-метиламинопурином, O⁶-метилгуанином, 4-тиопиримидинами, 4-аминопиримидинами, 4-диметилгидразин-пиримидинами и O⁴-алкил-пиримидинами; патент США № 5 378 825 и № WO 93/13121). Для общего обсуждения см. «Биохимия нуклеиновых кислот 5-36», Adams et al., Ed., 11th ed., 1992). Нуклеиновые кислоты могут включать одно или более азотистых оснований (“abasic” residues), где основная цепь не включает азотистого основания для положения(й) полимера (патент США № 5585481). Нуклеиновая кислота может включать только обычные сахара для РНК или ДНК, основания и связи, или могут включать как обычные компоненты, так и аналоги (например, обычные нуклеозиды с 2'-метоксизаместителями или полимеры, содержащие как обычные нуклеозиды, так и один или более аналогов нуклеозидов). Нуклеиновая кислота включает «заблокированную нуклеиновую кислоту» (LNA), аналог, содержащий один или более нуклеотидных мономеров LNA с бициклической единицей фуранозы заблокированной в конформации РНК, имитирующей сахар, что увеличивает сходство гибридизации к комплементарным последовательностям РНК и ДНК (Vester and Wengel, 2004, Biochemistry 43 (42): 13233-41). РНК и ДНК имеют разные сахарные компоненты и могут отличаться наличием урацила или его аналогов в РНК и тимина или его аналогов в ДНК.

[00164] «Направляющая РНК», «gРНК» и просто «направляющая» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения crРНК (также известной как CRISPR-РНК) или комбинации crРНК и trРНК (trRNA) (также известной как tracrRNA). crРНК и trРНК могут быть связаны как одна молекула РНК (единая направляющая РНК, sgРНК (sgRNA) или как две отдельные молекулы РНК (двойная направляющая РНК, dgRNA). «Направляющая РНК» или «gРНК» относится к каждому типу. trРНК может быть природной последовательностью или последовательностью trРНК с модификациями или вариациями по сравнению с встречающимися в природе последовательностями.

[00165] В данном документе «направляющая последовательность» относится к последовательности в направляющей РНК, которая комплементарна целевой последовательности и функционирует, чтобы направлять направляющую РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (например, расщепления) с помощью РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. «Направляющая последовательность» также может называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Направляющая последовательность может иметь длину 20 пар оснований, например, в случае *Streptococcus pyogenes* (т.е. Spy Cas9) и родственные гомологи/ортологи Cas9. Более короткие или более длинные последовательности также могут использоваться в качестве направляющих, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность включает по

меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-178. В некоторых вариантах воплощения изобретения целевая последовательность находится, например, в гене или хромосоме и комплементарна направляющей последовательности. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность включает последовательность с приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-178. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах воплощения изобретения, направляющая последовательность, и целевая область могут включать по меньшей мере одно несоответствие. Например, направляющая последовательность и целевая последовательность могут включать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, где общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность и целевая область могут включать 1-4 несовпадения, где направляющая последовательность включает по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность и целевая область могут включать 1, 2, 3 или 4 неправильных спариваний, где направляющая последовательность включает 20 нуклеотидов.

[00166] Последовательности-мишени для РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (т.е. заданную последовательность и *обратный комплимент последовательности*), поскольку субстратом нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента является двухцепочечная нуклеиновая кислота. Соответственно, когда говорится, что направляющая последовательность «комплементарна целевой последовательности», следует понимать, что направляющая последовательность может направлять направляющую РНК для связывания со смысловой или антисмысловой цепью (например, обратной комплементарной цепи) целевой последовательности. Таким образом, В некоторых вариантах воплощения изобретения, где направляющая последовательность связывает обратную комплементарную целевую последовательность, направляющая последовательность идентична определенным нуклеотидам целевой последовательности (например, целевая последовательность, не включающая РАМ), за исключением замены U на Т в направляющей последовательности.

[00167] Используемый в данной заявке, «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих РНК- и ДНК-связывающей активностью, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, где

ДНК-связывающая активность специфична для последовательности и зависит от последовательности РНК. Типичные ДНК-связывающие агенты, направляемые РНК, включают Cas-расщепление/никазы и их инактивированные формы («ДНК-связывающие агенты dCas»). «Cas-нуклеаза» используемая в данном документе, включает Cas-расщепление, Cas-никазы и агенты, связывающие ДНК dCas. В некоторых вариантах воплощения изобретения Cas-расщепление или Cas-никаза включают ДНК-связывающий агент dCas, модифицированный для обеспечения возможности расщепления ДНК, например через слияние с доменом FokI. Cas-расщепляющие/ никазы и dCas ДНК-связывающие агенты включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и класс 2 Cas нуклеазы. В данном контексте «нуклеаза Cas 2 класса» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью. Нуклеазы Cas 2 класса включают расщепление/никазы Cas 2 класса (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают РНК-направляемой ДНК-связывающей или никазной активностью, и ДНК-связывающие агенты класса 2 dCas, в которых активность расщепления/никазы инактивирована. Нуклеазы Cas класса 2 включают, например, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НупаCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9 (1.0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9 (1.1) (например, варианты K848A, K1003A, R1060A), протеины и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и включает RuvC-подобный домен нуклеазы. Последовательности Cpf1 Zetsche полностью включены в качестве ссылки.

См. например, Zetsche, Таблицы S1 и S3. См. например, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13 (11): 722-36 (2015); Шмаков и др., Molecular Cell, 60: 385-397 (2015).

[00168] Термин «рибонуклеопротеин» (RNP) или «комплекс RNP» используемый в данной заявке, относится к направляющей РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как нуклеаза Cas, например, расщепление Cas, Cas никаза или dCas ДНК-связывающий агент (например, Cas9). В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9, к целевой последовательности, а направляющая РНК гибридизируется с целевой последовательностью и агент связывается с ней; в случаях, когда агент представляет собой расщепление или никазу, за связыванием может следовать отщепление или надрезание.

[00169] Как используется в данном документе, первая последовательность считается «содержащей последовательность с по меньшей мере X% идентичности» второй последовательности, при совпадении первой последовательности со второй последовательностью становится ясно, что X% или более положений второй последовательности полностью совпадают с первой последовательностью. Например, последовательность AAGA включает последовательность со 100% идентичностью

последовательности AAG, поскольку выравнивание даст 100% идентичность в том смысле, что есть совпадения по всем трем положениям второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (обычно обмен уридина на тимидин или наоборот) и присутствие аналогов нуклеозидов, таких как модифицированные уридины, не влияют на различия в идентичности или комплементарности полинуклеотидов, если соответствующие нуклеотиды (такие как тимидин, уридин или модифицированный уридин) имеют один и тот же комплемент (например, аденозин для всех из тимидина, уридина или модифицированного уридина; другим примером является цитозин и 5-метилцитозин, оба из которых содержат гуанозин или модифицированный гуанозин в качестве дополнения). Таким образом, например, последовательность 5'-AXG, где X представляет собой любой модифицированный уридин, такой как псевдоуридин, N1-метил псевдоуридин или 5-метоксиуридин, считается на 100% идентичной AUG в том смысле, что оба они полностью комплементарны одной и той же последовательности (5'-CAU). Примерные алгоритмы сравнения представляют собой алгоритмы Смита - Уотермана и Нидлмана - Вунша, которые хорошо известны в данной области техники. Специалист в данной области техники поймет, какой выбор алгоритма и настроек параметров подходит для данной пары последовательностей, подлежащих выравниванию; для последовательностей в целом одинаковой длины и ожидаемой идентичности больше 50% для аминокислот или больше 75% для нуклеотидов алгоритм Нидлмана-Вунша с настройками по умолчанию интерфейса алгоритма Нидлмана-Вунша, предоставленными EBI на сайте www.ebi.ac.uk веб-сервера, как правило, подходит.

[00170] «иРНК» используется в данном документе для обозначения полинуклеотида, который включает открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (т.е. может служить субстратом для трансляции рибосомой и аминокислотами тРНК). иРНК может включать фосфатно-сахарный скелет, включая остатки рибозы или их аналоги, например, остатки 2'-метокси-рибозы. В некоторых вариантах воплощения изобретения сахара фосфатно-сахарного скелета иРНК состоят в основном из остатков рибозы, остатков 2'-метокси-рибозы или их комбинации.

[00171] Примерные направляющие последовательности, используемые в описанных в данном документе композициях и способах направляющих РНК, показаны в Таблицах 1, 2 и 3 и во всей заявке.

[00172] В контексте настоящего описания термин «инсерции» относится к инсерционным/ делеционным мутациям, состоящим из ряда нуклеотидов, которые либо вставлены, либо удалены в сайте двухцепочечных разрывов (DSB) в мишени-нуклеиновой кислоте.

[00173] Термин «нокдаун», используемый в данной заявке, относится к снижению экспрессии конкретного генного продукта (например, белка, иРНК или того и другого). Нокдаун белка может быть измерен путем определения общего количества белка клетки в интересующей ткани или популяции клеток. Способы измерения нокдауна иРНК известны и включают секвенирование иРНК, выделенной из представляющей интерес

ткани или популяции клеток. Анализ проточной цитометрии является известным способом измерения нокдауна экспрессии белка. В некоторых вариантах воплощения изобретения «нокдаун» может относиться к некоторой потере экспрессии конкретного генного продукта, например, к уменьшению количества транскрибируемой иРНК или уменьшению количества белка, экспрессируемого популяцией клеток. В некоторых вариантах воплощения изобретения «нокдаун» может относиться к некоторой потере экспрессии продукта конкретного гена, например, продукта гена TRAC или TRBC на поверхности клетки.

[00174] Термин «нокаут», используемый в данной заявке, относится к потере экспрессии определенного белка в клетке. Нокаут может быть измерен путем определения общего количества белка в клетке, ткани или популяции клеток. В некоторых вариантах воплощения способов изобретения «нокаут» TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в одной или более клеток (например, в популяции клеток). В некоторых вариантах воплощения изобретения нокаут представляет собой полную потерю экспрессии белкового компонента Т-клеточного рецептора (например, TRBC1, TRBC2 и/или TRAC) в клетке, а не образование мутантного белка Т-клеточного рецептора.

[00175] Используемые в данном документе термины «TRBC1» и «TRBC2» относятся к двум гомологичным генам, кодирующим β -цепь Т-клеточного рецептора, которые являются генными продуктами генов TRBC1 или TRBC2.

[00176] «TRBC» используется в данном документе для обозначения TRBC1 и TRBC2.

[00177] Последовательность TRBC1 человека дикого типа доступна на NCBI Gene ID: 28639; Ensembl: ENSG00000211751. Бета-константа Т-клеточного рецептора, продукт трансляции V_сегмента, BV05S1J2.2, TCRBC1 и TCRB являются синонимами для генов TRBC1.

[00178] Последовательность TRBC2 человека дикого типа доступна NCBI Gene ID: 28638; Ensembl: ENSG00000211772. Бета-константа Т-клеточного рецептора, продукт трансляции V_сегмента и TCRBC2 являются синонимами генов TRBC2.

[00179] Последовательность TRAC человека дикого типа доступна по адресу NCBI Gene ID: 28755; Ensembl: ENSG00000277734. Альфа-константа Т-клеточного рецептора, TCRA, IMD7, TRCA и TRA являются синонимами генов TRAC.

[00180] Опухолевый белок Вильмса (также иногда называемый опухолевым антигеном Вильмса) представляет собой белок, который кодируется геном WT1. Последовательность WT1 человека дикого типа доступна по адресу NCBI Gene ID: 7490; Ensembl: ENSG00000184937. GUD, AWT1, WAGR, WT33, NPHS4 и WIT-2 являются синонимами генов WT1. Сообщалось, что опухолевый белок Вильмса экспрессируется при различных раковых заболеваниях, включая солидные опухоли (включая, помимо прочего, опухоль Вильмса) и гематологические раковые заболевания, а также в опухолевых эндотелиальных клетках сосудов и гемопоэтических клетках-предшественниках.

[00181] В данном контексте «последовательность-мишень» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в гене-мишени, которая комплементарна направляющей последовательности gРНК. Взаимодействие целевой последовательности и направляющей последовательности заставляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент связываться и потенциально разрывать или расщеплять (в зависимости от активности агента) внутри целевой последовательности.

[00182] В данном контексте «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта и включает ингибирование заболевания, остановку его развития, облегчение одного или более симптомов заболевания, излечение заболевания, или предотвращение повторного появления одного или более симптомов заболевания.

[00183] Термин «примерно» или «приблизительно» означает допустимую ошибку для конкретного значения, определяемую специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как значение измеряется или определяется.

II. Композиции

A. Композиции, содержащие направляющую РНК (gРНК)

[00184] В данном документе представлены композиции, пригодные для изменения последовательности ДНК, например индуцирования одноцепочечного (SSB) или двухцепочечного разрыва (DSB) в генах TRBC и/или TRAC, например, с применением направляющей РНК с агентом связывания ДНК, направляемым РНК (например, системой CRISPR/Cas). В вариантах воплощения изобретения композиции полезны для изменения последовательности TRAC и/или TRBC и дополнительной вставки гена TCR.

[00185] В некоторых вариантах воплощения изобретения изменение последовательности TRAC и/или TRBC и дальнейшая вставка гена TCR преимущественно снижает количество ошибок спаривания TRAC и/или TRBC по сравнению с контролем, например контролем, в котором TRAC и/или TRBC не изменены. Например, изменение последовательности TRBC (например, отключение TRBC) и дальнейшая вставка гена TCR может преимущественно уменьшить количество ошибок спаривания между вставленным TCR и нативным TRBC. Или изменение последовательности TRAC (например, отключение TRAC) и дальнейшая вставка гена TCR может преимущественно уменьшить количество ошибок спаривания между вставленным TCR и нативным TRAC. Направляющие последовательности, нацеленные на ген TRBC, показаны в Таблице 1 под SEQ ID №: 1-89. Направляющие последовательности, нацеленные на ген TRAC, показаны в Таблице 2 под SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218.

[00186] В вариантах воплощения изобретения направляющие последовательности комплементарны соответствующей геномной области, показанной в таблицах ниже, в соответствии с координатами из эталонной последовательностью генома человека hg38. Направляющие последовательности дополнительных вариантов воплощения могут быть комплементарными последовательностями в непосредственной близости от геномной координаты, указанной в любой из Таблиц 1, 2 и/или 3. Например, направляющие

последовательности дополнительных вариантов воплощения могут быть комплементарными последовательностям, которые содержат 15 последовательных нуклеотидов $\pm$ 10 нуклеотидов координат генома, представленных в любой из Таблиц 1, 2 и/или 3.

[00187] Каждая из направляющих последовательностей, показанных в Таблице 1 и Таблице 2 в SEQ ID №: 1-89, 90-178, 185 и 213-218, может дополнительно включать дополнительные нуклеотиды для образования sgPHK, например, со следующей приблизительной нуклеотидной последовательностью, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID № 400) в ориентации от 5' до 3'. В случае sgPHK направляющие последовательности могут дополнительно включать дополнительные нуклеотиды для образования sgPHK, например, со следующей иллюстративной нуклеотидной последовательностью, следующей за 3'-концом направляющей последовательности:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC
UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID № 401) в ориентации от 5' до 3'. Направляющие последовательности могут дополнительно включать дополнительные нуклеотиды для формирования sgPHK, например, содержащие следующую иллюстративную нуклеотидную последовательность, следующую за 3'-концом направляющей последовательности:
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID №: 402) в ориентации от 5' до 3'.

[00188] Таблица 1: Целевые и направляющие последовательности TRBC и хромосомные координаты

SEQ ID №	Направляющая последовательность	Геномные координаты (hg38)
1	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG	chr7:142791996-142792016
2	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU	chr7:142792047-142792067
3	AUGACGAGUGGACCCAGGAU	chr7:142792008-142792028
4	AGAAGGUGGCCGAGACCCUC	chr7:142791931-142791951
5	UGAGGGUCUCGGCCACCUUC	chr7:142791930-142791950
6	AGAGAUCCCCACACCCAAA	chr7:142791748-142791768
7	UGGCUCAAACACAGCGACCU	chr7:142791720-142791740
8	GGCGCUGACGAUCUGGGUGA	chr7:142792041-142792061
9	UGGCAGACAGGACCCCUUGC	chr7:142802114-142802134
10	UGACGAGUGGACCCAGGAUA	chr7:142792009-142792029
11†	AGACAGGACCCCUUGCUGGU	chr7:142792697-142792717
12	UUGACAGCGGAAGUGGUUGC	chr7:142791963-142791983

13	CGUAGAACUGGACUUGACAG	chr7:142791976-142791996
14	CGCUGUCAAGUCCAGUUCUA	chr7:142791974-142791994
15	ACUGGACUUGACAGCGGAAG	chr7:142791970-142791990
16	GUUGCGGGGGUUCUGCCAGA	chr7:142791948-142791968
17	CUGCCUGAGCAGCCGCCUGA	chr7:142791913-142791933
18	GACAGCGGAAGUGGUUGCGG	chr7:142791961-142791981
19	CCACUCACCUGCUCUACCCC	chr7:142792068-142792088
20	GCUGUCAAGUCCAGUUCUAC	chr7:142791975-142791995
21	ACACUGGUGUGCCUGGCCAC	chr7:142791773-142791793
22	AGACCCUCAGGCGGCUGCUC	chr7:142791919-142791939
23	AUGGGAAGGAGGUGCACAGU	chr7:142791834-142791854
24	AGGGCGGGCUGCUCCUUGAG	chr7:142791878-142791898
25	UCCCUAGCAAGAUCUCAUAG	chr7:142802141-142802161
26†	GGUGCACAGUGGGGUCAGCA	chr7:142791844-142791864
27	CCAGCUCAGCUCCACGUGGU	chr7:142801154-142801174
28	CCGCAACCACUUCCGCUGUC	chr7:142791961-142791981
29	GUCCACUCGUCAUUCUCCGA	chr7:142792001-142792021
30	GCCCGUAGAACUGGACUUGA	chr7:142791979-142791999
31	UCACCCAGAUCGUCAGCGCC	chr7:142792041-142792061
32	GGGUCCACUCGUCAUUCUCC	chr7:142792003-142792023
33	UCCAGUUCUACGGGCUCUCG	chr7:142791984-142792004
34	CGGAGAAUGACGAGUGGACC	chr7:142792002-142792022
35	ACCACUUCCGCUGUCAAGUC	chr7:142791966-142791986
36	AAUGACGAGUGGACCCAGGA	chr7:142792007-142792027
37	ACGGGCUCUCGGAGAAUGAC	chr7:142791993-142792013
38	GACUCCAGAUACUGCCUGAG	chr7:142791902-142791922
39	CGCUGUGUUUGAGCCAUCAG	chr7:142791724-142791744
40	AGAACUGGACUUGACAGCGG	chr7:142791973-142791993
41	GAGACCCUCAGGCGGCUGCU	chr7:142791920-142791940
42	CGUCAUUCUCCGAGAGCCCG	chr7:142791994-142792014
43	CAGCCCGCCCUCAAUGACUC	chr7:142791887-142791907
44	GGCUGCUCAGGCAGUAUCUG	chr7:142791907-142791927
45	AGUGGUUGCGGGGGUUCUGC	chr7:142791952-142791972
46	GGUCGCUGUGUUUGAGCCAU	chr7:142791721-142791741

47	GAUCUCAUAGAGGAUGGUGG	chr7:142792718-142792738
48	UGUUUGAGCCAUCAGAAGCA	chr7:142791729-142791749
49	UACUGCCUGAGCAGCCGCCU	chr7:142791911-142791931
50	ACCCGCAGCCCCUCAAGGAG	chr7:142791867-142791887
51	AGGCAGUAUCUGGAGUCAUU	chr7:142791899-142791919
52	UGUGUUUGAGCCAUCAGAAG	chr7:142791727-142791747
53	GGUUGCGGGGGUUCUGCCAG	chr7:142791949-142791969
54	GGGUCUCGGCCACCUUCUGG	chr7:142791933-142791953
55	CAGAAGGUGGCCGAGACCCU	chr7:142791932-142791952
56	CGCCGAGGCCUGGGGUAGAG	chr7:142792057-142792077
57	GGUUCUGCCAGAAGGUGGCC	chr7:142791940-142791960
58	CAGAGAUCUCCCACACCCAA	chr7:142791747-142791767
59	UUGAGGGCGGGCUGCUCUU	chr7:142791881-142791901
60	AAGCCUGUGGCCAGGCACAC	chr7:142791779-142791799
61	CAGCGCCGAGGCCUGGGGUA	chr7:142792054-142792074
62	CCCACUCACCUGCUCUACCC	chr7:142792069-142792089
63	UGUCUGCCACCAUCCUCUAU	chr7:142792712-142792732
64	UGCUUCUGAUGGCUCAAACA	chr7:142791729-142791749
65	UUCCCAUUCACCCACCAGCU	chr7:142791821-142791841
66	GUCAGCGCCGAGGCCUGGGG	chr7:142792052-142792072
67	CCCUCAGGCGGCUGCUCAGG	chr7:142791916-142791936
68	AAUGACUCCAGAUACUGCCU	chr7:142791899-142791919
69	CACACUGGUGUGCCUGGCCA	chr7:142791772-142791792
70	UCAUAGAGGAUGGUGGCAGA	chr7:142792714-142792734
71	CACCCAGAUCGUCAGCGCCG	chr7:142792042-142792062
72	UGACAGCGGAAGUGGUUGCG	chr7:142791962-142791982
73	UCUCCGAGAGCCCGUAGAAC	chr7:142791988-142792008
74	AGUCCAGUUCUACGGGCUCU	chr7:142791982-142792002
75	AUCGUCAGCGCCGAGGCCUG	chr7:142792049-142792069
76	AAGGAGGUGCACAGUGGGGU	chr7:142791839-142791859
77	UAUCUGGAGUCAUUGAGGGC	chr7:142791893-142791913
78	GCGGGGGUUCUGCCAGAAGG	chr7:142791945-142791965
79	CUUGACAGCGGAAGUGGUUG	chr7:142791964-142791984
80	GUGUGGCCUUUUGGGUGUGG	chr7:142791757-142791777

81	GAUCGUCAGCGCCGAGGCCU	chr7:142792048-142792068
82	UGUGGCCAGGCACACCAGUG	chr7:142791774-142791794
83	AGGCCUCGGCGCUGACGAUC	chr7:142792048-142792068
84	GUGAAUGGGAAGGAGGUGCA	chr7:142791830-142791850
85	GCGGCUGCUCAGGCAGUAUC	chr7:142791909-142791929
86	ACUGCCUGAGCAGCCGCCUG	chr7:142791912-142791932
87	AAAGGCCACACUGGUGUGCC	chr7:142791766-142791786
88	UGAGGGCGGGCUGCUCCUUG	chr7:142791880-142791900
89	GAGCAGCCGCCUGAGGGUCU	chr7:142791919-142791939

Каждая из этих направляющих последовательностей обычно нацелена на оба гена TRBC1 и TRBC2, со следующими исключениями, которые отмечены следующим образом:

† SEQ ID №: 11 и 26 специфически нацелены на TRBC1.

[00189] Таблица 2: Последовательности TRAC целевой и контрольной направляющей, и хромосомные координаты

SEQ ID №	Направляющая последовательность	Геномные координаты (hg38)
90	CUCUCAGCUGGUACACGGCA	chr14:22547524-22547544
91	UUCGGAACCCAAUCACUGAC	chr14:22550581-22550601
92	UAAACCCGGCCACUUUCAGG	chr14:22550608-22550628
93	GAUUAAACCCGGCCACUUUC	chr14:22550611-22550631
94	CGUCAUGAGCAGAUUAAACC	chr14:22550622-22550642
95	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	chr14:22547529-22547549
96	ACACGGCAGGGUCAGGGUUC	chr14:22547512-22547532
97	UCUCUCAGCUGGUACACGGC	chr14:22547525-22547545
98	UGGAUUUAGAGUCUCUCAGC	chr14:22547536-22547556
99	GAGAAUCAAAAUCGGUGAAU	chr14:22547575-22547595
100	ACAAAACUGUGCUAGACAUG	chr14:22547640-22547660
101	UGUGCUAGACAUGAGGUCUA	chr14:22547647-22547667
102	GCACCAAAGCUGCCCUUACC	chr14:22547777-22547797
103	AAGUUCUGUGAUGUCAAGC	chr14:22549638-22549658
104	CUCGACCAGCUUGACAUCAC	chr14:22549646-22549666
105	AUCCUCCUCCUGAAAGUGGC	chr14:22550600-22550620
106	ACCCGGCCACUUUCAGGAGG	chr14:22550605-22550625
107	UUAACUCGCUCAUGACGCUG	chr14:22550625-22550645
108	ACACGGAUGAACAUAAGGC	chr14:22539116-22539136
109	ACUACACGGAUGAACAUA	chr14:22539120-22539140

110	GCUGGUACACGGCAGGGUCA	chr14:22547518-22547538
111	GGAAGCUACAUACCUACAUI	chr14:22539082-22539102
112	UCCUCACUGUGUGCAUCAGG	chr14:22539061-22539081
113	CUGGUUCCUCUUCCAAUGU	chr14:22539097-22539117
114	AAAGUCAGAUUUGUUGCUCC	chr14:22547697-22547717
115	UUCAAAACCUUGUCAGUGAUU	chr14:22550571-22550591
116	UGCUC AUGACGCUGCGGCUG	chr14:22550631-22550651
117	UCAAGGCCCCUCACCUCAGC	chr14:22550658-22550678
118	GGCGUUUGCACAUGCAAAGU	chr14:22547712-22547732
119	GACCACAGCCGCAGCGUCAU	chr14:22550636-22550656
120	AUGACGCUGCGGCUGUGGUC	chr14:22550636-22550656
121	AUUCGGAACCCAAUCACUGA	chr14:22550582-22550602
122	AACCCGGCCACUUCAGGAG	chr14:22550606-22550626
123	UUAAACCCGGCCACUUCAG	chr14:22550609-22550629
124	AGAUUUGUUGCUCCAGGCCA	chr14:22547691-22547711
125	UGAGAAUCAAUAUCGGUGAA	chr14:22547576-22547596
126	GAUGUCAAGCUGGUCGAGAA	chr14:22549648-22549668
127	GUUUCAAAGCUUUCUCGAC	chr14:22549660-22549680
128	UGAAGGCGUUUGCACAUGCA	chr14:22547716-22547736
129	ACCCUGACCCUGCCGUGUAC	chr14:22547514-22547534
130	AGCUUCAAGGCCCCUCACCU	chr14:22550662-22550682
131	GUUCCGAAUCCUCCUCCUGA	chr14:22550593-22550613
132	AGAUUAAACCCGGCCACUUU	chr14:22550612-22550632
133	CCCUGCCGUGUACCAGCUGA	chr14:22547521-22547541
134	UCACUGGAUUUAGAGUCUCU	chr14:22547540-22547560
135	UACUUACACGGAUGAACAAU	chr14:22539121-22539141
136	UAUCACAGACAAAACUGUGC	chr14:22547632-22547652
137	CCACAGCACUGUUGCUCUUG	chr14:22547674-22547694
138	CCUGUGAUGUCAAGCUGGUC	chr14:22549643-22549663
139	ACAUGAGGUCUAUGGACUUC	chr14:22547655-22547675
140	ACUGUUGCUCUUGAAGUCCA	chr14:22547667-22547687
141	AGCUACAUACCUACAUIUGG	chr14:22539085-22539105
142	UAGAAAGUCCUGUGAUGUC	chr14:22549634-22549654
143	UCACUGUGUGCAUCAGGAGG	chr14:22539064-22539084

144	GACAAAACUGUGCUAGACAU	chr14:22547639-22547659
145	CUUCAACAACAGCAUUAUUC	chr14:22547731-22547751
146	CAACAACAGCAUUAUUCCAG	chr14:22547734-22547754
147	UCUCAAAACAAAUGUGUCACA	chr14:22547591-22547611
148	AUGAGGUCUAUGGACUUCAA	chr14:22547657-22547677
149	GACCCUGCCGUGUACCAGCU	chr14:22547519-22547539
150	CCCCUGUCUUAACUGUUUCA	chr14:22549674-22549694
151	AGCAACAGUGCUGUGGCCUG	chr14:22547678-22547698
152	CUACAUACCUACAUUUGGAA	chr14:22539087-22539107
153	ACUUUGUGACACAUUUGUUU	chr14:22547595-22547615
154	AUCACAGACAAAACUGUGCU	chr14:22547633-22547653
155	UUCAACAACAGCAUUAUUCC	chr14:22547732-22547752
156	CAUGAGGUCUAUGGACUUCA	chr14:22547656-22547676
157	GCUACAUACCUACAUUUGGA	chr14:22539086-22539106
158	CUCUUGUCCCACAGAUAUCC	chr14:22547491-22547511
159	GAUUCUGAUGUGUAUAUCAC	chr14:22547618-22547638
160	CUGUGAUGUCAAGCUGGUCG	chr14:22549644-22549664
161	CCUGCCGUGUACCAGCUGAG	chr14:22547522-22547542
162	ACAUACCUACAUUUGGAAGA	chr14:22539089-22539109
163	CCUCACUGUGUGCAUCAGGA	chr14:22539062-22539082
164	ACAAAUGUGUCACAAAGUAA	chr14:22547597-22547617
165	GAGCAACAGUGCUGUGGCCU	chr14:22547677-22547697
166	UCGACCAGCUUGACAUCACA	chr14:22549645-22549665
167	AUUAACCCGGCCACUUUCA	chr14:22550610-22550630
168	CACGGCAGGGUCAGGGUUCU	chr14:22547511-22547531
169	AAACCCGGCCACUUUCAGGA	chr14:22550607-22550627
170	CAAGGCCCCUCACCUCAGCU	chr14:22550657-22550677
171	CCCGGCCACUUUCAGGAGGA	chr14:22550604-22550624
172	CAUUUCUAUAAUACUUACAC	chr14:22539132-22539152
173	ACAGCCGCAGCGUCAUGAGC	chr14:22550632-22550652
174	AUCAAAAUCGGUGAAUAGGC	chr14:22547571-22547591
175	GCGUUUGCACAUGCAAAGUC	chr14:22547711-22547731
176	CUGUUGCUCUUGAAGUCCAU	chr14:22547666-22547686
177	AAAUUCGGUGAAUAGGCAGAC	chr14:22547567-22547587

178	UUGUCUGUGAUUAUACACAUC	chr14:22547624-22547644
185	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGU	chr14:22547501-22547521
213	AGCUGGUACACGGCAGGGUC	chr14:22547519-22547539
214	UAGGCAGACAGACUUGUCAC	chr14:22547556-22547576
215	UCUGUGGGACAAGAGGAUCA	chr14:22547486-22547506
216	AUCUGUGGGACAAGAGGAUC	chr14:22547487-22547507
217	CUGGAUAUCUGUGGGACAAG	chr14:22547493-22547513
218	GUCAGGGUUCUGGAUAUCUG	chr14:22547502-22547522

[00190] Таблица 3: Последовательности *sgPHK*, номенклатура и подпоследовательности компонентов

SEQ ID №	sgPHK последовательность	Геномные координаты (hg38)
179	GGCUCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142791996- 142792016
180	GGCCUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142792047- 142792067
181	AUGACGAGUGGACCCAGGAUGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142792008- 142792028
182	AGAAGGUGGCCGAGACCCUCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142791931- 142791951
183	UGAGGGUCUCGGCCACCUUCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142791930- 142791950
184	AGAGAUCUCCACACCCAAAGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG	chr7:142791748- 142791768

	AGUCGGUGCUUUU	
186	CUCUCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr14:22547529- 22547549
187	UUCGGAACCCAAUCACUGACGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr14:22550611- 22550631
188	UAAACCCGGCCACUUUCAGGGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr14:22547501- 22547521
189	GAUUAAACCCGGCCACUUUCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr14:22550608- 22550628
190	CGUCAUGAGCAGAUUAAACCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr14:22547529- 22547549
191	AGAGUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr14:22547524- 22547544
192	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGUGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr14:22550622- 22550642
193	mG*mA*mG*UCCGAGCAGAAGAAGAAGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm	chr2:72933852-72933872

	U*mU*mU*mU	
194	mG*mA*mC*CCCCUCCACCCCGCCUCGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr6:43770821-43770841
195	AACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUUUU	chr14:22550581- 22550601
196	GGCUCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142791996- 142792016
197	GGCCUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142792047- 142792067
198	AUGACGAGUGGACCCAGGAUGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142792008- 142792028
199	UGAGGGUCUCGGCCACCUUCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142791930- 142791950
200	AGAGAUCUCCACACCCAAAGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr7:142791748- 142791768
201	mA*mC*mA*CGGCAGGGUCAGGGUUCGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm	chr14:22547512- 22547532

	AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	
202	mA*mG*mC*UGGUACACGGCAGGGUCGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr14:22547519- 22547539
203	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr14:22547524- 22547544
204	mU*mC*mU*CUCAGCUGGUACACGGCGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr14:22547525- 22547545
205	mU*mG*mG*AUUUAGAGUCUCUCAGCGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr14:22547536- 22547556
206	mU*mA*mG*GCAGACAGACUUGUCACGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr14:22547556- 22547576
207	mU*mC*mU*GUGGGACAAGAGGAUCAGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC	chr14:22547486- 22547506

	AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	
208	mA*mU*mC*UGUGGGACAAGAGGAUCGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr14:22547487- 22547507
209	mC*mU*mG*GAUAUCUGUGGGACAAGGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr14:22547493- 22547513
210	mG*mU*mC*AGGGUUCUGGAUAUCUGGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr14:22547502- 22547522
211	mU*mC*mA*GGGUUCUGGAUAUCUGUGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	chr14:22547501- 22547521
212	UAGGCAGACAGACUUGUCACGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU	chr14:22547556- 22547576

* = PS связь; m=2'-O-Me нуклеотид; N=любой природный или неприродный нуклеотид

[00191] В некоторых вариантах воплощения изобретения предлагается композиция,

содержащая одну или более направляющих РНК (gРНК), содержащих направляющие последовательности, которые направляют РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может быть нуклеазой (например, нуклеазой Cas, такой как Cas9), к целевой последовательности ДНК в TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. gРНК может включать направляющую последовательность, показанную в Таблицах 1 или 2. В вариантах воплощения изобретения gРНК включает следующую последовательность: (N)_xGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGC (SEQ ID № 403) где «N» может быть любым природным или неприродным нуклеотидом, и где совокупность N включает направляющую последовательность TRBC или TRAC, как описано в данном документе. gРНК может включать сгРНК, содержащую направляющую последовательность, перечисленную в Таблицах 1-3. gРНК может включать сгРНК, содержащую 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности, показанной в Таблицах 1 и 2. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК включает сгРНК, содержащую последовательность с приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности, показанной в Таблицах 1 и 2. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК включает сгРНК, содержащую последовательность с приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с направляющей последовательностью, показанной в Таблицах 1 и 2. gРНК может дополнительно включать трРНК. В каждом варианте воплощения, описанном в данном документе, сгРНК и трРНК могут быть связаны как одна РНК (sgРНК) или могут находиться на отдельных РНК (dgRNA). В контексте sgРНК компоненты сгРНК и трРНК могут быть связаны ковалентно, например, через фосфодиэфирную связь или другую ковалентную связь.

[00192] В каждом варианте воплощения, описанном в данном документе, направляющая РНК может включать две молекулы РНК в виде «двойной-РНК-направляющей» или «dgRNA». dgRNA включает первую молекулу РНК, содержащую сгРНК, содержащую, например, направляющую последовательность, показанную в Таблицах 1 и 2, и вторую молекулу РНК, содержащую трРНК. Первая и вторая молекулы РНК могут не быть связаны ковалентно, но могут образовывать дуплекс РНК через спаривание оснований между частями сгРНК и трРНК.

[00193] В каждом варианте воплощения, описанном в данном документе, направляющая РНК может включать единственную молекулу РНК в виде «одиночной направляющей РНК» или «сгРНК». sgРНК может включать сгРНК (или ее часть), содержащую направляющую последовательность, показанную в Таблицах 1 и 2, ковалентно связанную с трРНК. сгРНК может включать 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности, показанной в Таблицах 1 и 2. В некоторых вариантах воплощения изобретения сгРНК и трРНК ковалентно связаны через линкер. В некоторых вариантах воплощения изобретения сгРНК образует структуру

«стержень-петля» за счет спаривания оснований между частями sgРНК и trРНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК и trРНК ковалентно связаны через одну или более связей, которые не являются фосфодиэфирной связью.

[00194] В некоторых вариантах воплощения изобретения trРНК может включать всю или часть последовательности trРНК, полученной из естественной системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения trРНК включает *процессированную* или модифицированную trРНК дикого типа. Длина trРНК зависит от используемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения trРНК включает или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения trРНК может включать определенные вторичные структуры, такие как, например, одна или более шпилек или структур стержень-петля, или одна или более структур выпуклости.

[00195] В некоторых вариантах воплощения изобретения предлагается композиция, содержащая одну или более направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность любой из SEQ ID №: 1-89 и 90-178.

[00196] В некоторых вариантах воплощения изобретения предлагается композиция, содержащая одну или более sgРНК, содержащих любую из SEQ ID №: 179-184.

[00197] В одном аспекте изобретение обеспечивает композицию, содержащую gРНК, которая включает направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или на 90% идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID №: 1-89, 90-178, 185 и 213-218.

[00198] В других вариантах воплощения изобретения, композиция включает по меньшей мере одну, например, по меньшей мере две gРНК, содержащие направляющие последовательности, выбранные из любых двух или более направляющих последовательностей SEQ ID №: 1-89, 90-178, 185 и 213-218. В некоторых вариантах воплощения композиция включает по меньшей мере две gРНК, каждая из которых включает направляющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% любой SEQ ID №: 1-89, 90-178, 185 и 213-218.

[00199] Композиции направляющих РНК данного изобретения предназначены для распознавания (например, гибридизации с) целевой последовательности в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. Например, последовательность-мишень TRBC1, TRBC2 и/или TRAC может распознаваться и расщепляться с помощью нуклеазы Cas, содержащей направляющую РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas, может быть направлен направляющей РНК к целевой последовательности генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, где направляющая последовательность направляющей РНК гибридизуется с последовательностью-мишенью и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как нуклеаза Cas, расщепляет последовательность-мишень.

[00200] В некоторых вариантах воплощения изобретения выбор одной или более направляющих РНК определяется на основе целевых последовательностей в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

[00201] Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, мутации (например, мутации со сдвигом рамки считывания, возникающие в результате делеций/вставок, при опосредованном действии нуклеаз DSB) в некоторых областях гена могут быть менее переносимыми, чем мутации в других областях гена, таким образом, расположение двухцепочечных разрывов (DSB) является важным фактором, определяющим количество или тип нокдауна белка, который может произойти.

В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК, комплементарная или имеющая комплементарность к последовательности-мишени в TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, используется для направления РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в конкретное место в соответствующем гене TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК конструируются так, чтобы иметь направляющие последовательности, которые комплементарны или имеют комплементарность к целевым последовательностям в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3 или экзоне 4 TRBC1 и/или TRBC2, и/или последовательностям-мишеням в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3 или экзоне 4 TRAC.

[00202] В некоторых вариантах воплощения изобретения, направляющая последовательность по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична целевой последовательности, присутствующей в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC человека. В некоторых вариантах воплощения изобретения целевая последовательность может быть комплементарна направляющей последовательности направляющей РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью направляющей РНК и ее соответствующей целевой последовательностью может составлять не менее 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах воплощения изобретения целевая последовательность и направляющая последовательность gРНК могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах воплощения, целевая последовательность и направляющая последовательность gРНК могут включать, по меньшей мере одну ошибку спаривания.

Например, целевая последовательность и направляющая последовательность gРНК могут включать 1, 2, 3 или 4 ошибки спаривания, где общая длина направляющей последовательности равна 20. В некоторых вариантах воплощения изобретения целевая последовательность и направляющая последовательность gРНК могут включать 1-4 ошибки спаривания, где направляющая последовательность составляет 20 нуклеотидов.

[00203] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция или состав, раскрытые в данном документе, содержат иРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в данном документе. В некоторых вариантах воплощения

изобретения иРНК, содержащая ORF, кодирующий РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, предоставлена, используется или вводится.

В. Модифицированные gРНК и иРНК

[00204] В некоторых вариантах воплощения gРНК химически модифицирована. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК включает один или более модифицированных нуклеозидов, или нуклеотидов и может называться «модифицированной» gРНК или «химически модифицированной» gРНК, для описания присутствия одного или более неприродных и/или встречающихся в природе компонентов или конфигураций, которые используются вместо канонических остатков А, G, C и U или в дополнении к ним. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированная gРНК синтезирована с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, и в данном документе называется «модифицированная». Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать одну или более из следующего: (i) изменение, например, замена одного или обоих несвязывающихся атомов кислорода фосфата и/или одного или нескольких связывающих атомов кислорода фосфата в связи скелета сложного фосфодиэфира (иллюстративная модификация скелета); (ii) изменение, например, замена составляющей сахара рибозы, например, 2'-гидроксила в сахаре рибозы (иллюстративная модификация сахара); (iii) полная замена фосфатного фрагмента линкерами «дефосфо» (иллюстративная модификация скелета); (iv) модификация или замена встречающегося в природе азотистого основания, в том числе неканоническим азотистым основанием (иллюстративная модификация основания); (v) замена или модификация рибозо-фосфатного скелета (иллюстративная модификация скелета); (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца олигонуклеотида, например, удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгация фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3'-или 5'-кэпа могут включать сахар и/или модификацию скелета); и (vii) модификация или замена сахара (пример модификация сахара).

[00205] Химические модификации, такие как перечисленные выше, могут быть объединены для получения модифицированных gРНК и/или иРНК, содержащих нуклеозиды и нуклеотиды (вместе «остатки»), которые могут иметь две, три, четыре или более модификаций. Например, модифицированный остаток может иметь модифицированный сахар и модифицированное азотистое основание. В некоторых вариантах воплощения изобретения каждое основание gРНК модифицировано, например, все основания имеют модифицированную фосфатную группу, такую как *фосфоротиоатная* группа. В некоторых вариантах воплощения изобретения все или практически все фосфатные группы молекулы gРНК заменены фосфоротиоатными группами. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированные gРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 5'-конце РНК или рядом с ним. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированные gРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 3'-конце РНК или рядом с ним.

[00206] В некоторых вариантах воплощения gРНК включает один, два, три или более модифицированных остатков. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере 5% (например, по меньшей мере: 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%) положений в модифицированной gРНК представляют собой модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды.

[00207] Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены распаду, например, внутриклеточными нуклеазами или нуклеазами, обнаруженными в сыворотке крови. Например, нуклеазы могут гидролизовать сложные фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Соответственно, в одном аспекте описанные в данной заявке gРНК могут включать один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, например, для придания стабильности по отношению к внутриклеточным нуклеазам или нуклеазам сыворотки крови. В некоторых вариантах воплощения изобретения в данном документе описанные модифицированные молекулы gРНК могут проявлять снижение врожденного иммунного ответа при введении в популяцию клеток как *in vivo*, так и *ex vivo*. Термин «врожденный иммунный ответ» включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, включая одноцепочечные нуклеиновые кислоты, который включает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, особенно интерферонов, и гибель клеток.

[00208] В некоторых вариантах воплощения модификации основной цепи, фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или более атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированный остаток, например модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать полную замену немодифицированного фосфатного фрагмента модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения скелетная модификация фосфатного скелета может включать изменения, которые приводят либо к незаряженному линкеру, либо к заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

[00209] Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфатов, гидрофосфонаты, фосфороамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замена одного из атомов кислорода без образования мостиков одним из вышеуказанных атомов или групп атомов может сделать атом фосфора хиральным. Стереогенный атом фосфора может иметь конфигурацию «R» (в данном документе Rp) или конфигурацию «S» (в данном документе Sp). Скелет также можно модифицировать путем замены мостикового кислорода (то есть кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) азотом (мостиковые фосфорамидааты), серой (мостиковые фосфоротиоаты) и углеродом (мостиковые метиленфосфонаты). Замещение может происходить либо у связующего

атома кислорода, либо у обоих связывающих атомов кислорода.

[00210] Фосфатная группа может быть замещена на не фосфорсодержащие соединители в некоторых модификациях скелета. В некоторых вариантах воплощения изобретения заряженная фосфатная группа может быть замещена на нейтральный фрагмент. Примеры фрагментов, которые могут заменять фосфатную группу, могут включать, без ограничения, например, метилфосфонат, гидроксиламино, силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиозфир, линкер этиленоксида, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленметилямино, *метиленгидразо*, метилендиметилгидразо и метиленоксиметилямино.

[00211] Скаффолды, которые могут имитировать нуклеиновые кислоты, могут также быть сконструированы, где фосфатный остаток и сахар рибоза заменены на нуклеозидные или нуклеотидные аналоги, устойчивые к нуклеазам. Такие модификации могут включать модификации скелета и сахара. В некоторых вариантах воплощения изобретения азотистые основания могут быть связаны суррогатным скелетом. Примеры могут включать, без ограничения, суррогаты нуклеозидов морфолино, циклобутила, пирролидина и пептидной нуклеиновой кислоты (PNA).

[00212] Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды могут включать одну или более модификаций групп сахаров, то есть модификации сахара. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована, например, замещена разными заместителями «окси» или «дезоксид». В некоторых вариантах воплощения изобретения модификации 2'-гидроксильной группы могут повысить стабильность нуклеиновой кислоты, поскольку гидроксил больше не может быть депротонирован с образованием 2'-алкоксидного иона.

[00213] Примеры модификаций 2'-гидроксильных группах могут включать алкокси или арилокси (OR, где «R» может означать, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, где R может быть, например, H или необязательно замещенный алкил, а n может быть целым числом от 0 до 20 (например, от 0 до 4, от 0 до 8, от 0 до 10, от 0 до 16, от 1 до 4, от 1 до 8, от 1 до 10, от 1 до 16, от 1 до 20, от 2 до 4, от 2 до 8, от 2 до 10, от 2 до 16, от 2 до 20, от 4 до 8, от 4 до 10, от 4 до 16 и от 4 до 20). В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может быть 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может быть 2'-фтор модификацией, которая замещает 2'-гидроксильную группу фторидом. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать остаток запертой нуклеиновой кислоты (LNA), в котором 2'-гидроксил может быть связан, например, с помощью C_{1-6} -алкиленового или C_{1-6} -гетероалкиленового мостика с 4' атомом углерода того же сахара рибозы, где типичные мостики могут включать метиленовые, пропиленовые, простые эфирные или аминные мостики; О-амино (где амино может быть, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклилом, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамином или

полиамино) и аминоксис, $O(CH_2)_n$ -амино (где амино может быть, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино). В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы, может включать остаток незапертых нуклеиновых кислот (UNA), в которых рибозное кольцо лишено связи C2'-C3'. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, например, производное PEG).

00214] «Дезокси» 2' модификации могут включать водород (т.е. сахара дезоксирибозы, например, в выступающих частях частично dsPHK); галоген (например, бром, хлор, фтор или йод); амино (где амино может быть, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклилом, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислотой); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -амино (где амино может быть, например, таким, как описано в данном документе), $-NHC(O)R$ (где R может быть, например, алкилом, циклоалкилом, арилом, аралкилом, гетероарилом или сахаром), циано; меркапто; алкилтиоалкилом; тиаалкокси; и алкилом, циклоалкилом, арилом, алкенилом и алкинилом, которые могут быть необязательно замещены на, например, амино, как описано в данном документе.

[00215] Модификация сахара может включать группу сахара, которая также может содержать один или более атомов углерода, которые обладают стереохимической конфигурацией, противоположной конфигурации соответствующего углерода в рибозе.

Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может включать нуклеотиды, содержащие, например, арабинозу в качестве сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать сахара с удаленными основаниями. Эти сахара с удаленными основаниями также могут быть дополнительно модифицированы по одному или нескольким составляющим атомам сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать один или более сахаров в L-форме, например, L-нуклеозидов.

[00216] Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды, описанные в данном документе, которые могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут включать модифицированное основание, также называемое азотистым основанием. Примеры азотистых оснований включают, но не ограничиваются приведенным, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти азотистые основания могут быть модифицированы или полностью заменены для получения модифицированных остатков, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты.

Азотистое нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть независимо выбрано из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах воплощения изобретения азотистое основание может включать, например, во встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

[00217] В вариантах воплощения изобретения, в которых используется двойная направляющая РНК, каждая из sgРНК и tracrРНК может включать модификации. Такие модификации могут быть на одном или обоих концах sgРНК и/или tracrРНК. В вариантах воплощения изобретения,

содержащих sgРНК, один или более остатков на одном или обоих концах sgРНК могут быть химически модифицированы, и/или внутренние нуклеозиды могут быть модифицированы, и/или вся sgРНК может быть химически модифицирована. Некоторые варианты воплощения изобретения содержат модификацию 5'-конца. Некоторые варианты воплощения изобретения содержат модификацию 3'-конца. Некоторые варианты воплощения изобретения включают модификацию 5'-конца и модификацию 3'-конца.

[00218] В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющие РНК, раскрытые в данном документе, содержат один из паттернов модификации, раскрытых в WO2018/107028 A1, поданной 8 декабря 2017 г., под названием «Химически модифицированные направляющие РНК», содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющие РНК, раскрытые в настоящем документе, содержат одну из структур/паттернов модификации, раскрытых в US 20170114334, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющие РНК, раскрытые в настоящем документе, содержат одну из структур /модификации паттернов раскрытых в WO2017/136794, содержание которой полностью включено в данное описание посредством ссылки.

[00219] В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК включает любую из представленных в документе паттернов модификации, где N представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, и где совокупность N включает направляющую последовательность TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, как описано в данном документе в Таблицах 1-3. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированная sgРНК включает следующую последовательность:

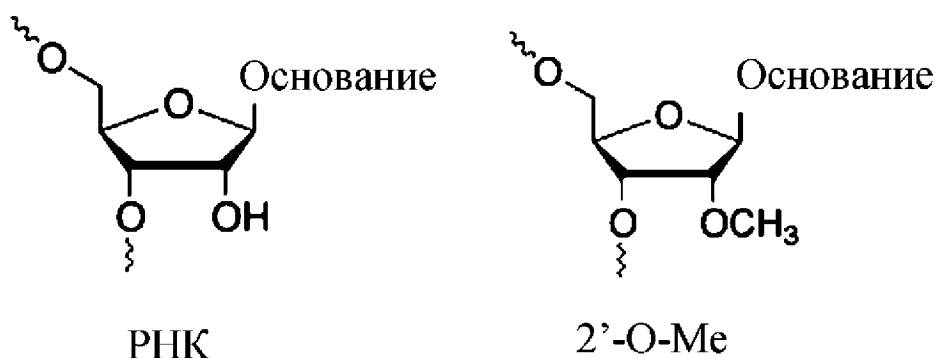
mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID №: 300), где «N» может быть любым природным или неприродным нуклеотидом, и где совокупность N включает направляющую последовательность TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, как описано в Таблицах 1 и 2 или как описано в данном документе. Например, сюда входит SEQ ID №: 300, где N заменены любой из направляющих последовательностей, раскрытых в данном документе в Таблицах 1 и 2 (SEQ ID №: 1-89, 90-178, 185 и 213-218).

[00220] Любая из описанных ниже модификаций может присутствовать в gРНК и иРНК, описанных в данном документе.

[00221] Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» могут использоваться для

обозначения нуклеотида, который был модифицирован 2'-O-Me.

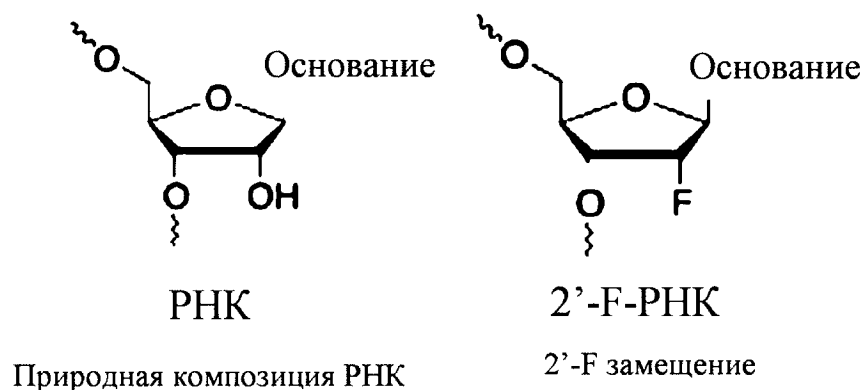
[00222] Модификацию 2'-О-метила можно изобразить следующим образом:



[00223] Другой химической модификацией, которая, как было показано, влияет на кольца нуклеотидных сахаров, является замещение галогена. Например, замена 2'-фтор (2'-F) в кольцах нуклеотидных сахаров может повысить аффинность связывания олигонуклеотидов и стабильность нуклеаз.

[00224] В этой заявке термины «fA», «fC», «fU» или «fG» могут использоваться для обозначения нуклеотида, который был замещен на 2'-F.

[00225] Замещение 2'-F можно изобразить следующим образом:



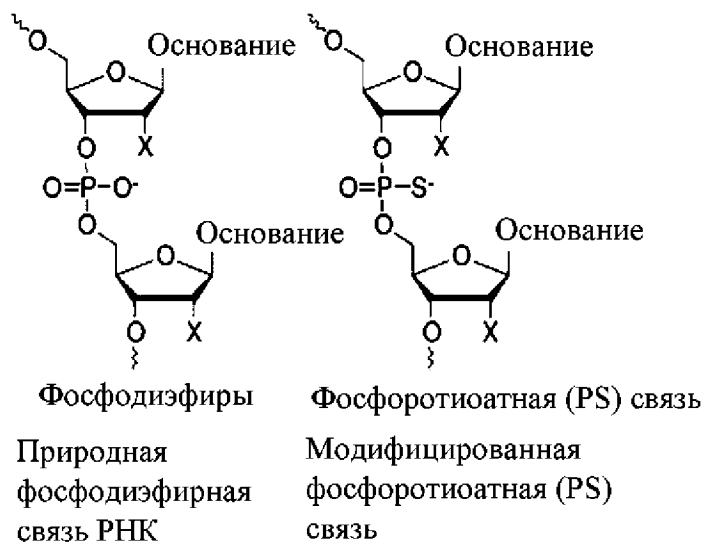
[00226] Фосфоротиоатная (PS) связь относится к связи, в которой сера замещена одним немостиковым фосфатным кислородом в фосфодизфирной связи, например, в связях между нуклеотидными основаниями. Когда фосфоротиоаты используются для создания олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды также могут называться S-олигонуклеотидами.

[00227] Символ «*» может использоваться для обозначения модификации PS. В этой заявке термины A *, C *, U * или G * могут использоваться для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (например, 3') нуклеотидом с помощью связи PS.

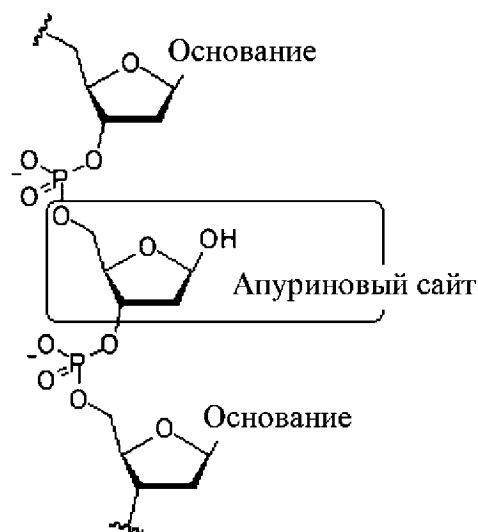
[00228] В этой заявке термины «mA*», «mC*», «mU*» или «mG*» могут использоваться для обозначения нуклеотида, который был замещен 2'-O-Me и который связан со следующим (например, 3') нуклеотидом с помощью связи PS.

[00229] На диаграмме ниже показано замещение S- на немоستيковый фосфатный

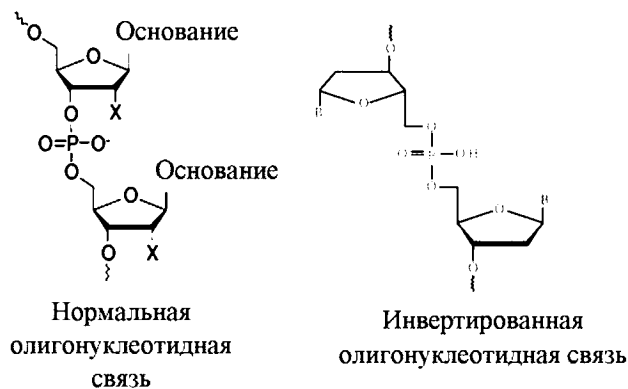
кислород с образованием связи PS вместо фосфодиэфирной связи:



[00230] Нуклеотиды с удаленным азотистым основанием относятся к нуклеотидам, в которых отсутствуют азотистые основания. На Фигуре ниже изображен олигонуклеотид с участком с удаленными азотистыми основаниями (также известными как апуриновыми), в котором отсутствует основание:



[00231] Инвертированные основания относятся к основаниям, у которых связи инвертированы от нормальной связи 5' к 3' (т.е. либо связь 5' к 5', либо связь 3' к 3'). Например:



[00232] Нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть присоединен с помощью инвертированной связи. Например, нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть присоединен к 5'-концевому нуклеотиду через 5' к 5' связь, или нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть присоединен к 3' концевому нуклеотиду через 3' к 3' связь. Инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием на концевом 5' или 3' нуклеотиде также можно назвать инвертированным концевым колпачком с удаленным азотистым основанием.

[00233] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированными являются один или более из первых трех, четырех или пяти нуклеотидов на 5'-сайте терминации транскрипции и один или более из последних трех, четырех или пяти нуклеотидов на 3'-сайте терминации транскрипции. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация представляет собой 2'-O-Me, 2'-F, инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, связь PS или другую модификацию нуклеотидов, хорошо известную в данной области для повышения стабильности и/или производительности.

[00234] В некоторых вариантах воплощения изобретения первые четыре нуклеотида на 5'-сайте терминации транскрипции и последние четыре нуклеотида на 3'-сайте терминации транскрипции связаны фосфоротриатными (PS) связями.

[00235] В некоторых вариантах воплощения изобретения первые три нуклеотида на 5'-сайте терминации транскрипции и последние три нуклеотида на 3'-сайте терминации транскрипции содержат 2'-O-метил (2'-O-Me) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения изобретения первые три нуклеотида на 5'-сайте терминации транскрипции и последние три нуклеотида на 3'-сайте терминации транскрипции содержат 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения изобретения первые три нуклеотида на 5'-сайте терминации транскрипции и последние три нуклеотида на 3'-сайте терминации транскрипции содержат инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием.

[00236] В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая РНК включает модифицированную sgРНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК включает образец модификации, показанный в SEQ ID №: 401, где N представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, и где совокупность N включает

направляющую последовательность, которая направляет нуклеазу к целевой последовательности в TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, например, как показано в Таблицах 1 и 2.

[00237] В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая РНК включает sgРНК, показанную в любой из SEQ ID №: 179-184. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая РНК включает sgРНК, содержащую любую из направляющих последовательностей SEQ ID №: 1-178 и нуклеотидов SEQ ID №: 401, где нуклеотиды SEQ ID №: 401 находятся на 3'-конце направляющей последовательности, и где sgРНК может быть модифицирована, как показано в данном документе или в SEQ ID № 300.

[00238] Как отмечалось выше, в некоторых вариантах воплощения изобретения композиция или состав, раскрытые в данном документе, содержат иРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения предоставляется, используется или вводится иРНК, содержащая ORF, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения ORF, кодирующая РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, представляет собой «ORF модифицированный РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» или просто «модифицированную ORF», что используется как сокращение для обозначения того, что ORF модифицирована.

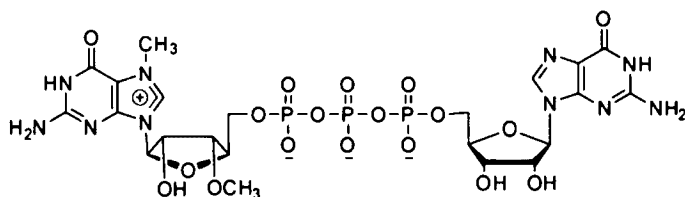
[00239] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированная ORF может включать модифицированный уридин по меньшей мере на одном, множестве или всех положениях уридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой уридин, модифицированный в положении 5, например, галогеном, метилом или этилом. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин, модифицированный в положении 1, например, галогеном, метилом или этилом. Модифицированный уридин может быть, например, псевдоуридином, N1-метил-псевдоуридином, 5-метоксиуридином, 5-йодуридином или их комбинацией. В некоторых вариантах воплощения модифицированный уридин представляет собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах воплощения модифицированный уридин представляет собой 5-йодуридин. В некоторых вариантах воплощения модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой N1-метил-псевдоуридин. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию N1-метил-псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный

уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах воплощения модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-йодуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и 5-метоксиуридина.

[240] В некоторых вариантах воплощения изобретения иРНК, раскрытая в данной заявке, содержит 5'-кэп, такой как Cap0, Cap1 или Cap2. 5'-кэп обычно представляет собой 7-метилгуанин-рибонуклеотид (который может быть дополнительно модифицирован, как обсуждается ниже, например, в отношении ARCA), связанный через 5'-трифосфат с 5'-положением первого нуклеотида 5'- до- 3'- цепью иРНК, т.е. первый кэп-проксимальный нуклеотид. В Cap0, рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов иРНК содержат 2'-гидроксил. В Cap1, рибозы первого и второго транскрибируемых нуклеотидов иРНК содержат 2'-метокси и 2'-гидроксил соответственно. В Cap2, рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов иРНК содержат 2'-метокси. См., например Katibah et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33):12025-30; Abbas et al. (2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11): E2106-E2115.

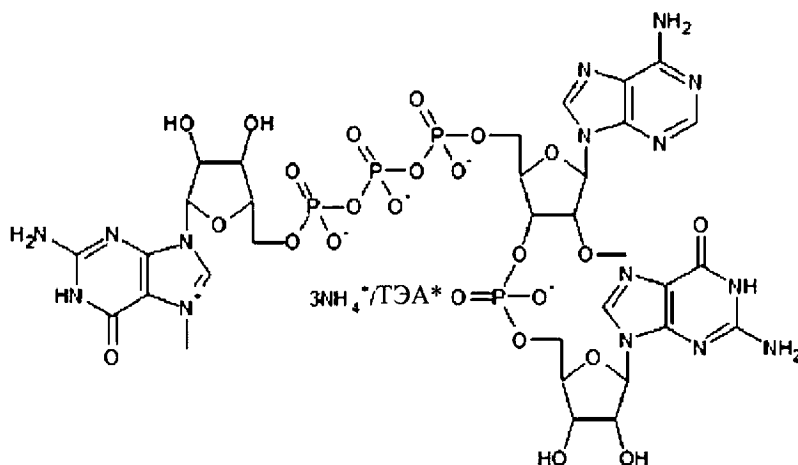
Большинство эндогенных иРНК высших эукариот, включая иРНК млекопитающих, такие как иРНК человека, содержат Cap1 или Cap2. Cap0 и другие кэп-структуры, отличные от Cap1 и Cap2, могут быть иммуногенными у млекопитающих, таких, как люди, из-за распознавания как «чужого» компонентами врожденной иммунной системы, такими как IFIT-1 и IFIT-5, что может привести к повышенному уровню цитокинов, включая интерферон I типа. Компоненты врожденной иммунной системы, такие как IFIT-1 и IFIT-5, также могут конкурировать с eIF4E за связывание иРНК с кэпом, отличным от Cap1 или Cap2, потенциально ингибируя трансляцию иРНК.

[00241] Кэп может быть включен со-транскрипционно. Например, ARCA (антиреверсный кэп аналог; Thermo Fisher Scientific кат. № AM8045) представляет собой аналог кэпа, содержащий 7-метилгуанин-3'-метокси-5'-трифосфат, связанный с 5' положением рибонуклеотида гуанина, который может быть включен *in vitro* в транскрипт при инициации. ARCA приводит к кэпу Cap0, в котором 2' положение первого нуклеотида, проксимального к кэпу, является гидроксилом. См., например, Stepinski et al., (2001) “Synthesis и properties of mRNAs containing the novel ‘anti-reverse’ cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG и 7-methyl(3'deoxy)GpppG,” RNA 7: 1486-1495. Структура ARCA показана ниже.



[00242] CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies кат. № N-7113) или CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies кат. №

N-7133) может быть применен для обеспечения структуры Cap1 со-транскрипционно. 3'-О-метилованные версии CleanCap™ AG и CleanCap™ GG также доступны в TriLink Biotechnologies как кат. № N-7413 и N-7433 соответственно. Структура CleanCap™ AG показана ниже.



[00243] Альтернативно, кэп может быть добавлен к РНК посттранскрипционно. Например, коммерчески доступен кэпирующий фермент осповакцины (New England Biolabs Кат. №. M2080S) и обладает активностями РНК-трифосфатазы и гуанилилтрансферазы, обеспечиваемой его субъединицей D1, и гуанинметилтрансферазы, обеспечиваемой его субъединицей D12. Таким образом, он может добавлять 7-метилгуанин к РНК, чтобы получить Cap0, в присутствии S-аденозилметионина и GTP. См., Например, Guo, P. и Moss, B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4023-4027; Mao, X. и Shuman, S. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24472-24479.

[00244] В некоторых вариантах воплощения изобретения иРНК дополнительно содержит полиаденилированный (поли-А) хвост. В некоторых вариантах воплощения изобретения поли-А хвост содержит по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аденинов, необязательно до 300 аденинов. В некоторых вариантах воплощения изобретения поли-А хвост содержит 95, 96, 97, 98, 99 или 100 адениновых нуклеотидов.

В. Рибонуклеопротеиновый комплекс

[00245] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция содержит одну или более gРНК, содержащих одну или более направляющих последовательностей из Таблицы 1 и 2 или одну или более sgРНК из Таблицы 3 и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, например, нуклеазу, такую как нуклеаза Cas, например Cas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает клевазной активностью, которую также можно назвать двухцепочечной эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит нуклеазу Cas. Примеры нуклеаз Cas9 включают нуклеазы системы CRISPR типа II *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариот (см., например, список в следующем абзаце), а также их модифицированные (например, сконструированные или мутантные) версии. См., например, US2016/0312198A1; US

2016/0312199A1. Другие примеры нуклеаз Cas включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III или его субъединицу Cas10, CsmI или Cmr2; и каскадный комплекс системы CRISPR типа I или ее субъединицу Cas3.

В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может происходить из системы типа IIA, типа IIB или типа IIC. Обсуждение различных систем CRISPR и нуклеаз Cas см., например, Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

[00246] Неограничивающие примеры видов, из которых может происходить нуклеаза Cas, включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gammaproteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogene*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas* sp., *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* sp., *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor beccii*, *Candidatus Desulfurudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finnegoldia magna*, *Natronaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter* sp., *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc* sp., *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira* sp., *Lyngbya* sp., *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria* sp., *Petrogoba mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus* sp., *Lachnospiraceae* бактерию ND2006, и *Acaryochloris marina*.

[00247] В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Francisella novicida*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Acidaminococcus* sp. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из бактерии

Lachnospiraceae ND2006. В дополнительных вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens* или *Porphyromonas macasaeta*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

[00248] В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, называется рибонуклеопротеиновым комплексом (RNP). В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеазу Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК вместе с нуклеазой Cas называется Cas-RNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения RNP содержит компоненты типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой белок Cas9 из системы CRISPR/Cas типа II. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК вместе с Cas9 называют Cas9 RNP.

[00249] Cas9 дикого типа имеет два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет цепь ДНК, не являющуюся мишенью, а домен HNH расщепляет цепь-мишень ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения белок Cas9 содержит более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах воплощения изобретения белок Cas9 представляет собой Cas9 дикого типа. В каждом из вариантов композиции, применения и способа Cas индуцирует двухцепочечный разрыв в ДНК-мишени.

[00250] В некоторых вариантах воплощения изобретения используются химерные нуклеазы Cas, в которых один домен или область белка заменяется частью другого белка.

В некоторых вариантах воплощения изобретения домен нуклеазы Cas может быть заменен доменом другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть модифицированной нуклеазой.

[00251] В других вариантах воплощения изобретения, нуклеаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть компонентом комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть белком Cas3. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может обладать активностью расщепления РНК.

[00252] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, обладает одноцепочечной нуклеазной активностью, то есть может разрезать одну цепь ДНК с образованием одноцепочечного разрыва, также известного как «разрыв». В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas нуклеазу. Нуклеаза является ферментом, который создает

разрыв в dsДНК, то есть разрезает одну цепь, но не вторую, двойной спирали ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения Cas никаза представляет собой версию нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas, обсуждаемой выше), в которой эндонуклеолитический активный сайт инактивирован, например, одним или несколькими изменениями (например, точечными мутациями) в каталитическом домене. См., например, патент США No. US 8,889,356 для обсуждения Cas никаза и иллюстративных изменений каталитических доменов. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза Cas, такая как никаза Cas9, имеет инактивированный домен RuvC или HNH.

[00253] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, модифицирован таким образом, чтобы он содержал только один функциональный домен нуклеазы. Например, агентный белок может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы мутирован или полностью или частично удален, чтобы снизить его активность по расщеплению нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется никаза, имеющая домен RuvC с пониженной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется никаза, имеющая неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется никаза, имеющая домен HNH с пониженной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется никаза, имеющая неактивный домен HNH.

[00254] В некоторых вариантах воплощения изобретения консервативная аминокислота в домене нуклеазы белка Cas заменяется для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Примеры аминокислотных замен в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22;163(3): 759-771. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в HNH- или HNH-подобном нуклеазном домене. Примеры аминокислотных замен в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*).

См., например, Zetsche et al. (2015). Дополнительные примерные аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности *Francisella novicida* U1 12 Cpfl (FnCpfl) (UniProtKB - A0Q7Q2) (CPF1 FRATN)).

[00255] В некоторых вариантах воплощения изобретения иРНК, кодирующая никазу, предоставляется в комбинации с парой направляющих РНК, которые комплементарны смысловой и антисмысловой цепям последовательности-мишени, соответственно. В этом варианте воплощения изобретения направляющие РНК направляют никазу к последовательности-мишени и вводят DSB, создавая разрыв на противоположных цепях последовательности-мишени (то есть двойной разрыв). В некоторых вариантах воплощения изобретения применение двойного надреза может улучшить специфичность и снизить нецелевые эффекты. В некоторых вариантах

воплощения изобретения никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного разрыва в целевой ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, выбранными так, чтобы они находились в непосредственной близости, чтобы образовать двойной разрыв в целевой ДНК.

[00256] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, не обладает активностью расщепления и никазы. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, включает ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, но практически лишен каталитической активности (расщепление/никаза). В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептид dCas представляет собой полипептид dCas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, лишенный активности расщепления и никазы или ДНК-связывающий полипептид dCas является версией нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas, обсуждаемой выше), в которой ее эндонуклеолитические активные сайты инактивированы, например одним или несколькими изменениями (например, точечными мутациями) в его каталитических доменах. См., например, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1.

[00257] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит один или более гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой или содержит слитый полипептид).

[00258] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может облегчить транспорт РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может быть сигналом ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с 1-10 NLS.

В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с 1-5 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с одним NLS. Если используется один NLS, он может быть связан с N-концом или C-концом последовательности ДНК-связывающего агента, управляемой РНК. Он также может быть вставлен в последовательность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В других вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с более чем одним NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с 2, 3, 4 или 5 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с двумя NLS. В определенных обстоятельствах два NLS могут быть одинаковыми (например, два SV40 NLS) или разными. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, слит с двумя

последовательностями NLS SV40, связанными на карбокси-конце.

В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с двумя NLS, один связан с N-концом, а другой - с С-концом. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с 3 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит без NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения NLS может быть одночастной последовательностью, такой как, например, SV40 NLS, PKKKRKV (SEQ ID № 600) или PKKKRRV (SEQ ID № 601). В некоторых вариантах воплощения изобретения NLS может быть двудольной последовательностью, такой как NLS нуклеоплазмينا, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID № 602). В конкретном варианте воплощения изобретения одиночный PKKKRKV (SEQ ID № 600) NLS может быть связан на С-конце РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Один или более линкеров необязательно включены в сайт слияния.

[00259] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен изменять внутриклеточный период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах воплощения изобретения может быть увеличен период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах воплощения изобретения период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, может быть уменьшен. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен повышать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может снижать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может действовать как сигнальный пептид для деградации белка. В некоторых вариантах воплощения изобретения деградация белка может быть опосредована протеолитическими ферментами, такими как, например, протеасомы, лизосомальные протеазы или протеазы кальпаина. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может содержать последовательность PEST. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть модифицирован путем добавления убиквитина или полиубиквитиновой цепи. В некоторых вариантах воплощения изобретения убиквитин может быть белком, убиквитин-подобный белком (UBL).

Неограничивающие примеры белков, убиквитин-подобных белков, включают малый модификатор убиквитина-подобный белок (SUMO), белок, перекрестно реагирующий с убиквитином (UCRP, также известный как интерферон-стимулированный ген-15 (ISG15), убиквитин-связанный модификатор-1 (URM1), нейрональные клетки-предшественники экспрессируются онтогенетически подавленный белок-8 (NEDD8, также называемый Rub1 в *S. cerevisiae*), человеческий лейкоцитарный антиген F-связанный

(FAT10), аутофагия-8 (ATG8) и-12 (ATG12), убиквитин Fau-подобный белок (FUB1), закрепленный на мембране UBL (MUB), убиквитиновый модификатор укладки-1 (UFM1) и убиквитин-подобный белок-5 (UBL5).

[00260] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть маркерным доменом. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают флуоресцентные белки, метки очистки, эпитопные метки и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах воплощения изобретения, маркерный домен может быть флуоресцентным белком. Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (например, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, мономерный Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (например, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (например, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire,), голубые флуоресцентные белки (например, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные белки (например, mKate, mKate2, mPlum, мономер DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Monomeric Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или любой другой подходящий флуоресцентный белок. В других вариантах воплощения маркерный домен может быть меткой очистки и/или эпитопной меткой. Неограничивающие иллюстративные теги включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP), мальтозосвязывающий белок (MBP), тиоредоксин (TRX), поли (NANP), тэг тандемной аффинной очистки (TAP), мус, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, белок-носитель карбоксила биотина (BCCP), поли-His и кальмодулин. Неограничивающие иллюстративные репортерные гены включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

[00261] В дополнительных вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на конкретную органеллу, тип клетки, ткань или орган. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент в митохондрии.

[00262] В дополнительных вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть эффекторным доменом. Когда РНК-направляемый ДНК-связывающий агент направлен на свою последовательность-мишень, например, когда нуклеаза Cas направлена на последовательность-мишень с помощью gРНК, эффекторный домен может модифицировать или влиять на последовательность-мишень.

В некоторых вариантах воплощения изобретения эффекторный домен может быть

выбран из домена связывания нуклеиновой кислоты, домена нуклеазы (например, домена нуклеазы, отличного от Cas), домена эпигенетической модификации, домена активации транскрипции или домена репрессора транскрипции. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу, такую как нуклеаза FokI. См., например, патент США No. № 9,023,649. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой активатор или репрессор транскрипции. См., например, Qi et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression,” *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., “RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors,” *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali et al., “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening и paired nickases for cooperative genome engineering,” *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert et al., “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes,” *Cell* 154:442-51 (2013). Таким образом, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, по существу, становится фактором транскрипции, который может быть направлен на связывание желаемой последовательности-мишени с применением направляющей РНК.

Г. Определение эффективности gРНК

[00263] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность gРНК определяется при доставке или экспрессии вместе с другими компонентами, образующими RNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК экспрессируется вместе с агентом связывания ДНК, управляемым РНК, таким как белок Cas, например Cas9.

В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК доставляется или экспрессируется в клеточной линии, которая уже стабильно экспрессирует РНК-направляемую нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas или никаза, например нуклеаза или никаза Cas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК доставляется в клетку как часть RNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК доставляется в клетку вместе с иРНК, кодирующей РНК-направляемую нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas или никаза, например нуклеаза или никаза Cas9.

[00264] Как описано в данной заявке, применение РНК-направляемой ДНК-нуклеазы и направляющей РНК, раскрытых в данной заявке, может приводить к двухцепочечным разрывам в ДНК, которые могут приводить к ошибкам в виде вставок/делений (инсерций) мутаций при репарации клеточным механизмом. Многие мутации из-за инделей изменяют рамку считывания или вводят преждевременные стоп-кодоны и, следовательно, производят нефункциональный белок.

[00265] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность конкретных gРНК определяется на основе моделей *in vitro*. В некоторых вариантах воплощения изобретения модель *in vitro* представляет собой клетки HEK293, стабильно экспрессирующие Cas9 (HEK293_Cas9). В некоторых вариантах воплощения изобретения модель *in vitro* представляет собой моноклеарную клетку периферической крови

(PBMC). В некоторых вариантах воплощения изобретения модель *in vitro* представляет собой Т-клетку, такую как первичные Т-клетки человека. Что касается применения первичных клеток, можно использовать коммерчески доступные первичные клетки для обеспечения большей согласованности между экспериментами. В некоторых вариантах воплощения изобретения количество нецелевых сайтов, в которых происходит делеция или вставка, в модели *in vitro* (например, в Т-клетке) определяется, например, путем анализа геномной ДНК из трансфицированных клеток *in vitro* с помощью иРНК Cas9 и направляющей РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения такое определение включает анализ геномной ДНК из клеток, трансфицированных *in vitro* Cas9 из иРНК, направляющей РНК и донорного олигонуклеотида. Иллюстративные процедуры для таких определений представлены в рабочих примерах, в которых используются клетки НЕК293, PBMC и человеческие CD3⁺ Т-клетки.

[00266] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность конкретных gРНК определяется на множестве клеточных моделях *in vitro* для процесса отбора gРНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения выполняется сравнение данных клеточной линии с выбранными gРНК. В некоторых вариантах воплощения выполняется перекрестный скрининг на нескольких клеточных моделях.

[00267] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется процентными долями TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется процентным содержанием TRBC и/или TRAC. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется процентным содержанием TRBC или TRAC. В некоторых вариантах воплощения изобретения процентное изменение TRBC1, TRBC2 и/или TRAC сравнивается с процентным изменением, необходимым для достижения нокдауна белковых продуктов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

[00268] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется по уменьшенной или устраненной экспрессии компонента Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах воплощения изобретения сниженная или устраненная экспрессия компонента Т-клеточного рецептора (TCR) включает сниженную или устраненную экспрессию TRAC, TRBC1, TRBC2, CD3E, CD3G и/или CD3D. В некоторых вариантах воплощения изобретения указанное снижение или устранение экспрессии указанного компонента TCR является результатом введения в указанный компонент TCR в указанную клетку одной или более, например, одной или двух, например, одной молекулы gРНК, описанной в данном документе. В некоторых вариантах воплощения указанное снижение или устранение экспрессии компонента TCR измеряется с помощью проточной цитометрии, например, как описано в данном документе.

[00269] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется количеством и/или частотой инсерций на нецелевых

последовательностях в геноме целевого типа клетки, такого как Т-клетка. В некоторых вариантах воплощения изобретения предусмотрены эффективные направляющие РНК, которые продуцируют инсерции на сайтах-мишенях с очень низкой частотой (например, меньше 5%) в популяции клеток и/или по отношению к частоте создания инсерций на целевом сайте. Таким образом, в описании представлены направляющие РНК, которые не проявляют образования инсерций вне мишени в типе клеток-мишеней (например, Т-лимфоциты) или которые вызывают частоту образования инсерций вне мишени меньше 5% в популяции клеток и/или относительно частоты создания инсерций на целевом сайте. В некоторых вариантах воплощения изобретения в описании представлены направляющие РНК, которые не проявляют образования инсерций вне мишени в типе клетки-мишени (например, Т-клетке). В некоторых вариантах воплощения изобретения предусмотрены направляющие РНК, которые образуют инсерции менее чем на 5 сайтах вне мишени, например, при оценке одним или более описанными в данном документе способами. В некоторых вариантах воплощения изобретения предусмотрены направляющие РНК, которые производят инсерции менее чем или равно на 4, 3, 2 или 1 нецелевых сайтах, например, по оценке одним или более способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения нецелевой сайт (сайты) не встречается(ются) в области в геноме клетки-мишени, кодирующей белок (например, гепатоцита).

[00270] В некоторых вариантах воплощения изобретения для обнаружения событий редактирования генов, таких как образование мутаций вставки/делеции («инсерционно-делеционная мутация») и событий гомологически направленной репарации (HDR) в целевой ДНК, используют линейную амплификацию с меченым праймером и выделение меченых продуктов амплификации (в данной заявке называется способом «LAM-ПЦР» или «способом линейной амплификации (LA)»).

[00271] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется уровнями функциональных белковых комплексов, содержащих экспрессированный белковый продукт гена. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется с помощью проточно-цитометрического анализа экспрессии TCR, с помощью которого живая популяция отредактированных клеток анализируется на потерю TCR.

III. Способы, включая терапевтические способы, и способы получения сконструированных клеток или иммунотерапевтических реагентов

[00272] gРНК и связанные с ними способы и композиции, раскрытые в данном документе, полезны в иммунотерапии и для создания реагентов иммунотерапии, таких как сконструированные клетки.

[00273] В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК, содержащие направляющие последовательности Таблиц 1 и 2 вместе с РНК-направляемой ДНК-нуклеазой, такой как нуклеаза Cas, индуцируют двухцепочечные разрывы (DSBs), и нехомологичное соединение концов (NHEJ) во время репарации приводит к мутации в

генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. В некоторых вариантах воплощения изобретения NHEJ приводит к делеции или вставке нуклеотида (ов), что вызывает сдвиг рамки считывания или нонсенс-мутацию в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

[00274] В некоторых вариантах воплощения изобретения субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах воплощения изобретения субъект является человеком. В некоторых вариантах воплощения изобретения субъект представляет собой корову, свинью, обезьяну, овцу, собаку, кошку, рыбу или домашнюю птицу.

[00275] В некоторых вариантах воплощения изобретения применение направляющих РНК, содержащих любую одну или более направляющих последовательностей в Таблицах 1 и 2, или одну или более sgРНК из Таблицы 3 (например, в композиции, представленной в настоящем документе), предусмотрено для приготовления лекарственного средства для лечения субъекта человека, нуждающегося в иммунотерапии.

[00276] В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющие РНК, композиции и составы используются для получения ex vivo Т-клетки с мутированными генами TRBC1, TRBC2 и/или TRAC. Модифицированная Т-клетка может быть Т-клеткой естественным киллером (NK). Модифицированная Т-клетка может экспрессировать Т-клеточный рецептор, такой как универсальный TCR или модифицированный TCR. Т-клетка может экспрессировать CAR или конструкцию CAR с сигнальной областью зета-цепь рецептора.

[00277] В некоторых вариантах воплощения изобретения однократного введения композиции, содержащей направляющую РНК, представленную в данном документе, достаточно для подавления экспрессии TRBC1, TRBC2 или TRAC. В других вариантах воплощения более одного введения композиции, содержащей направляющую РНК, представленную в данном документе, может быть полезным для усиления терапевтических эффектов.

Доставка композиций gРНК

[00278] Липидные наночастицы (LNP) представляют собой хорошо известные средства доставки нуклеотидного и белкового груза, и их можно использовать для доставки направляющих РНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP доставляют нуклеиновую кислоту, белок или нуклеиновую кислоту вместе с белком.

[00279] Направляющая РНК или другая нуклеиновая кислота (например, кодирующая полипептид) может быть связана с липидной наночастицей (LNP). Подходящие LNP известны в данной области техники. См. например, липиды из РСТ/US2018 /053559, WO/2017/173054, WO2015/095340 и WO2014/136086, а также ссылки, приведенные в них.

[00280] В некоторых вариантах воплощения изобретение включает способ доставки любой одной из gРНК, раскрытых в данном документе, субъекту, при этом gРНК доставляется через LNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК/LNP

также связана с Cas9 или иРНК, кодирующей Cas9.

[00281] В некоторых вариантах воплощения изобретение включает композицию, содержащую любую из описанных gРНК и LNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция дополнительно включает Cas9 или иРНК, кодирующую Cas9.

[00282] В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP содержат ионизируемые липиды. В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP содержат (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат) или другой ионизируемый липид. См. например, липиды в PCT/US2018/053559 (подана 28 сентября 2018 г.), WO/2017/173054, WO2015/095340 и WO2014/136086, а также приведенные в них ссылки. В некоторых вариантах воплощения термин «катионный» и «ионизируемый» в контексте липидов LNP является взаимозаменяемым, например, там, где ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от pH.

[00283] В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP, ассоциированные с gРНК, раскрытыми в данном документе, используются для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения.

[00284] Электропорация является другим полезным средством доставки карго, и любая методология электропорации может использоваться для доставки любой из gРНК, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения электропорация может использоваться для доставки любой из описанных в настоящем документе gРНК и Cas9 или иРНК, кодирующей Cas9.

[00285] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение включает способ доставки любой из описанных в данной заявке gРНК в клетку *ex vivo*, где gРНК связана с LNP или не связана с LNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК/LNP или gРНК также связаны с Cas9 или иРНК, кодирующими Cas9.

[00286] В некоторых вариантах воплощения изобретения описанные в данном документе композиции направляющей РНК, отдельно или кодированные на одном или более векторах, составлены или вводятся через липидную наночастицу; см. например, WO/2017/173054, содержание которой полностью включено сюда посредством ссылки.

[00287] В некоторых вариантах воплощения изобретение включает векторы ДНК или РНК, кодирующие любую из направляющих РНК, содержащих любую одну или более направляющих последовательностей, описанных в данном документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения помимо последовательностей направляющих РНК, векторы дополнительно содержат нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющие РНК. Нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющую РНК, включают, но не ограничиваются ими, промоторы, энхансеры, регуляторные последовательности и нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может быть нуклеазой, такой как Cas9. В некоторых вариантах

воплощения изобретения вектор включает одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих sgРНК, trРНК или sgРНК и trРНК. В некоторых вариантах воплощения вектор включает одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих sgРНК и trРНК, кодирующих РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может быть нуклеазой Cas, такой как Cas9 или Cpf1. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор включает одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих sgРНК, trРНК и trРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может быть белком Cas, например Cas9. В одном варианте воплощения Cas9 происходит из *Streptococcus pyogenes* (т.е. Spy Cas9). В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая sgРНК, trРНК или sgРНК и trРНК (которая может быть sgРНК), включает или состоит из направляющей последовательности, фланкированной всей или частью повторяющейся последовательности из естественной системы CRISPR/Cas. Нуклеиновая кислота, содержащая sgРНК, trРНК или sgРНК и trРНК или состоящая из них, может дополнительно включать векторную последовательность, в которой векторная последовательность включает или состоит из нуклеиновых кислот, которые в природе не встречаются вместе с sgРНК, trРНК или trРНК и trРНК.

[00288] В некоторых вариантах воплощения изобретения компоненты могут быть введены в виде голый нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты с агентом, таким как липосома или полуксамер, или они могут быть введены в виде нуклеиновой кислоты (например, gРНК) и белка в виде рибонуклеопротеинового комплекса (RNP). В некоторых вариантах воплощения изобретения компоненты могут доставляться векторами, такими как вирусные векторы (например, аденовирус, AAV, герпесвирус, ретровирус, лентивирус). Способы и композиции для невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, LNP, поликатион или липиды: конъюгаты нуклеиновой кислоты, голый нуклеиновой кислоты (например, голый ДНК/РНК), искусственные вирионы, и усиленный агентом захват ДНК. Сонопорация с применением, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar) также может использоваться для доставки нуклеиновых кислот.

[00289] Полипептид можно ввести в клетку путем доставки нуклеиновой кислоты, такой как матрица нуклеиновой кислоты, которая кодирует представляющий интерес полипептид, в клетку. Матрица нуклеиновой кислоты может кодировать полипептид, представляющий интерес, необязательно как часть кассеты экспрессии, где матрица дополнительно включает фланкирующие последовательности. Такие фланкирующие последовательности необязательно являются плечами гомологии, разработанными для облегчения направленной на гомологию репарации и интеграции матричной нуклеиновой кислоты в клетку. Матрица нуклеиновой кислоты может включать открытую рамку считывания (ORF) для интересующего полипептида, фланкированную последовательностями, гомологичными первому целевому локусу, для облегчения

гомологичной рекомбинации в целевом локусе. Матрица может включать плечи гомологии, фланкирующие сайт расщепления gРНК, например, где ветви гомологии содержат фланкирующие последовательности. В некоторых вариантах воплощения изобретения фланкирующие последовательности предназначены для исключения области целевого локуса на сайте расщепления или вокруг него, что приводит к делеции этой области, что, таким образом, предотвращает разрезание сайта после репарации, а также предотвращает разрезание gРНК/Cas9 матричной нуклеиновой кислотой. Пропущенная область или «пробел», который включает сайт расщепления gРНК, может иметь длину 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 или более нуклеотидов. Фланкирующие последовательности могут быть разработаны для удаления, например, 10-100 нуклеотидного разрыва, 10-50 нуклеотидного разрыва, 25-100 нуклеотидного разрыва или 50-100 нуклеотидного разрыва.

[00290] Нуклеиновая кислота, кодирующая интересующий полипептид, может быть включена в вирусной матрице или невирусной матрице. Вирусный вектор может быть любым подходящим вирусом, таким как ретровирус, аденовирус, лентивирус, аденоассоциированный вирус или их гибрид. В некоторых вариантах воплощения изобретения вирусный вектор может быть вектором аденоассоциированного вируса (AAV). Матрица нуклеиновой кислоты может включать экзогенную промоторную последовательность перед ORF. Матрица нуклеиновой кислоты может быть без промотора, так как эндогенный промотор TRAC может управлять экспрессией интересующего полипептида после его вставки.

[00291] В дополнение к последовательности, кодирующей интересующий полипептид, матрица нуклеиновой кислоты может включать одну или более из: последовательности промотора, последовательности Кóзак, последовательности IRES (участок внутренней посадки рибосомы), акцепторной последовательности сплайсинга, полиА последовательности и последовательности, кодирующей расщепляемый пептид, такой как P2A, T2A, E2A и т.п.

[00292] В некоторых вариантах воплощения изобретения способы, описанные в данном документе, дополнительно включают доставку одной или более последовательностей, содержащих один или более генов, кодирующих один или более представляющих интерес полипептидов, в клетку. В некоторых вариантах воплощения изобретения интересующий полипептид участвует в регуляции иммунной толерантности. В некоторых вариантах воплощения изобретения интересующий полипептид участвует в регуляции фенотипа рака.

[00293] В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более полипептидов содержат рецептор, например иммунологический рецептор. Иммунологический рецептор означает рецептор, который может распознавать антиген. Типичными примерами иммунологических рецепторов являются рецепторы Т-клеток (TCR) и рецепторы химерных антигенов (CAR). В некоторых вариантах воплощения изобретения иммунологический рецептор распознает раковый антиген, такой как WT1. В

некоторых вариантах воплощения изобретения интересующий полипептид представляет собой TCR WT1. TCR WT1 может распознавать пептид WT1 VLDFAPPGA (VLD) или RMFPNAPYL (RMF). В некоторых вариантах воплощения изобретения TCR WT1 распознает пептид VLD. Интересующий полипептид может включать α -цепь WT1 TCR. Представляющий интерес полипептид может включать β -цепь WT1 TCR. В некоторых вариантах воплощения изобретения интересующий полипептид может включать α -цепь WT1 TCR и β -цепь WT1 TCR. Типичные WT1-специфические последовательности TCR известны в данной области техники и включают:

Таблица 4

TCR ID	Аминокислотная последовательность	SEQ ID №:
TCR-A (β -линкер- α конфигурация)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQ EVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNAV PIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF CASRKTGGYSNQPHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEV AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV SAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSAVLMLAMVKRKDSRGGSGATNFSLLKQAG DVEENPGPMETLLKVLSTLLWQLTWVRSQQPVQSP QAVILREGEDAVINCSSSKALYSVHWYRQKHGEAPV FLMILLKGGEQKGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQL SYSGTYFCGTAWINDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPD PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNN SIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIG FRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	500
TCR-A, α -цепь	METLLKVLSTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREG EDAVINCSSSKALYSVHWYRQKHGEAPVFLMILLKG GEQKGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQLSYSGTYFC GTAWINDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRD SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFF PSPPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRILLK V AGFNLLMTLRLWSS	501

TCR-A, β -цепь	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQ EVTLRCKPIS GHDY LFWYRQTMMRGLELLIYFNNNV PIDDS GMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF CASRKTGGYSNQPHF GDGTRLSILEDLKNVFPPEV AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVN GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV SAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	502
TCR-B β -линкер- α конфигурация)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQ EVTLRCKPIS GHDY LFWYRQTMMRGLELLIYFNNNV PIDDS GMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF CASRKTGGYSNQPHF GDGTRLSILEDLKNVFPPEV AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVN GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV SAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSALVLMAMVKRKDSRGGSGATNFSLLKQAG DVEENPGPMETLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSP QAVILREGEDAVINCSSS KALYS VHWYRQKHGEAPV FLMILL KGGEQ KGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQL SYSGTYFC GTAWINDYKLSF GAGTTVTVRANIQNPD PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNN SIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIG FRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	503
TCR-B, α - цепь	METLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREG EDAVINCSSS KALYS VHWYRQKHGEAPVFLMILL KG GEQ KGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQLSYSGTYFC GTAWINDYKLSF GAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRD SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLD MRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNN SIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRILLK V AGFNLLMTLRLWSS	504
TCR-B, β -цепь	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQ	505

	EVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNV PIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDS AVYF CASRKTGGYSNQPHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEV AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV SAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	
TCR-C (β-линкер-α конфигурация)	MSNQVLCCVVLCLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQ NVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVN DFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYL CASSPGALYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFE PSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKE VHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ NPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAE AWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV LV SALVLMAMVKRKDSRGGSGATNFSLLKQAGDVE ENPGPMTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSV QEGDS AVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIR SNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFS LHITETQPEDSAVY FCAATEDLTLIWGAGTKLIKPDIQNPDPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMR SMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAG FNLLMTLRLWSS	506
TCR-C, α -цепь	MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDS AVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIRSNVGE KKDQRIAVTLNKTAKHFS LHITETQPEDSAVYFCAAT EDLTLIWGAGTKLIKPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDF KNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAG FNLLMTLRLWSS	507
TCR-C, β- цепь	MSNQVLCCVVLCLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQ NVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVN	508

	DFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYL CASSPGALYEQYFGPGTRTLVTEDLKNVFPPEVAVFE PSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKE VHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ NPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAE AWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV LVSALVLMAMVVKRKDSRG	
TCR-D (β-линкер-α конфигурация)	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTPRHLVM GMTNKKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMF VYSLEERVENNSVPSRFSPECNSSLFLHLHTLQPED SALYLCASSQDYLVSNELFFGSGTQLSVLEDLKNVF PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVVKRKDSRGGSGATNFSLL KQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKE VEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQD CRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIR DSKLSDSATYLCVVNLLSNQGGKLIFGQGTELSVKPNI QNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL LSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	509
TCR-D, α цепь	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPE GATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVY SSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCV VNLLSNQGGKLIFGQGTELSVKPNIQNPDPVAVYQLRD SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFF PSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLV AGFNLLMTLRLWSS	510
TCR-D, β цепь	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTPRHLVM GMTNKKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMF VYSLEERVENNSVPSRFSPECNSSLFLHLHTLQPED	511

	SALYLCASSQDYLVSNELFFGSGTQLSVLEDLKNVF PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVVRKDSRG	
TCR-E (β-линкер-α конфигурация)	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTPRHLVM GMTNKKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMF VYSLEERVENNSVPSRFSPECNSSLFLHLHTLQPED SALYLCASSQDYLVSNELFFGSGTQLSVLEDLKNVF PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVVRKDSRGSGGSGATNFSLL KQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKE VEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQD CRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIR DSKLSDSATYLCVVNLLSNQGGKLIFGQGTELSVKPNI QNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL LSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	512
TCR-E, α цепь	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPE GATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVY SSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCV VNLLSNQGGKLIFGQGTELSVKPNIQNPDPVAVYQLRD SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFF PSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLV AGFNLLMTLRLWSS	513
TCR-E, β цепь	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTPRHLVM GMTNKKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMF VYSLEERVENNSVPSRFSPECNSSLFLHLHTLQPED SALYLCASSQDYLVSNELFFGSGTQLSVLEDLKNVF	514

	PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDSRG	
TCR-F (β-линкер-α конфигурация)	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQS PRHLIKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQ FLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSLE LGDSALYFCASSLRGGLEKLFFGSGTQLSVLEDLNKV FPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELS WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILL GKATLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDFGSGATNFSLLK QAGDVEENPGPMSLSSLLKVVTASLWLGPGLAQKITQ TQPGMFVQEKEAVTLDCTYDTSFPSYGLFWYKQPSS GEMIFLIYQGSYDQQNATEGRYSLNFQKARKSANLVI SASQLGDSAMYFCAISGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNP DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDV YITDKCVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFN NSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVI GFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	515
TCR-F, α цепь	MSLSSLLKVVTASLWLGPGLAQKITQTQPGMFVQEKE AVTLDCTYDTSFPSYGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSY DQQNATEGRYSLNFQKARKSANLVISASQLGDSAMY FCAISGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNP DPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMR SMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFN NSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLKLVAG FNLLMTLRLWSS	516
TCR-F, β цепь	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQS PRHLIKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQ FLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSLE LGDSALYFCASSLRGGLEKLFFGSGTQLSVLEDLNKV FPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELS	517

	WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILL GKATLYAVLVSALVLMAMVVRKDF	
TCR-G (β-линкер-α конфигурация)	MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIKRQS VAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFNNGV VDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYL CASSLYRGEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEP SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEV HSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQN PRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL VSALVLMAMVVRKDSRGGSGATNFSLLKQAGDVEE NPGPMAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVK QNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAE GPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQ PGDSAVYFCAARGQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDYIT DKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI IPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGF RILLK VAGFNLLMTLRLWSS	518
TCR-G, α цепь (последовательность аминокислот)	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSP SLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYP AEGPTF LISISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDS AVYFCAARGQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPDP AVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDYITDKCV LDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT FFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS	519
TCR-G, β цепь (последовательность аминокислот)	MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIKRQS VAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFNNGV VDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYL CASSLYRGEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEP SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEV HSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQN	520

	PRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL VSALVLMAMVKKRDSRG	
TCR-H (β-линкер-α конфигурация)	MSLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQ SMTLLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGE GTTAKGEVPDGYNVSRLLKQNFLLGLESAAPSQTSV YFCASRGYHRLNNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEV AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV SAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSALVLMAMVKKRDSRGGSGATNFSLLKQAG DVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVWSGGGSWSHP QFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEKQRKEVEQDPGPF NVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLL MSVYSSGNEDGRFTAQLNRSQYISLLIRDSKLSDSAT YLCVVKPDPGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD KCVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSII PEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFR ILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	521
TCR-H, α цепь (аминокислотная последовательность)	MISLRVLLVILWLQLSWVWSGGGSWSHPQFEKGGGS GGGSGGSAWSHPQFEKQRKEVEQDPGPFNVPEGATV AFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGN EDGRFTAQLNRSQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVKPD PGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSS DKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRS MDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE SSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLKLVAGF NLLMTLRLWSS	522
TCR-H, β цепь (аминокислотная последовательность)	MSLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQ SMTLLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGE GTTAKGEVPDGYNVSRLLKQNFLLGLESAAPSQTSV YFCASRGYHRLNNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEV AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVN	523

	GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTQIV SAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRG	
--	---	--

[00294] Определяющие комплементарность области (CDR) существуют в переменных доменах, например, TCR и антител. Есть три CDR в каждом из переменных доменов TCR альфа и TCR бета, которые обозначены как CDR1, CDR2 и CDR3 для каждого из переменных доменов. Точные границы этих CDR могут быть определены в соответствии с известными способами, см. например, Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest» и Dunbar et al., «ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification», которые обеспечивают систему нумерации остатков, применимую к переменному домену, а также границ остатков, определяющих три CDR. Другие способы определения CDR могут создавать CDR, которые перекрываются с CDR на Kabat основе и укорачиваются или удлиняются в свете прогнозов или экспериментальных результатов, свидетельствующих о том, что отдельные остатки или группы остатков или даже целые CDR не оказывают значительного влияния на связывание антигена. CDR в данном документе могут быть определены любым из этих способов.

[00295] Одна или более последовательностей могут вставляться, например, подвергаться интеграции, в такой локус, как TRAC, TRBC1 и/или TRBC2. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более генов вставляются, например, интегрируются в локус TRAC. Один или более генов могут быть предоставлены в форме, функционально связанной с гетерологичным промотором, таким как промотор EF-1 α . Альтернативно, один или более генов могут быть предоставлены таким образом, чтобы они были сконструированы для экспрессии с эндогенного промотора при интеграции, например, промотора TRAC, TRBC1 или TRBC2. Один или более генов могут включать трансляционное слияние двух или более полипептидов, связанных последовательностью самоотщепления. Этот подход может быть полезным, если предусмотрены кодирующие последовательности для многоцепочечного рецептора (например, Т-клеточного рецептора) и желательно использовать один промотор (эндогенный или гетерологичный) для управления экспрессией рецептора. По существу, активность промотора приводит к появлению иРНК, содержащей непрерывную кодирующую последовательность, включающую аминокислоты множества рецепторных цепей, которая транслируется в полипептид, который подвергается расщеплению с образованием индивидуальных рецепторных цепей.

[00296] Одна или более последовательностей могут быть доставлены любыми подходящими способами, например, трансфекцией, липидными наночастицами, электропорацией, микроинъекцией или вирусным вектором. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется вирусный вектор, такой как вектор

аденоассоциированного вируса.

IV. Дополнительные примеры вариантов воплощения

[00297] Предоставляются следующие дополнительные примеры вариантов воплощения изобретения.

Вариант воплощения изобретения 001. Способ изменения последовательности ДНК в гене TRBC1 и/или TRBC2, включающий доставку композиции в клетку, где композиция содержит:

- а. направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:
 - i. направляющей последовательности, *выбранной* из SEQ ID № 1-89;
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
 - iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
 - iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-24; и
 - v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-6; или
 - б. нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а.); и необязательно
 - в. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 002. Способ снижения экспрессии гена TRBC1 и/или TRBC2, включающий доставку композиции в клетку, где композиция содержит:

- а. направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:
 - i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
 - iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
 - iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-24; и
 - v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-6; или
 - б. нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а.); и необязательно
 - в. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 003. Способ иммунотерапии, включающий введение субъекту композиции, его аутологичной клетке и/или аллогенной клетке, при этом композиция содержит:

- а. направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:
 - i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-24; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-6; или

б. нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а.); и необязательно

в. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 004. Способ изменения последовательности ДНК в гене TRAC, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

а. направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-113; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-95; или

б. нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а.); и необязательно

в. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 005. Способ снижения экспрессии гена TRAC, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-113; и

направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-95; или

нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а.); и необязательно

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту,

кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 006. Способ иммунотерапии, включающий введение субъекту композиции, его аутологичной клетке и/или аллогенной клетке, при этом композиция содержит:

направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:
направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;
по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-113; и
направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-95; или
нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а.); и необязательно РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 007. Способ изменения последовательности ДНК в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, включающий доставку в клетку первой направляющей РНК, второй направляющей РНК и, необязательно, РНК-направляемого ДНК-связывающего агента или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, где первая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;

направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;

направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-24; и
направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-6, и
при этом вторая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:
направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;
по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-113; и
направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-95.

Вариант воплощения изобретения 008. Способ снижения экспрессии генов TRBC1,

TRBC2 и/или TRAC, включающий доставку в клетку первой направляющей РНК, второй направляющей РНК и, необязательно, РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, где первая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

- i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
- ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
- iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
- iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-24; и
- v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-6, и при этом вторая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:
 - i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;
 - iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;
 - iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-113; и
 - v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-95.

Вариант воплощения изобретения 009. Способ иммунотерапии, включающий введение композиции субъекту, его аутологичной клетке или аллогенной клетке, при этом композиция содержит: первую направляющую РНК, вторую направляющую РНК и, необязательно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, при этом первая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

- i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
- ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
- iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89;
- iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-24; и
- v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 1-6, и при этом вторая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:
 - i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;
 - iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%,

97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID № 90-113; и

v. направляющей последовательности, содержащую любую из SEQ ID № 90-95.

Вариант воплощения изобретения 010. Способ по любому из предыдущих вариантов воплощения изобретения, в котором вводят РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 011. Композиция, содержащая:

а. направляющую РНК, содержащую:

i. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID № 1-89; или

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89; или

iii. направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89; или

iv. направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID № 1-24; или

v. направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID № 1-6; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 012. Композиция согласно варианту воплощения изобретения 11 для применения при изменении последовательности ДНК с помощью генов TRBC1 и/или TRBC2 в клетке.

Вариант воплощения изобретения 013. Композиция согласно варианту воплощения изобретения 11, для применения при снижении экспрессии генов TRBC1 и/или TRBC2 в клетке.

Вариант воплощения изобретения 014. Композиция, содержащая:

а. направляющую РНК, содержащую:

i. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID № 90-178; или

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178; или

iii. направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 90-178; или

iv. направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID № 90-113; или

v. направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID № 90-95; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 015. Композиция согласно варианту воплощения изобретения 14 для применения в изменении последовательности ДНК в пределах гена TRAC в клетке.

Вариант воплощения изобретения 016. Композиция согласно варианту воплощения изобретения 14 для применения при снижении экспрессии гена TRAC в клетке.

Вариант воплощения изобретения 017. Композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 11-17 для применения в иммунотерапии субъекта.

Вариант воплощения изобретения 018. Клетка, измененная с помощью способа по любому из вариантов воплощения изобретения 1-10.

Вариант воплощения изобретения 019. Клетка согласно варианту воплощения изобретения 18, где клетка изменена *ex vivo*.

Вариант воплощения изобретения 020. Клетка согласно варианту воплощения изобретения 18 или варианту воплощения изобретения 19, где клетка является Т-клеткой.

Вариант воплощения изобретения 021. Клетка согласно любому из вариантов воплощения изобретения 18-20, где клетка представляет собой CD3⁺, CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетку.

Вариант воплощения изобретения 022. Клетка согласно любому из вариантов воплощения изобретения 18-21, где клетка представляет собой клетку млекопитающего, примата или клетку человека.

Вариант воплощения изобретения 023. Клетка согласно любому из вариантов воплощения изобретения 18-21 для применения в иммунотерапии субъекта.

Вариант воплощения изобретения 024. Способ по любому из вариантов воплощения изобретения 1-10, дополнительно содержащий:

а. индуцирование двухцепочечного разрыва (DSB) в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в клетке и/или субъекте; или

б. индуцирование одноцепочечного разрыва (SSB) в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в клетке и/или субъекте; или

в. снижение экспрессии генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в клетке и/или субъекте.

Вариант воплощения изобретения 025. Способ или композиция для применения по любому из вариантов воплощения изобретения 1-3, 7-13, где композиция приводит к редактированию генов TRBC1 и/или TRBC2.

Вариант воплощения изобретения 026. Способ или композиция для применения по любому из вариантов воплощения изобретения 4-10 и 14-17, где композиция приводит к редактированию гена TRAC.

Вариант воплощения изобретения 027. Способ или композиция для применения по любому из вариантов воплощения изобретения 7-10, где композиция приводит к редактированию гена TRBC и гена TRAC.

Вариант воплощения изобретения 028. Способ или композиция для применения по любому из вариантов воплощения изобретения 25-27, где при редактировании рассчитывается процент от редактируемой популяции (процент редактирования или процент инсерций).

Вариант воплощения изобретения 029. Способ или композиция для применения по любому из вариантов воплощения изобретения 25-28, в котором процент редактирования составляет от 10 до 100% от популяции, например, от 30 до 99% из популяции.

Вариант воплощения изобретения 030. Способ или композиция для применения по любому из вариантов воплощения изобретения 25-29, в котором процент редактирования составляет от 30 до 35%, от 35 до 40%, от 40 до 45%, от 45 до 50%, от 50 до 55%, от 55 до 60%, от 60 до 65%, от 65 до 70%, от 70 до 75%, от 75 до 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95% или от 95 до 99% от популяции.

Вариант воплощения изобретения 031. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-3, 7-13, 17 и 24-30, где композиция содержит sgРНК, содержащую:

- а. любую из SEQ ID № 179-184; или
 - б. направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID № 1-89;
- или
- в. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID № 1-24; или
 - г. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID № 1-6.

Вариант воплощения изобретения 032. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 4-10, 14-17 и 24-30, где композиция содержит sgРНК, содержащую:

- а. направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID № 90-178;
- или
- б. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID № 90-113; или
 - в. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID № 90-95.

Вариант воплощения изобретения 033. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 и 24-32, где целевая последовательность находится в экзоне 1, 2, 3 или 4 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 034. Способ или композиция согласно варианту воплощения изобретения 33, где целевая последовательность находится в экзоне 1 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 035. Способ или композиция варианта воплощения изобретения 33, где целевая последовательность находится в экзоне 2 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 036. Способ или композиция варианта воплощения изобретения 33, где целевая последовательность находится в экзоне 3 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 037. Способ или композиция варианта

воплощения изобретения 33, где целевая последовательность находится в экзоне 4 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 038. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 33-37, где целевая последовательность находится в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC человека.

Вариант воплощения изобретения 039. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-38, где направляющая последовательность комплементарна целевой последовательности в положительной цепи TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 040. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-38, где направляющая последовательность комплементарна целевой последовательности в отрицательной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 041. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-40, где первая направляющая последовательность комплементарна первой целевой последовательности в положительной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, и где композиция дополнительно содержит вторую направляющую последовательность, которая комплементарна второй целевой последовательности в отрицательной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 042. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-41, где направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любого из SEQ ID № 1-178, и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID № 200, где нуклеотиды SEQ ID № 200 следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце.

Вариант воплощения изобретения 043. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-41, где направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любого из SEQ ID № 1-178, и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID № 201, где нуклеотиды SEQ ID № 201 следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце.

Вариант воплощения изобретения 044. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-43, где направляющая РНК модифицируется в соответствии с паттерном SEQ ID № 300, в которой N вместе представляют собой любую из направляющих последовательностей Таблицы 1 (SEQ ID № 1-89).

Вариант воплощения изобретения 045. Способ или композиция варианта воплощения изобретения 44, где каждый N в SEQ ID № 300 представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, где N образуют направляющую последовательность, и направляющая последовательность нацеливает Cas9 на гены

TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 046. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 42-44, где sgРНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID № 1-89.

Вариант воплощения изобретения 047. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-46, где направляющая РНК содержит по меньшей мере одну модификацию.

Вариант воплощения изобретения 048. Способ или композиция согласно варианту воплощения изобретения 47, где по меньшей мере одна модификация содержит 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид.

Вариант воплощения изобретения 049. Способ или композиция согласно варианту воплощения изобретения 47 или 48, содержащие фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

Вариант воплощения изобретения 050. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 47-49, содержащая 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

Вариант воплощения изобретения 051. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 47-50, содержащая модификацию одного или более из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 052. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 47-51, содержащие модификацию одного или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 053. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 47-52, содержащие связь PS между первыми четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 054. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 47-53, содержащие связь PS между последними четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 055. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 47-54, содержащие модифицированный 2'-О-Ме нуклеотид в первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 056. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 47-55, содержащие модифицированный 2'-О-Ме нуклеотид на последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 057. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 47-56, где направляющая РНК содержит модифицированные нуклеотиды SEQ ID № 300.

Вариант воплощения изобретения 058. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-57, где композиция дополнительно

содержит фармацевтически приемлемый наполнитель.

Вариант воплощения изобретения 059. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-58, где направляющая РНК связана с липидной наночастицей (LNP).

Вариант воплощения изобретения 060. Способ или композиция согласно варианту воплощения изобретения 59, в котором LNP содержит биоразлагаемый ионизируемый липид.

Вариант воплощения изобретения 061. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 60, в котором ионизируемый липид представляет собой
 $(9Z,12Z)\text{-}3\text{-}((4,4\text{-бис(октилокси)бутаноил)окси})\text{-}2\text{-}(((3\text{-}(\text{диэтиламино})пропокси)карбонил)окси)\text{-}метилпропилоктадека\text{-}9,12\text{-}диеноат$, также называемый $3\text{-}((4,4\text{-бис(октилокси)бутаноил)окси})\text{-}2\text{-}(((3\text{-}(\text{диэтиламино})пропокси)карбонил)окси)метилпропил\text{-}(9Z,12Z)\text{-}октадека\text{-}9,12\text{-}диеноат$.

Вариант воплощения изобретения 062. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 59-61, где LNP содержит нейтральный липид.

Вариант воплощения изобретения 063. Способ или композиция согласно варианту воплощения изобретения 62, где нейтральный липид представляет собой DSPC.

Вариант воплощения изобретения 064. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 59-63, где LNP содержит вспомогательный липид.

Вариант воплощения изобретения 065. Способ или композиция согласно варианту воплощения изобретения 64, где вспомогательный липид представляет собой холестерин.

Вариант воплощения изобретения 066. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 59-65, где LNP содержит липид-невидимку.

Вариант воплощения изобретения 067. Способ или композиция согласно варианту воплощения изобретения 66, где липид-невидимка представляет собой PEG2k-DMG.

Вариант воплощения изобретения 068. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-66, где композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 069. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-68, где композиция дополнительно содержит иРНК, которая кодирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 070. Способ или композиция согласно варианту воплощения изобретения 68 или 69, где РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cas9.

Вариант воплощения изобретения 071. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-17 или 24-70, где композиция представляет собой фармацевтический препарат и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант воплощения изобретения 072. Способ, композиция или клетка по любому из вариантов воплощения изобретения 1-3, 7-13, 17, 24, 25, 27-31 или 33-71, где

Вариант воплощения изобретения 085. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-3, 7-13, 17, 24, 25, 27-31 или 33-71, где последовательность, выбранная из SEQ ID № 1-89, представляет собой SEQ ID № 14.

Вариант воплощения изобретения 112. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-3, 7-13, 17, 24, 25, 27-31 или 33-71, где

Вариант воплощения изобретения 246. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 4-10, 14-17, 24, 26-30 или 32-71, где последовательность, выбранная из SEQ ID № 90-178, представляет собой SEQ ID № 175.

Вариант воплощения изобретения 247. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 4-10, 14-17, 24, 26-30 или 32-71, где последовательность, выбранная из SEQ ID № 90-178, представляет собой SEQ ID № 176.

Вариант воплощения изобретения 248. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 4-10, 14-17, 24, 26-30 или 32-71, где последовательность, выбранная из SEQ ID №: 90-178, представляет собой SEQ ID №: 177.

Вариант воплощения изобретения 249. Способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 4-10, 14-17, 24, 26-30 или 32-71, где последовательность, выбранная из SEQ ID №: 90-178, представляет собой SEQ ID №: 178.

Вариант воплощения изобретения 250. Применение композиции, состава или клетки любого из предыдущих вариантов воплощения изобретения для изготовления лекарственного средства.

Вариант воплощения изобретения 251. Композиция, состав или клетка любого из предыдущих вариантов воплощения изобретения для применения в качестве лекарственного средства.

Вариант воплощения изобретения 252. Клетка по любому из вариантов воплощения изобретения 18-23, не имеющая эндогенного Т-клеточного рецептора, для получения Т-клетки экспрессирующей не эндогенный Т-клеточный рецептор.

Вариант воплощения изобретения 253. Клетка по любому из вариантов воплощения изобретения 18-23, не имеющая эндогенного Т-клеточного рецептора, для получения Т-клетки, экспрессирующей CAR.

Вариант воплощения изобретения 254. Клетка по любому из вариантов воплощения изобретения 18-23, где измененная клетка является клеткой CD3⁻.

Вариант воплощения изобретения 255. Клетка по любому из вариантов воплощения изобретения 18-23, в которой клетка представляла собой клетку CD3⁺ до изменения, а измененная клетка представляет собой клетку CD3⁻.

Вариант воплощения изобретения 256. Популяция клеток, содержащая клетки по любому из вариантов воплощения изобретения 18-23, где более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 55%, более чем приблизительно 60%, более чем приблизительно 65%, более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 75%, более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 85%, более чем приблизительно 90%, более чем приблизительно 95%, более чем приблизительно 98% или более чем приблизительно 99% измененной популяции являются CD3⁻ клетками.

Вариант воплощения изобретения 257. Популяция согласно варианту воплощения изобретения 256, где более чем приблизительно 90% популяции составляют CD3⁻.

Вариант воплощения изобретения 258. Популяция согласно варианту воплощения изобретения 256, где более чем приблизительно 95% популяции составляют CD3⁻.

Вариант воплощения изобретения 259. Популяция согласно варианту воплощения изобретения 256, где более чем приблизительно 99% популяции составляют CD3⁺.

Вариант воплощения изобретения 260. Популяция клеток, содержащая клетки по любому из вариантов воплощения изобретения 18-23, где более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 55%, более чем приблизительно 60%, более чем приблизительно 65%, более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 75%, более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 85%, более чем приблизительно 90%, более чем приблизительно 95%, более чем приблизительно 98% или более чем приблизительно 99% популяции не имеет эндогенного Т-клеточного рецептора.

Вариант воплощения изобретения 261. Популяция, согласно варианту воплощения изобретения 260, где более чем приблизительно 90% популяции не имеют эндогенного Т-клеточного рецептора.

Вариант воплощения изобретения 262. Популяция, согласно варианту воплощения изобретения 260, где более чем приблизительно 95% популяции не имеют эндогенного Т-клеточного рецептора.

Вариант воплощения изобретения 263. Популяция, согласно варианту воплощения изобретения 260, где более чем приблизительно 99% популяции не имеют эндогенного Т-клеточного рецептора.

Вариант воплощения изобретения 264. Популяция клеток, содержащая клетки по любому из вариантов воплощения изобретения 18-23, где экспрессия генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в популяции снижена по сравнению с неизменной популяцией той же клетки по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 55%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 65%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%.

Вариант воплощения изобретения 265. Популяция согласно варианту воплощения изобретения 264, где снижение экспрессии генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC составляет по меньшей мере приблизительно 90%.

Вариант воплощения изобретения 266. Популяция согласно варианту воплощения изобретения 264, где снижение экспрессии генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC составляет по меньшей мере приблизительно 95%.

Вариант воплощения изобретения 267. Популяция согласно варианту воплощения изобретения 264, где снижение экспрессии генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC составляет по меньшей мере приблизительно 99%.

Вариант воплощения изобретения 268. Популяция по любому из вариантов воплощения изобретения 264-267, в которой снижение обусловлено экспрессией гена TRBC1.

Вариант воплощения изобретения 269. Популяция по любому из вариантов

воплощения изобретения 264-267, в которой снижение обусловлено экспрессией гена TRBC2.

Вариант воплощения изобретения 270. Популяция по любому из вариантов воплощения изобретения 264-267, в которой снижение обусловлено экспрессией гена TRAC.

Вариант воплощения изобретения 271. Популяция клеток, содержащая клетки по любому из вариантов воплощения изобретения 18-23, где от 10 до 100% популяции, например от 30 до 99% популяции имеет инсерцию в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 272. Популяция согласно варианту воплощения изобретения 271, в которой от 30 до 35%, от 35 до 40%, от 40 до 45%, от 45 до 50%, от 50 до 55%, от 55 до 60%, от 60 до 65%, от 65 до 70%, от 70 до 75%, от 75 до 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95% или от 95 до 99% популяций имеют инсерцию в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

Вариант воплощения изобретения 273. Популяция согласно вариантам воплощения изобретения 271 или 272, в которых инсерция находится в гене TRBC1.

Вариант воплощения изобретения 274. Популяция согласно вариантам воплощения изобретения 271 или 272, в которых инсерция находится в гене TRBC2.

Вариант воплощения изобретения 275. Популяция согласно вариантам воплощения изобретения 271 или 272, в которых инсерция находится в гене TRAC.

[00298] Это описание и примеры вариантов воплощения изобретения не следует рассматривать как ограничение. Целью данного описания и прилагаемой формулы изобретения, если не указано иное, все числа, выражающие количества, проценты или пропорции, а также другие числовые значения, используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать, как модифицированные во всех случаях термином «приблизительно» до такой степени, что они уже не так модифицированы. Соответственно, если не указано другие, числовые параметры, изложенные в ниже следующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными значениями, которые могут изменяться в зависимости от требуемых свойств, которые должны быть получены. По меньшей мере, и не как попытка ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр должен по меньшей мере быть истолкован, в свете количества приведенных значащих цифр и с применением обычных способов округления.

[00299] Следует отметить, что, как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа, а также употребление любого слова в единственном числе включает множественное число, если явно и однозначно не ограничивается определенно одним референтом. Используемый в данном документе термин «включать» и его грамматические варианты не предназначены для ограничения, так что перечисление элементов в списке не исключает других подобных элементов, которые могут быть заменены или добавлены к перечисленным пунктам.

ПРИМЕРЫ

[00300] Следующие ниже примеры предоставляются для того, чтобы проиллюстрировать определенные раскрытые варианты воплощения изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие данное изобретение любым способом.

Пример 1: Материалы и способы

Выделение геномной ДНК

[00301] Трансфицированные клетки HEK293 Cas9 собирали после трансфекции через 24 часа. gДНК экстрагировали из каждой лунки 96-луночного планшета, используя 50 мкл/лунка раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen, Cat. QE09050) в соответствии с протоколом производителя. Образцы ДНК были подвергнуты ПЦР и последующему NGS-анализу, как описано в данном документе.

Секвенирование нового поколения (NGS) и анализ эффективности целевого расщепления

[00302] Для того, чтобы количественно определить эффективность редактирования в целевом участке генома, было применено глубокое секвенирование, для выявления наличия вставок и делеций, введенных путем редактирования гена. Праймеры для ПЦР были сконструированы вокруг целевого сайта в пределах рассматриваемого гена (например, TRAC), и рассматриваемая область генома была амплифицирована. Дизайн последовательности праймеров был выполнен, как принято в данной области техники.

[00303] Дополнительную ПЦР выполняли в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химии для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Считывания были сопоставлены с эталонным геномом (например, hg38) после исключения тех, которые имели низкие баллы качества. Были выбраны чтения, которые перекрывали рассматриваемую целевую область, и было рассчитано количество чтений дикого типа по сравнению с числом чтений, содержащих вставку или удаление («индел»).

[00304] Процент редактирования (например, «эффективность редактирования» или «процент инсерций») определяется как общее количество считываний последовательности со вставками или делециями («индел») или «инсерции») по сравнению с общим количеством считываний последовательностей, включая дикий тип.

[00305] Пример 2: Дизайн направляющей TRAC и скрининг в клетках HEK

Дизайн человеческой направляющей TRAC

[00306] Первоначальный отбор направляющей был выполнен *in silico* с применением эталонного генома человека (например, hg38) и определяемых пользователем геномных областей, представляющих интерес (например, экзоны, кодирующие белок TRAC), для идентификации PAM в рассматриваемых областях. Для каждого идентифицированного PAM были проведены анализы и представлены статистические данные. Молекулы gРНК были дополнительно отобраны и ранжированы на основе ряда критериев, известных в данной области техники (например, содержание GC, прогнозируемая целевая активность и потенциальная нецелевая активность).

[00307] Было разработано в общей сложности 88 направляющих РНК для TRAC

(ENSG00000277734), нацеленных на экзоны кодирующие области белка и интрон 1. Представлены последовательности направляющих и соответствующие геномные координаты (Таблица 2).

[00308] Был проведен скрининг направляющих на эффективность редактирования в HEK293_Cas9 клетках. Клеточную линию HEK293 аденокарциномы почки эмбриона человека, конститутивно экспрессирующую Spv Cas9 («HEK293_Cas9»), культивировали в DMEM среде с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки высевали с плотностью 10000 клеток/лунку в 96-луночный планшет примерно за 24 часа до трансфекции (~70% *конфлюэнтности* на момент трансфекции). Клетки трансфицировали в двух экземплярах с помощью Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Cat. 13778150) в соответствии с протоколом производителя. Клетки трансфицировали липopleксом, содержащим индивидуальную направляющую (25 нМ), trRNA (25 нМ), липофектамин (Lipofectamine RNAiMAX) (0,3 мкл/лунка) и OptiMem. Выделение ДНК и NGS-анализ выполняли, как описано в Примере 1. На Фигуре 1 и в Таблице 5 показаны % инсерций в локусе TRAC этих направляющих в клетках HEK293_Cas9.

[00309] Таблица 5: Редактирующие TRAC направляющие в клетках HEK_293 Cas9

SEQ ID №:	% Инсерции (Среднее значение)	SD	SEQ ID №:	% Инсерции(С реднее значение)	SD
90	53,1	13	135	0,7	0,3
91	51,9	5,2	136	0,1	0,1
92	29,8	15,8	137	0,1	0,1
93	35,1	16,1	138	0,5	0,2
94	55,4	9	139	0,5	0,1
96	6,6	2,3	140	0,3	0,1
97	35,3	9,8	141	0,1	0
98	15,6	4,2	142	0,4	0,1
99	32	9,5	143	0,4	0,1
100	40	14,3	144	1,3	0,8
101	17	4,1	145	0,2	0,1
102	32,9	7,8	146	0,1	0
103	24,8	3,1	147	0,1	0,1
104	47,2	15,7	148	2,5	1,2
105	34,7	13,9	149	3	1
106	27,4	3,8	150	0,2	0,1

107	54,9	17,8	151	0,7	0,4
108	28,2	7,9	152	0,2	0,1
109	54,4	14	153	0,7	0,1
110	52,9	9,5	154	0,3	0,1
111	22,6	5	155	0,1	0,1
112	46,8	15,3	156	0,1	0
113	41,6	10,8	157	0,1	0,1
114	0,4	0,1	158	0,1	0,1
115	26,4	9,4	159	0,2	0,1
116	22,8	3,3	160	0,1	0
117	8,9	1,8	161	0,7	0,2
118	0	0	162	0,1	0,1
119	5,3	1,1	163	0,7	0
120	0,4	0,1	164	0,1	0
121	0,2	0,1	165	0	0
122	1,2	0,6	166	0,3	0
123	2,2	0,4	167	0,3	0,3
124	0,3	0,1	168	0,1	0,1
125	0,1	0	169	0,5	0,2
126	0,1	0,1	170	0,2	0,1
127	0	0	171	0,2	0,1
128	0,4	0,4	172	0,2	0,1
129	1,1	0,3	173	0	0
130	1,6	0,7	174	0,1	0
131	0,2	0,1	175	0,1	0,1
132	0,4	0,1	176	0,1	0
133	2,5	0,5	177	0,1	0,1
134	0,5	0,2	178	0,1	0

[00310] Пример 3: Скрининг направляющей TRAC в человеческих Т-клетках CD3⁺

[00311] В отношении 24 направляющих с высоким процентом редактирования инсерций в клетках HEK293_Cas9 из Примера 2 был проведен скрининг на эффективность редактирования и нокдаун Т-клеточного рецептора (TCR) в человеческих Т-клетках CD3⁺. Т-клетки CD3⁺, состоят из множественных популяций Т-клеток, включая CD4⁺ Т-хелперные клетки и CD8⁺ цитотоксические Т-клетки. Эти клетки можно выделить из цельной крови или лейкофереза из образцов. Т-клетки можно модифицировать так, чтобы

они были специфически нацелены на раковые клетки и были менее иммуногенными, путем конструирования Т-клеток пациента с применением Cas9-опосредованного редактирования. В этом примере описывается базовый способ, используемый для доставки Cas9 RNP, например Cas9 RNP, нацеленный на TRAC, в Т-клетках. Чтобы адаптировать этот протокол к другой мишени Т-клетки (например, любой из тех, что предоставлены в данном документе), необходимо будет изменить только нацеливающую crPHK в RNP.

Доставка RNP в Т-клетки

[00312] Т-клетки были либо получены коммерчески (например, Т-клетки CD4⁺CD45RA⁺ периферической крови человека, Frozen, Stem Cell Technology, Cat. 70029), либо были получены внутренне из лейкопака. Для внутреннего приготовления Т-клетки сначала обогащали из лейкопака с применением коммерчески доступного набора (например, EasySep™ Human T Cell Isolation Kit, Stem Cell Technology). Обогащенные Т-клетки были разделены на аликвоты и заморожены (5×10^6 /флакон) для будущего применения. Затем флаконы при необходимости размораживали и активировали добавлением гранул CD3/CD28 в соотношении 3:1 (Dynabeads, Life Technologies) в Т-клеточную среду (RPMI 1640, FBS, L-глутамин, заменимые аминокислоты, пируват натрия, буфер HEPES, 2-меркаптоэтанол и, необязательно, IL2). RNP получали путем предварительного отжига отдельных crPHK и trPHK путем смешивания эквивалентных количеств реагента и инкубирования при 95° С в течение 2 минут и охлаждения до комнатной температуры. Двойную направляющую (dgPHK), состоящую из предварительно отоженных crPHK и trPHK, инкубировали с белком Spy Cas9 с образованием комплекса рибонуклеопротеина (RNP). Т-клетки CD3⁺ трансфицировали в трех повторностях с помощью RNP, содержащего Spy Cas9 (10 нМ), индивидуальную направляющую (10 нМ) и индикаторную PHK (10 нМ), для нуклеофекции использовали 96-луночный набор P3 Primary Cell 96-well Nucleofector™ Kit (Lonza, Cat. V4SP-3960) с применением протокола производителя Amaxa™ 96-луночного Shuttle™ для стимулированных Т-клеток человека. Среду для Т-клеток добавляли к клеткам сразу после нуклеофекции и культивировали в течение 2 дней или более.

[00313] Через два дня после нуклеофекции получали геномную ДНК, как описано в Примере 1, и выполняли NGS-анализ. В Таблице 6 и на Фигуре 2 показаны результаты для частоты инсерций после редактирования TRAC с различными направляющими в Т-клетках CD3⁺.

[00314] Таблица 6: Частота инсерций для редактирования TRAC в Т-клетках CD3⁺ человека

SEQ ID №:	Частота инсерций	Стандартное отклонение	Номер образца (n)
90	79,3%	1,5%	3
91	86,9%	1,2%	3

92	79,0%	1,9%	3
93	82,6%	1,4%	3
96	0,7%	0,1%	3
97	55,2%	3,1%	3
98	15,5%	1,0%	3
99	27,9%	0,9%	3
100	57,7%	3,0%	3
101	26,2%	0,8%	3
102	31,2%	0,8%	3
103	58,1%	1,8%	3
104	62,0%	2,8%	3
105	47,8%	2,0%	3
106	52,0%	2,7%	3
108	27,7%	1,9%	3
109	72,7%	3,7%	3
110	33,0%	2,2%	3
111	36,9%	1,3%	3
112	76,7%	1,0%	3
113	65,7%	4,3%	3

[00315] Проточно-цитометрический анализ экспрессии TCR

[00316] Экспрессию TCR измеряли на 4 день после нуклеофекции. Клетки окрашивали красителем, для отличия *живых* и *мертвых клеток* (Thermo fisher L34975), и TCR определяли с применением антитела Alexa Fluor® 647 anti-TCR-αβ человека (Biolegend, Cat. 306714). Клетки инкубировали с 2 мкл антител в течение по меньшей мере 20 минут на льду, анализировали проточной цитометрией с применением, например, Beckman Coulter CytoflexS). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Flow Jo. Популяцию живых клеток анализировали на потерю TCR. Результаты показаны в Таблице 7 и на Фигуре 3.

[00317] Таблица 7: Экспрессия TCR после редактирования TRAC в Т-клетках CD3⁺

SEQ ID №:	Донор 1 - % TCR- отрицательные	Донор 1 - стандартное отклонение	Донор 2 - % TCR- отрицательные	Донор 2 - стандартное отклонение
90	80,2	19,5	84,9	3,6
91	95,3	1,4	80,7	20,5
92	93,5	0,3	87,6	3,4

93	95,9	0,6	91,7	5
94	73,5	28,3	90,2	2,1
96	3,6	0,8	1,8	0,4
97	59,9	0,9	51,3	0,4
98	17,9	1,1	11,5	1,2
99	32,9	1,1	30,4	2,3
100	61,4	1,7	55,8	3,4
101	28,8	1,3	24,6	2
102	28,7	0,5	20,7	1
103	58,2	6,4	41,6	0,4
104	68	5,7	58	3,2
105	46,8	3,3	46,2	1,5
106	58	1,6	51,6	1,7
107	62,3	4,6	62,2	0,9
108	3,3	0,3	2,6	0,4
109	4,5	0,5	4,2	0,5
110	33,1	2,5	35,1	10,9
111	5,1	0,1	3,7	0,3
112	10,5	0,2	17,7	12,3
113	6,3	0,7	5,7	1
116	19,3	1,5	13,7	0,4

[00318] Пример 4: Дизайн и скрининг направляющей TRBC и в клетках HEK

Дизайн направляющей TRBC человека

[00319] Первоначальный выбор направляющих для редактирования человеческого TRBC1 (ENSG00000211751) и TRBC2 (ENSG00000211772) был таким, как описано в Примере 2. Всего было разработано 89 направляющих РНК: 2 нацелены только на TRBC1 (SEQ ID №: 11 и SEQ ID №: 26), 2 нацелены только на TRBC2 (SEQ ID №: 8) и 86 нацелены как на TRBC1, так и на TRBC2. Направляющие были разработаны для нацеливания на экзоны кодирующие белок. Направляющие и соответствующие геномные координаты приведены выше (Таблица 1).

[00320] Направляющие TRBC были проверены с помощью скрининга на эффективность редактирования в клетках HEK293_Cas9. Трансфекцию выполняли, как описано в Примере 2. Выделение ДНК и NGS анализ выполняли, как описано в Примере 1. На Фиг.4А, 4В и в Таблице 8 показаны % инсерций в локусах TRBC1 и TRBC2 этими направляющими в клетках HEK293_Cas9.

[00321] Таблица 8: Редактирование направляющей TRBC в клетках HEK293_Cas9

SEQ ID №:	TRBC1 Среднее значение инсерций %	TRBC 1 SD	Количество значений (n)	TRBC2 Среднее значение инсерций %	TRBC2 SD	Количес тво значений (n)
1	22,7	4,8	3	28,0	5,9	3
2	50,6	2,9	3	56,9	3,1	3
3	28,7	3,5	3	41,9	4	3
4	53,4	8,6	3	34,4	Не применимо	1
5	33,9	7,7	3	29,5	7,1	3
6	54,8	8	3	48,7	7,7	3
7	47,3	4	3	43,9	3,8	3
8	30,2	3,5	3	38,6	2,5	3
9	29,5	6,4	3	30	6,5	3
10	31,5	4,6	3	41,7	5,9	3
11	38,4	9,7	3	2,6	0,8	3
12	29,6	5	3	28,1	6	3
13	61,7	4,9	3	65,7	4,4	3
14	31,5	7,8	3	38,3	8	3
15	24,2	7,5	3	31,7	10,3	3
16	33	2,6	3	34,9	3,2	3
17	37,4	9,3	3	32,3	8,2	3
18	43	9,4	3	37,6	7,9	3
19	22,2	8,6	3	30,2	9,3	3
20	38,7	8,9	3	48,5	10,4	3
21	40,9	5	3	31,3	3,6	3
22	33,1	7,5	3	28,3	7,4	3
23	36,4	2,2	3	22,7	0,8	3
24	32,6	4,2	3	29,5	3,8	3
26	22,5	2,6	3	2,9	0,3	3
27	3,7	0,2	3	3,2	0,3	3
28	0,1	0	3	0,1	0,1	3
29	0,3	0,1	3	0,4	0,2	3

30	0,2	0,1	3	0,3	0,2	3
31	0,1	0	3	0,2	0,1	3
32	0,2	0,1	3	0,2	0,1	3
33	0,4	0,1	3	0,2	0,1	3
34	0,4	0,1	3	0,3	0,1	3
35	0	0,1	3	0,1	0,1	3
36	0,3	0,1	3	0,3	0,1	3
37	0,8	0,1	3	0,5	0,2	3
38	0,3	0,1	3	0,3	0,1	3
39	2,2	0,4	3	2,2	0,4	3
40	0,1	0,1	3	0,2	0,1	3
41	0,1	0	3	0,2	0,1	3
42	0,1	0,1	3	0,2	0,1	3
43	0,2	0	3	0,1	0,1	3
44	0,2	0	3	0,3	0,1	3
45	0,1	0,1	3	0,1	0	3
46	0,1	0	3	0,1	0	3
47	0,1	0	3	0,2	0,1	3
48	0,2	0,2	3	0,3	0,1	3
49	0,1	0	3	0,1	0	3
50	0,3	0,1	3	0,2	0,1	3
51	0,4	0,1	3	0,4	0,1	3
52	0,2	0,1	3	0,1	0,1	3
53	1,6	0,2	3	1,8	0,2	3
54	0,2	0,1	3	0,3	0,1	3
55	0,1	0,1	3	0	Не применимо	1
56	0,2	0,1	3	0,4	0,1	3
57	0,1	0	3	0,1	0	3
58	5,8	1,3	3	5	1,1	3
59	0,3	0,1	3	0,2	0,1	3
60	0,3	0,1	3	0,2	0,1	3
61	1	0,2	3	1,6	0,3	3
62	1,7	0,3	3	2,2	0,2	3

63	0,3	0,1	3	0,3	0,1	3
64	0,2	0,1	3	0,3	0,1	3
65	0,2	0	3	0,2	0	3
66	0,1	0,1	3	0,2	0,1	3
67	0,1	0	3	0,1	0,1	3
68	0,7	0,2	3	0,6	0,1	3
69	0	0,1	3	0,1	0,1	3
70	0,1	0,1	3	0,1	0,1	3
71	18,9	5,1	3	24,2	6	3
72	13,8	3	3	14,2	2,6	3
73	12,9	2,9	3	18,4	3,3	3
74	3,3	0,4	3	4,2	1,2	3
75	8,3	1,1	3	13	1,4	3
76	0,3	0	3	0,1	0,1	3
77	18,5	1,3	3	15,1	1,3	3
78	22,2	2,8	3	23,3	2,2	3
79	14,6	2,5	3	13,6	2,6	3
80	0,4	0,1	3	0,5	0,2	3
81	0,3	0,1	3	0,5	0,1	3
82	15,9	2,3	3	9,1	1,8	3
83	13,6	5	3	16,8	5,5	3
84	0,8	0,3	3	0,7	0,1	3
85	6,9	1,2	3	6,3	1,5	3
86	9,7	2	3	9	1,8	3
87	0,7	0,1	3	0,2	0,2	3
88	15,8	1,7	3	13,9	1,6	3
89	5	0,6	3	6,3	0,3	3

[00322] Пример 5: Скрининг TRBC направляющих в CD3⁺ Т-клетках человека

[00323] TRBC направляющие с высоким процентом инсерций для редактирования в клетках HEK293_Cas9 из Примера 4 были проверены на эффективность редактирования и экспрессию Т-клеточного рецептора (TCR) в человеческих CD3⁺ Т-клетках. Нуклеофекцию, анализ редактирования и анализ экспрессии TCR выполняли, как в Примере 3. В Таблице 9 и на Фигуре 5 показаны результаты частоты инсерций после редактирования TRBC с различными направляющими в CD3⁺ Т-клетках. В Таблице 10 и на Фигуре 6 показаны измерения экспрессии TCR (как % TCR-отрицательных клеток)

после TRBC редактирования в CD3⁺ Т-клетках.

Таблица 9: Частота инсерций на TRBC1 в CD3⁺ Т-клетках

SEQ ID №:	Средняя частота инсерций	Стандартное отклонение	Номер образца (n)
1	42,40%	0,80%	3
2	50,50%	3,90%	3
3	45,80%	3,00%	3
4	42,50%	3,40%	3
5	45,00%	5,00%	3
6	53,50%	2,40%	3
7	37,30%	7,90%	3
8	27,40%	1,50%	3
9	34,00%	3,20%	3
10	28,20%	3,50%	3
11	25,10%	4,60%	3
12	8,30%	0,40%	3
13	34,20%	1,20%	3
14	21,00%	1,30%	3
15	11,60%	2,50%	3
16	45,70%	1,00%	3
17	35,10%	4,60%	3
18	14,10%	1,30%	3
19	30,40%	2,10%	3
20	30,50%	2,70%	3
21	23,80%	0,90%	3
22	35,50%	3,40%	3
23	30,00%	1,10%	3
24	24,80%	1,40%	3

Таблица 10: Экспрессия TCR после TRBC редактирования в CD3⁺ Т-клетках

SEQ ID №:	Донор 1 - % TCR отрицательный	Донор 1 - стандартное отклонение	Донор 2 - % TCR отрицательный	Донор 2 - стандартное отклонение
1	71,2	1,4	74,4	1,3
2	72,4	2,6	79,9	1,5

3	73,3	2,3	76,4	2,8
4	74	0,9	79,2	0,7
5	66,4	1,1	71,5	0,5
6	75	2,2	85,7	1,4
7	53,5	2,2	60,7	2,3
8	18	5,1	30,6	7,6
9	44,4	1,3	59,6	4,1
10	41,2	7,9	47,9	2,3
11	16,3	0,3	20,9	0,7
12	11,8	0,7	14,6	1
13	48,2	12,3	67,2	2
14	23,3	6,5	34,8	3,9
15	22,1	0,8	23,3	1,6
16	60,8	1,7	70,5	0,5
17	42,8	1,4	49,7	0,7
18	20,6	1,8	28,7	8,7
19	45,9	0,8	50,7	1,4
20	55,3	3,2	60,2	1,1
21	39,7	3,4	46,1	0,8
22	39,6	2,1	44,1	1,4
23	33,5	1	43,6	1,1
24	29,5	2,1	32,8	1
25	43,2	1	57	1,5

[00324] Пример 6: Анализ нецелевых последовательностей TRBC и TRAC направляющих.

[00325] Биохимический способ (см. например, Cameron et al., Nature Methods. 6, 600-606; 2017) использовали для определения потенциальных нецелевых сайтов в геноме, расщепляемых Cas9 нацеленным на TRAC, TRBC1 или TRBC2. Направляющие, показывающие большинство CD3-отрицательных клеток в Примере 3 и Примере 5, были протестированы на потенциальные нецелевые сайты геномного расщепления с помощью этого анализа. В этом эксперименте 7 sgPHK нацелены на человеческую TRAC, 6 sgPHK нацелены на TRBC, и две контрольные направляющие с известными нецелевыми профилями были отобраны с применением геномной ДНК изолированной HEK293_Cas. Число потенциальных нецелевых сайтов, обнаруженных с применением RNP концентрации 16 нМ в биохимическом анализе, было нанесено на график Фиг. 7А и показано в Таблице 11. Этим анализом идентифицировано потенциальные нецелевые

сайты для тестируемых sgРНК.

[00326] Таблица 11: Биохимический анализ нецелевых сайтов

SEQ ID №:	Мишень	Количество сайтов
179	TRBC1/2	48
180	TRBC1/2	11
181	TRBC1/2	54
182	TRBC1/2	72
183	TRBC1/2	65
184	TRBC1/2	61
186	TRAC	36
187	TRAC	40
188	TRAC	168
189	TRAC	35
190	TRAC	31
191	TRAC	207
192	TRAC	253
193	EMX1	118
194	VEGFA	1113

Целевое секвенирование для *валидации* потенциальных нецелевых сайтов

[00327] В известных анализах обнаружения нецелевых сайтов, таких как биохимический способ, примененный выше, обычно большое количество потенциальных нецелевых сайтов, как правило, восстанавливается, чтобы «расширить сеть» для потенциальных сайтов, которые могут быть *валидированы* в других контекстах, например, в интересующей первичной клетке. Например, биохимический способ обычно завышает количество потенциальных нецелевых сайтов, поскольку в анализе используется очищенная высокомолекулярная геномная ДНК, выделенная из клетки, и это зависит от используемой дозы Cas9 RNP. Соответственно, потенциальные нецелевые сайты, идентифицированные этими способами, могут быть подтверждены с помощью целевого секвенирования идентифицированных потенциальных нецелевых сайтов.

[00328] В одном подходе, Cas9 и интересующая sgРНК (например, sgРНК, имеющая потенциальные нецелевые сайты для оценки) вводятся в первичные Т-клетки. Затем Т-клетки лизируются и праймеры, фланкирующие потенциальный(-ые) нецелевой(-ые) сайт(-ы), используются для создания ампликона, для NGS анализа. Идентификация инсерций на определенном уровне может подтвердить потенциальный нецелевой сайт, тогда как отсутствие инсерций, обнаруженных в потенциальном нецелевом сайте, может указывать на ложноположительный результат в примененном анализе нецелевых сайтов.

[00329] Направляющие, показывающие целевую активность инсерций, были

протестированы на потенциальные нецелевые сайты геномного расщепления, с помощью этого анализа. В этом эксперименте, 5 sgPHK нацеленных на TRBC1 или TRBC2 человека, и 3 направляющих нацеленных на TRAC человека, были подвергнуты скринингу с применением геномной ДНК, очищенной из объединенных мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) мужского пола вместе с сайтом контрольной направляющей SEQ ID №: 194 (VEGFA) с известными нецелевыми профилями. Количество потенциальных нецелевых сайтов, обнаруженных с применением концентрации направляющей 64 нМ в биохимическом анализе, показано на Фигуре 7В и в Таблице 12.

[00330] Таблица 12: Анализ нецелевых сайтов 64 нМ

SEQ ID №: из sgPHK	Мишень	Направляющая последовательность (SEQ ID №:)	Количество нецелевых сайтов
179	TRBC1/2	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG (SEQ ID №: 1)	190
180	TRBC1/2	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU (SEQ ID №: 2)	15
181	TRBC1/2	AUGACGAGUGGACCCAGGAU (SEQ ID №: 3)	92
183	TRBC1/2	UGAGGGUCUCGGCCACCUUC (SEQ ID №: 5)	127
184	TRBC1/2	AGAGAUCUCCACACCCAAA (SEQ ID №: 6)	90
186	TRAC	CUCUCAGCUGGUACACGGCA (SEQ ID №: 90)	32
192	TRAC	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGU (SEQ ID №: 185)	293
206	TRAC	UAGGCAGACAGACUUGUCAC (SEQ ID №: 214)	114
194	VEGFA	См. Таблицу 3	2945

[00331] Пример 7: Применение TRAC и TRBC направляющих для множественного редактирования

[00332] Направляющие также были протестированы на одновременное редактирование локусов TRAC и TRBC. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от 3 различных здоровых доноров были выделены из лейкоцитарной пленки с применением *Лимфопрепа*[™] (Lymphoprep[™]) (Stem Cell Technology) для центрифугирования в градиенте плотности. Эти клетки были активированы и отсортированы с применением *парамагнитных частиц* (Dynabeads[™]) ClinExVivo[™]

CD3/CD28 (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Т-клетки высевали при концентрации 10^6 клеток/мл в гематопозитическую бессывороточную культуральную среду X-VIVO™ 15 (Lonza™) с добавлением 5% FBS, IL7 и IL15 (по 5 нг/мл каждый). Через два дня после стимуляции Т-клетки подвергали электропорации, как описано в Примере 3, одновременно с сгРНК, нацеленной на TRAC, и сгРНК нацеленной на TRBC. Используя клетки от одного донора, TRAC и TRBC направляющие были электропорированы в изоляции. На 6 день после стимуляции гранулы отделяли и клетки высевали с концентрацией 1 миллион/мл в X-VIVO™ 15 с добавлением 5% FBS, IL7 и IL15 (по 5 нг/мл каждый). Эффективность нокаута TRAC и TRBC на 7 день оценивали путем оценки процента Т-клеток, лишенных молекулы CD3, по данным проточной цитометрии, как показано на Фигуре 8А и Таблице 13.

[00333] Таблица 13: Эффективность нокаута TCR

SEQ ID №:	CD3+		CD3 отрицательные		Образцы (n)
	средний %	SD	средний %	SD	
95	1	Не применимо	98	Не применимо	1
6	1	Не применимо	99	Не применимо	1
6 и 95	2	1	98	1	3
Суррогат	97	1	2	1	3

Одновременное TRAC и TRBC редактирование с лентивирусной вставкой гена TCR.

[00334] Через три дня после стимуляции отредактированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусным вектором (LV), кодирующим WT1-специфический TCR, полученный от здорового донора (HD1-TCR), произвольно вставляя LV. Кратко, гены α - и β -цепей TCR были выделены, оптимизированы по кодонам, модифицированы цистеином и клонированы в LV под двунаправленным промотором. ДНК и аминокислотные последовательности генов α - и β -цепей HD1 TCR приведены ниже. Альфа-цепь клонировали в антисмысловой ориентации под минимальным человеческим CMV промотором, а бета-цепь в смысловой ориентации под PGK промотором. LV были упакованы с помощью интегразы конструкта третьего поколения и псевдотипированы оболочкой вируса везикулярного стоматита (VSV). Т-лимфоциты инфицировали LV в течение 24 ч. После этого, Т-клетки культивировали при концентрации 10^6 клеток/мл и размножали. Через два дня после трансдукции эффективность трансдукции оценивали путем определения процента Т-клеток, экспрессирующих специфический ген V β (TRBV12-3/TRBV12-4), а также специфический декстрамер (эпитоп: VLDFAPPGA). На 15 день после стимуляции фенотип Т-клеток оценивали с помощью цитофлуориметрического анализа. Фигура 8В и Таблица 14 показывают, что более 45% Т-клеток экспрессировали молекулу CD3 (среднее значение $\pm$ SEM=45,3 $\pm$ 5,7). Процент WT1-специфических CD8⁺ Т-клеток, оцененный путем измерения декстрамера, был

больше 95% (среднее значение $\pm$ SEM=95,3 $\pm$ 0,7). Процент WT1-специфических CD8⁺ Т-клеток, оцененный путем положительного результата измерения декстрамера, был более 95%, когда использовали SEQ ID №: 6 и 95 (среднее значение $\pm$ SEM=95,3 $\pm$ 0,7) (Фиг. 8С, Таблица 14). Фенотип Т-клеток, редактированных Т-клеток оценивали на 15 день, как показано на Фигуре 8D и в Таблице 15.

[00335] SEQ ID №: 250: α -цепь HD1 TCR - последовательность ДНК

[00336]

ATGGAAACCCTGCTGAAGGTGCTGAGCGGCACACTGCTGTGGCAGCTGACAT
GGGTCCGATCTCAGCAGCCTGTGCAGTCTCCTCAGGCCGTGATTCTGAGAGAAGGCG
AGGACGCCGTGATCAACTGCAGCAGCTCTAAGGCCCTGTACAGCGTGCACTGGTAC
AGACAGAAGCACGGCGAGGCCCTGTGTTCTCTGATGATCCTGCTGAAAGGCGGCGA
GCAGAAGGGCCACGAGAAGATCAGCGCCAGCTTCAACGAGAAGAAGCAGCAGTCC
AGCCTGTACCTGACAGCCAGCCAGCTGAGCTACAGCGGCACCTACTTTTGTGGCACC
GCCTGGATCAACGACTACAAGCTGTCTTTCGGAGCCGGCACCACAGTGACAGTGCG
GGCCAATATTCAGAACCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAGCAAGAGCA
GCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAG
AGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCAT
GGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGATTTTCGCCTGCG
CCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGTCCTGAGA
GCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAAC
TTCCAGAACCTGAGCGTGATCGGCTTCAGAATCCTGCTGCTCAAGGTGGCCGGCTTC
AACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGTCCAGCTGA

[00337] SEQ ID №: 251: HD1 α -цепь TCR - аминокислотная последовательность

[00338]

METLLKVLSTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAVINCSSSKALYSVHW
YRQKHGEAPVFLMILLKGGEQKGHEKISASFNEKKQSSLYLTASQLSYSGTYFCGTAW
INDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSD
VYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE
KSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS*

[00339] SEQ ID №: 252: HD1 β -цепь TCR - последовательность ДНК

[00340]

ATGGGATCTTGGACACTGTGTTGCGTGTCCTGTGCATCCTGGTGGCCAAGCA
CACAGATGCCGGCGTGATCCAGTCTCCTAGACACGAAGTGACCGAGATGGGCCAAG
AAGTGACCCTGCGCTGCAAGCCTATCAGCGGCCACGATTACCTGTTCTGGTACAGAC
AGACCATGATGAGAGGCCTGGAAGTCTGATCTACTTCAACAACAACGTGCCCCATC
GACGACAGCGGCATGCCCCGAGGATAGATTCAGCGCCAAGATGCCCAACGCCAGCTT
CAGCACCTGAAGATCCAGCCTAGCGAGCCCAGAGATAGCGCCGTGTACTTCTGCG
CCAGCAGAAAGACAGGCGGCTACAGCAATCAGCCCCAGCACTTTGGAGATGGCACC
CGGCTGAGCATCCTGGAAGATCTGAAGAACGTGTTCCACCTGAGGTGGCCGTGTTT
GAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGC

CACCGGCTTCTATCCCGATCACGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGT
 GCACAGCGGCGTCTGTACCGATCCTCAGCCTCTGAAAGAGCAGCCCGCTCTGAACG
 ACAGCAGATACTGCCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAAC
 CCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGA
 GTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGG
 GCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGTCTGCC
 ACAATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGCTGGTGTCT
 GCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGATAGCAGGGGGCTGA

[00341] SEQ ID №: 253: HD1 β-цепь TCR - аминокислотная последовательность

[00342]

MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYR
 QTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRK
 TGGYSNQPHFGDGTLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH
 VELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQC
 VQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKA
 TLYAVLVLSALVLMAMVVRKDSRG*

[00343] Таблица 14: Эффективность вставки TCR в отредактированные Т-клетки

SEQ ID №:	CD3+		CD3 отрицательные		CD3+CD8+Dx+		Образцы (n)
	Среднее значение %	SD	среднее значение %	SD	среднее значение %	SD	
95	62	Нет данных	39	Нет данных	68	Нет данных	1
6	51	Нет данных	49	Нет данных	88	Нет данных	1
6 и 95	45	10	55	10	95	1	3
суррогат	98	1	2	1	0	0	3

[00344] Таблица 15: Фенотип TCR отредактированных Т-клеток

SEQ ID №	N/Tscm		CM		EM		TemRa		Образцы (n)
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	

РВМС	44	4	25	5	19	3	12	5	3
суррогат	56	12	31	13	9	2	4	2	3
95	93	Нет данных	4	Нет данных	0	Нет данных	2	Нет данных	1
6	94	Нет данных	4	Нет данных	1	Нет данных	2	Нет данных	1
6 и 95	82	8	13	6	3	2	2	0	3

[00345] Т-клетки с TRAC и TRBC отредактированные и вставка LV HD1-TCR были протестированы на способность уничтожать первичный острый миелоидный лейкоз (AML) бластных клеток. Отредактированные Т-клетки были магнитно отсортированы для обогащения по WT1-CD8⁺-специфическим Т-клеткам с применением окрашивания декстрамером и магнитной сортировки. Через 21 день после трансдукции WT1-CD8⁺ Т-клетки культивировали совместно с первичными AML бластными клетками, полученными от 3 разных пациентов, несущих аллель HLA-A* 02:01, и, в качестве контроля, с первичными бластными клетками, не несущими специфический аллель HLA. Совместные культуры высевали при различных соотношениях эффекторов и мишеней (1:1; 5:1; 10:1). После 6 часов совместного культивирования экспрессия каспазы 3 в живых клетках-мишенях была применена, как считывали. Результаты показаны на Фиг. 9А-Д и в Таблице 16. Наблюдали индукцию апоптоза до 43% лейкозных бластных клеток, экспрессирующих WT1 и несущих HLA-A* 02:01 (среднее значение $\pm$ SEM=31 $\pm$ 6,6). Не было обнаружено распознавания против AML бластных клеток, не экспрессирующих аллель HLA-A* 02:01.

[00346] Таблица 16: Уничтожение AML

Условия	Е:F соотношение	Суррогат	HD1-TCR+ средний %	SD
pAML#14	1:1	5,9	22,1	4,9
	5:1	6,7	36,1	10,9
	10:1	7,5	38,6	11,6
pAML#15	1:1	3,6	15,7	16,9
	5:1	4,4	14,5	6,7
	10:1	5,3	18,1	8,1
pAML#16	1:1	3,1	9,4	3,1
	5:1	3,1	14,7	5,5

	10:1	3,4	16,4	5,6
pAML HLA-A*02:01	1:1	16,2	13,2	1,8
	5:1	13,8	9,8	2,2
	10:1	15,1	12,1	2,5

[00347] Пример 8: Дополнительные направляющие TRAC и TRBC для множественного редактирования

[00348] Дополнительные sgRNA также тестировали на одновременное редактирование локусов TRAC и TRBC. Т-клетки подвергали нуклеофекции с помощью RNP, который содержит SEQ ID №: 185, RNP, который содержит SEQ ID №: 6 или смеси обоих видов RNP. Процедуры выполняли, как в Примере 3, за исключением применения гематопоэтической бессывороточной культуральной среды BioWhittaker™ X-VIVO™ 15 (Lonza™, кат. 04-418Q) с добавлением 5% FBS, 50 мкМ бета-меркаптоэтанола, 10 мМ N-ацетил L-Цистина, 1X раствора пенициллин-стрептомицина (Corning, Cat. 30-002-CI) и, необязательно, с IL7 (5 нг/мл), IL15 (5 нг/мл) и IL2 (200-500 Ед/мл). Через семнадцать дней после нуклеофекции Т-клетки собирали и анализировали с помощью NGS. На Фигуре 10 и в Таблице 17 показано редактирование в каждом локусе (как частота инсерций) после одновременной нуклеофекции. Проточная цитометрия также может использоваться для проверки эффективности редактирования путем измерения доли Т-клеток, экспрессирующих белки TCR на своей поверхности.

[00349] Таблица 17: Редактирование с применением нескольких направляющих

Условия	Ампликон	Средняя частота инсерций	Стандартное отклонение
SEQ ID №: 6 и SEQ ID №: 185	TRAC	83,4%	0,3%
	TRBC1	82,2%	0,9%
	TRBC2	77,1%	0,2%
Нет направляющей	TRAC	0,1%	0,1%
	TRBC1	0,4%	0,6%
	TRBC2	1,0%	0,7%

[00350] Пример 9

[00351] Дополнительная пара TRAC и TRBC, нацеленная на sgRNA, была протестирована на предмет комбинированного редактирования, как описано в Примере 7. Т-клетки подвергали нуклеофекции с RNP содержащим SEQ ID №: 95, RNP содержащим SEQ ID №: 2 или смесью обоих видов RNP. Эффективность нокаута TRAC и TRBC оценивали путем оценки процента Т-клеток, лишенных молекулы CD3, с помощью проточной цитометрии, как показано на Фиг. 11А и в Таблице 18.

[00352] Таблица 18: Эффективность нокаута TCR

SEQ ID №:	CD3+		CD3 отрицательные		Образцы (n)
	Среднее значение %	SD	Среднее значение %	SD	
95	0,5	Нет данных	99,5	Нет данных	1
2	10,2	Нет данных	89,3	Нет данных	1
2 и 95	1,8	1,0	98,1	1,0	3
суррогат	96,8	Нет данных	2,4	Нет данных	1

[00353] После лентивирусной трансдукции фенотип Т-клеток оценивали с помощью цитофлуориметрического анализа, как показано на Фиг. 11В и в Таблице 19. Процент WT1-специфичных CD8⁺ Т-клеток оценивали путем измерения положительности декстрамера (Фиг. 11С, Таблица 19). Фенотип Т-клеток, отредактированных Т-клеток показан на Фигуре 11D и в Таблице 20.

[00354] Таблица 19: Эффективность трансдукции TCR в отредактированных Т-клетках

SEQ ID №:	CD3+		CD3 отрицательные		CD3+CD8+Dx+		Образцы (n)
	Среднее значение %	SD	Среднее значение %	SD	Среднее значение %	SD	
суррогат	99,6	Нет данных	0,4	Нет данных	0	Нет данных	1
2 и 95	40,1	5,4	59,9	5,4	93	1	3

[00355] Таблица 20. Фенотип Т-клеток, отредактированных TCR

SEQ ID №	N/Tscm		CM		EM		TemRa		Образцы (n)
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	
PBMC	44	4	25	5	19	3	12	5	3
суррогат	86	Нет данных	10	Нет данных	1	Нет данных	3	Нет данных	1
2 и 95	89	4	8	3	1	0	3	1	3

[00356] Сконструированные клетки примеров 7 и 9 объединяют TRAC gPHK и TRBC gPHK с лентивирусным вектором, который кодирует WT1-специфический TCR,

имеющий α -цепь TCR SEQ ID №: 251 и β -цепь TCR SEQ ID №: 253. Сконструированная клетка может быть изменена путем доставки в клетку первой и второй композиций, при этом первая композиция содержит: (а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из: (i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89; (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89; (iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89; (iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и (v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6; или (б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно (в) РНК направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК направляемый ДНК-связывающий агент; и где вторая композиция содержит лентивирусный вектор, который кодирует WT1-специфический TCR, имеющий α -цепь TCR SEQ ID №: 251 и β -цепь TCR SEQ ID №: 253.

[00357] В некоторых вариантах воплощения сконструированная клетка может быть изменена путем доставки композиции, дополнительно содержащей: (а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из: (i) направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185, и 213-218; (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218; (iii) направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218; (iv) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; и (v) направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95; или (б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а).

[00358] Пример 10. Редактирование с помощью одиночных направляющих.

[00359] Приведенные ниже примеры были выполнены с помощью следующего способа, если в примерах не указано иное.

Выделение геномной ДНК

[00360] Т-клетки собирали через более 48 часов после нуклеотрансфекции. Выделение ДНК выполняли, как описано в Примере 1. Образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему NGS-анализу, как описано в Примере 1.

Доставка RNP в Т-клетки

[00361] Здоровые донорские моноклеарные *клетки периферической крови* (PBMC) или лейкопаки были получены коммерчески, и Т-клетки выделяли путем положительной селекции с применением CD4/CD8 прямо из набора Microbeads (Miltenyi Biotec) или путем отрицательной селекции с применением набора для изоляции Т-клеток (Stem Cell Technology, Каталог №17951) в соответствии с протоколом производителя. Т-клетки были заморожены в замораживающей среде Cryostor CS10 (Каталог № 07930) для

будущего применения. После оттаивания Т-клетки выдерживали в течение ночи в основной среде (XVIVO15 с добавлением 2-меркаптоэтанола, N-ацетилцистеина и 5% АВ сыворотки крови человека или FBS) с добавлением 200 Ед/мл IL2 (Peprotech) и 5 нг/мл каждого из IL7 и IL15. Затем Т-клетки активировали с помощью T Cell Trans Act (Miltenyi Biotec, 130-111-160), как рекомендовано производителем, и культивировали в течение 48-72 часов перед электропорацией.

[00362] Рибонуклеопротеиновый (RNP) комплекс содержащий белок Cas9 и *ggPНК*, был получен первым предварительным отжигом отдельных *crPНК* и *trPНК* путем смешивания эквивалентных количеств реагента и инкубирования при 95° С в течение 2 минут с последующим охлаждением до комнатной температуры. Направляющую(ие) в RNP использовали *crPНК* и *trPНК*, объединенные в одну молекулу ПНК (*single guide RNA* - одиночная направляющая ПНК, *sgPНК*) или в две отдельные молекулы ПНК (*двойная направляющая ПНК* (*dual guide RNA*, *dgPНК*), которые были предварительно отождествлены путем инкубации при 95° С в течение 2 минут с последующим охлаждением до температуры окружающей среды. RNP нацеленные на locus TRAC или TRBC, образовывали комплекс путем смешивания любой SEQ ID №: 186 (TRAC) или SEQ ID №: 180 (TRBC1/2) с SpyCas9 в молярном соотношении 2:1 до конечной концентрации 20 мкМ Cas9-RNP. Для электропорации Т-клетки суспендировали в количестве $5-20 \times 10^6$ клеток/100 мкл с добавлением TRAC и TRBC RNP, добавленных, как указано, до конечной концентрации 2 мкМ RNP. Т-клетки подвергали нуклеофекции с помощью RNP с применением набора реагентов P3 Primary Cell 96-well Nucleofector™ Kit (Lonza, каталог V4SP-3960) или Lonza 4D-Nucleofector X Unit (№ по каталогу: AAF-1002X) с применением буфера P3 и импульсных кодов производителя. Основную среду добавляли к клеткам сразу после электропорации и клеткам давали отдохнуть в течение по меньшей мере 4 часов.

[00363] Для избранных анализов клетки размножали с применением протокола G-Rex. Вкратце, после электропорации перенесите 1×10^6 клеток в 1 мл цитокиновой среды в 1 лунку 24-луночного G-Rex и вирус эквивалентный MOI 3×10^5 в лунку. Через 24 часа доведите объем до 7 мл, используя цитокиновую среду. Каждые 2-3 дня, удаляйте половину среды (3,5 мл), не разрушая клетки, и добавляйте 2X цитокиновую среду. Собирайте материал после того, на 11-13 день.

Окрашивание клеток для проточной цитометрии

[00364] От 4 до 12 дней после нуклеофекции RNP, отредактированные Т-клетки (200 мкл/200 000 клеток) собирали в 96-луночный круглодонный планшет и центрифугировали при 500 g в течение 5 минут. Затем клетки ресуспендировали в смеси антител, содержащей комбинацию антител к CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD27, CCR7, CD62L и/или TCR-специфический тетрамер МНС-пептид или TCR -специфическое антитело Vβ-цепи. Смесь инкубировали 45 минут при комнатной температуре в темноте. Образцы центрифугировали при 500 g в течение 5 минут, осадки клеток собирали и ресуспендировали в 1:10000 DAPI (Biolegend - # 422801) в FACS буфере. Затем была

проведена проточная цитометрия с применением цитофлекса в соответствии с инструкциями производителя.

[00365] Одиночные направляющие были также протестированы на предмет индивидуального и одновременного редактирования в локусах TRAC и TRBC в стимулированных Т-клетках. Т-клетки подвергали нуклеофекции с помощью RNP, содержащей направляющую SEQ ID №: 180 нацеленную на локусы TRBC1 и TRBC2, RNP, содержащей направляющую SEQ ID №: 186 нацеленную на TRAC, или смеси обоих видов RNP в соотношении 2:1 направляющей к Cas9. Через два дня после электропорации пассировали Т-клетки и собирали лизаты.

[00366] Геномная ДНК была подготовлена и NGS анализ был выполнен, как описано в Примере 1. Образцы для испытаний были выполнены в трех экземплярах, с одним суррогатом образца. Эффективность нокдауна экспрессии поверхностных TCR для индивидуального и одновременного редактирования направляющих TRAC и TRBC оценивали с помощью проточной цитометрии, нацеленной на присутствие или отсутствие CD3. Процент Т-клеток, лишенных молекулы CD3, показан в Таблице 21 и на Фигуре 12A.

[00367] Таблица 21: Отредактированные CD3-клетки в популяции

Образец	Средний % CD3-	SD	n
TRAC RNP	98,47	0,06	3
TRBC RNP	91,20	0,17	3
TRAC/TRBC RNP	95,83	5,05	3

[00368]

[00369] Частота инсерций оценивалась NGS-анализом после индивидуального и комбинаторного редактирования TRAC и TRBC в CD3⁺ Т-клетках. Процент редактирования направляющих TRAC и TRBC показан в Таблице 22 и на Фигуре 12B.

[00370] Таблица 22: Редактирование направляющих TRAC и TRBC в Т-клетках

SEQ ID №:	TRAC Среднее значение инсерций %	TRAC SD	TRBC1 Среднее значение инсерций %	TRBC1 SD	TRBC2 Среднее значение инсерций %	TR BC2 SD	N
TRAC KO	90	1,2	0,4	0	0,2	0,1	3
TRBC KO	0.2	0,1	85,4	3,2	91,2	1,5	3
TRAC KO+TRBC KO	81.8	4,7	78,2	4,4	83,6	2,7	3
Суррогат	0.2	-	0,2	-	0,1	-	1

[00371] Пример 11. Скрининг вставок направляющих TRAC.

[00372] Вставка матричной AAV в Т-клетки

[00373] Положение 12 направляющих нацеленных на локус TRAC было применено для разработки матричного аденоассоциированного вируса (AAV), который удалял бы область из 80 п.н. локуса TRAC, не допуская разрезания сайта после репарации и не допуская вырезания матрицы направляющей/Cas9. Это создаст локус, в котором TCR может быть вставлен в локус TRAC. С применением *гомологичных плеч* с делецией 80 п.н. был разработан конструктор для вставки образца TCR, а второй разработан для вставки GFP, оба под контролем промотора EF1a, которые затем были синтезированы GenScript USA Inc. и вставлены в вектор pUC19 с сайтами рестрикции BglII для субклонирования в вектор AAV. Матрицы AAV были сконструированы с гомологичными плечами, фланкирующими направляющие сайты разрезания TRAC для вставки генов, кодирующих TCR или репортерные молекулы (например, GFP) сайт-специфичным образом в Т-клетках.

[00374] Выделение Т-клеток и процедуры трансфекции с RNP выполняли, как описано в Примере 10. Через десять минут после электропорации Т-клетки добавляли в цитокиновую среду в концентрации 1×10^6 клеток/мл с добавлением матричной AAV при MOI 3×10^5 . Через 24 часа после электропорации, клетки разделяли и размножали в течение дополнительных 4-12 дней в статической культуре или многолуночных планшетах G-REX (Wilson Wolf Manufacturing) перед применением в функциональных анализах или криоконсервировали. Была проведена проточная цитометрия.

Скрининг вставки направляющей TRAC

[00375] Двойные направляющие, нацеленные на экзон 1 локуса TRAC, подвергали скринингу в Т-клетках для оценки эффективности вставки. Для первоначального скрининга, использовали матрицу вставки на основе AAV (AV9), кодирующую репортерный ген GFP AV9, который был разработан с разрывом в 80 п.н, предназначенным для покрытия целевых сайтов направляющих, перечисленных в Таблице 23. AV9 описан в Таблице 37 ниже. Т-клетки подвергали нуклеофекции в двух экземплярах с помощью RNP, который содержал двойную направляющую, за исключением только AAV и отсутствия образцов RNP (суррогата), которые использовались в качестве контроля. Процедуры трансдукции клеток с помощью RNP выполняли, как описано в Примере 10, за исключением того, что отношение направляющей Cas9 составляло 1:1. Эффективность вставки направляющих TRAC определяли с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 10, для обнаружения флуоресценции GFP из вставленного конструктора, как показано в Таблице 23 и на Фигуре 13А. Эффективность нокдауна экспрессии поверхностного TCR для редактирования направляющих TRAC оценивали с помощью проточной цитометрии, нацеленной на присутствие или отсутствие CD3. Процент Т-клеток, лишенных молекулы CD3, показан в Таблице 23 и на Фигуре 13В.

[00376] Таблица 23. Процент экспрессии GFP вставленных направляющих

Направляющая	GFP %	GFP % SD	% CD3- клетки (n=1)
96	6,44	0,28	4,96
213	8,22	0,06	19,8
90	43,9	1,41	98,9
97	20,05	3,61	58,1
95	22,65	2,9	99,2
98	19,1	1,98	26,8
214	36,05	1,63	61,5
185	32,05	3,32	85,7
215	31	0,28	17,9
216	30,4	8,2	13,1
217	39,4	0,14	31,6
218	26,55	0,07	52,5
Суррогат	0	0	0,45
только AAV	4,52	0,72	Нет данных

[00377] Пример 12. Скрининг одиночной направляющей для вставки TRAC.

[00378] Одиночные направляющие, нацеленные на экзон 1 локуса TRAC, затем подвергали скринингу в Т-клетках для оценки эффективности вставки с применением AV9. Процедуры приготовления Т-клеток и трансдукции RNP выполняли дублируя, как описано в Примере 10, за исключением того, что соотношение направляющей:Cas9 составляло 1:1. AV9 был разработан, как описано в Примере 11, с направляющими, перечисленными в Таблице 24. Анализ NGS инсерций проводили, как описано в Примере 1.

[00379] Эффективность вставки направляющих TRAC определяли с помощью проточной цитометрии для обнаружения флуоресценции GFP из вставленного конструкта, как показано в Таблице 24 и Фигуре 14А. Эффективность нокаута поверхностной экспрессии TCR по направляющим TRAC оценивали с помощью проточной цитометрии, нацеленной на присутствие или отсутствие CD3. Процент Т-клеток, лишенных молекулы CD3, показан в Таблице 24 и на Фигуре 14В. Эффективность редактирования химически модифицированных и немодифицированных направляющих была также проанализирована и обнаружена активность.

[00380] Таблица 24. Процент GFP-положительных клеток

Направляющая	%GFP (Среднее значение)	% GFP SD	% CD3- клетки	% CD3- клетки SD
--------------	-----------------------------	----------	---------------	------------------

201	45,65	0,78	88,85	0,21
202	40,65	2,05	89,10	0,42
203	53,05	0,21	96,15	0,21
204	51,95	2,33	95,70	0,71
191	37,15	1,34	95,95	0,21
205	66,35	3,46	93,50	0,71
206	73,15	1,34	93,25	0,78
211	53,75	0,21	92,55	0,21
207	48,45	1,34	62,25	0,64
208	57,35	1,06	71,50	0,14
209	55,00	2,97	72,15	1,91
210	53,15	2,05	93,70	0,28
186	36,15	0,35	85,50	0,57
Суррогат	1,88	0,41	0,63	0,01
Только AAV	0,00	0,00	1,71	0,78

[00381] Пример 13 - Оценка промоторов и ITR для вставки экзогенного TCR и экспрессии

Конструирование ген-редактирующих TCR Т-клеток для функциональных анализов

[00382] Вставку TCR и последующую поверхностную экспрессию тестировали различными промоторами и двумя длинами ITR. Выделение Т-клеток и трансфекцию RNP с помощью направляющей SEQ ID №: 185 проводили, как описано в Примерах 10, за исключением применения молярного отношения gPHK к SpyCas9 1:1. RNP транскрипцию AAV конструктами, содержащими TCR-С в Т-клетки проводили, как описано в Примере 11. Матрицы AAV содержали гомологичные плечи 500 п.н., соответствующие 500 п.н. фланкирующей с каждой стороны SEQ ID №: 185, сайт разреза в локусе TRAC. Каждый конструкт AAV содержал различные комбинации промоторов и ITR, как показано в Таблице 25. Отредактированные Т-клетки окрашивали тетрамером для проточного цитометрического анализа, как описано в Примере 11.

[00383] Эффективность вставки TCR-С оценивали с помощью цитофлуориметрического анализа, оценивая, как идентичность Т-клеток по присутствию CD3⁺ на поверхности клетки, так и количество клеток, экспрессирующих вставленный TCR через тетрамер TCR специфического лиганда, пептид RMF (см. например, US20160083449A1, содержание которого здесь приведено посредством ссылки). Процентное содержание CD3⁺Tetramer⁺ клеток показано в Таблице 25 и на Фигуре 15А. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI), окрашенных тетрамером Т-клеток, показана в Таблице 25 и на Фигуре 15В.

[00384] Таблица 25. Промоторы и ITR для матричных AAV.

Элементы последовательностей и последовательности, показанные в этой Таблице, далее определены в Таблице 37.

ID матрицы AAV	Промотор	Длина ITR (п.н.)	% Тетрамер +, CD3+ (среднее значение)	SD	Интенсивность флуоресценции CD3+ (среднее)	SD	n
AV2	Ef1a - короткий	145	0,48	0,48	52752	34002	2
AV3	MND-1	141	15,85	1,48	77704	646	2
AV6	MND-1	145	18,55	0,49	67845	4084	2
AV4	MND-2	141	17,10	0,57	116978	6798	2
AV8	MND-2	145	14,55	2,62	65281	3117	2
AV5	PGK	135	2,35	0,03	23410	437	2
AV7	PGK	146	9,01	0,57	12596	78	2
AV1	EF1a	146	37	-	117223	-	1

Пример 14: Экспрессия GFP в сконструированных Т-клетках с применением эндогенного промотора TRAC

[00385] В другом эксперименте, матрица AAV (AV10), содержащая сайт «пропуска рибосомы» P2A, за которым следует репортерный ген GFP (т.е. без экзогенного промотора), был вставлен в экзон 1 локуса TRAC, чтобы определить, может ли эндогенный промотор TRAC управлять экспрессией GFP. Т-клетки подвергали нуклеофекции с помощью RNP, который содержит направляющую SEQ ID №: 186, и трансдуцировали AAV AV10, как описано в Примере 10. Контрольные условия включали недифференцированные Т-клетки (суррогат) и Т-клетки, которые получили RNP нуклеоинфекцию, но не AAV (только RNP). После 4 дней культивирования отредактированные Т-клетки были совместно окрашены APC-Cy7 конъюгированным с анти-CD3ε (Biolegend, 300318) для CD3, и проанализированы проточной цитометрией на экспрессию GFP и нокаут TCR, как показано в Таблице 26 и на Фигурах 16А-С.

Таблица 26. Процент отредактированных CD3- и GFP-положительных клеток в популяции.

Образец	%CD3-	SD	%GFP+	SD
AV10-GFP+RNP	97,5	0,05	76,4	1,9
только RNP	86,7	2,05	1,1	0,0
Суррогат	0,8	0,04	0,0	0,0

Пример 15: Экспрессия TCR в сконструированных Т-клетках с применением

эндогенного и экзогенного промотора TRAC

[00386] В дополнительном эксперименте, матрицы AAV содержащие TCR-A, TCR-C или TCR-D с или без экзогенного промотора, были вставлены в локус TRAC, для определения может ли эндогенный TRAC промотор управлять экспрессией и функцией вставленных TCR. Трансфекцию Т-клеток и вставку AAV проводили в двух экспериментах, как описано в Примерах 10 и 11 соответственно. Т-клетки подвергали нуклеофекции с помощью RNP, содержащим TRAC (SEQ ID №: 186) и TRBC (направляющая SEQ ID №: 180), с помощью RNP, содержащим направляющую и содержали различные матрицы AAV, показанные в Таблице 27. Т-клетки, экспрессирующие вставленный TCR, выявляли с помощью проточной цитометрии с применением антител специфических к V бета-цепи TCR вставленного TCR в CD4+ и CD8+ клетки, как показано в Таблице 27 и на Фигурах 17A-C (анти-Vбета8 для TCR-A, [Biolegend Cat№ 140104], Vбета 7.2 для TCR-D на Фигуре 17B [Beckman Coulter, Кат. № IM3604] и Vbeta17 для TCR-C, показанном на Фигуре 17C [Beckman Coulter, Кат. № IM2048]).

[00387] Таблица 27. Поверхностная экспрессия сконструированных TCR с экзогенными промоторами и без них

AAV матрица	TCR	Промотор	% CD4+ CD3+ Vb+ (среднее значение)	SD	% CD8+ CD3+ Vb+ (среднее значение)	SD
AV21	TCR-A	Эндогенный (PL)	67,05	0,49	66,50	1,27
AV11	TCR-A	EF1a	65,45	0,49	66,05	1,20
AV20	TCR-D	Эндогенный (PL)	69,85	0,07	70,25	0,64
AV18	TCR-D	EF1a	44,60	0,00	47,00	0,00
AV19	TCR-C	Эндогенный (PL)	50,45	0,35	46,40	0,99
AV12	TCR-C	EF1a	60,20	0,71	54,70	0,85

* PL - конструктор матрицы без промотора

Элементы последовательностей и последовательности, показанные в этой Таблице, дополнительно определены в Таблице 37.

[00388] Дегрануляцию Т-клеток и высвобождение цитокинов в ответ на специфический пептидный антиген WT1 выполняли для тестирования функциональности сконструированных эффекторных Т-клеток, экспрессированных с эндогенного промотора или экзогенного TRAC промотора. В частности, сконструированные Т-клетки оценивали на повышающую регуляцию CD107a и экспрессию IL2 и IFN γ после совместного культивирования с пептид импульсными клетками из линий раковых клеток OCI-AML3 (DSMZ, Cat. ACC 582). Вкратце, 100000 OCI-AML3 клеток пульсировали в основной среде (основная среда Xvivo: без цитокинов+1 мкл/мл GolgiPlug+0,7 мкл/мл GolgiStop с 30

мкл/мл CD107a APC/Cy7 (3 мкл/лунка)) в течение 4-5 часов при 37 градусах с титрованными количествами 9-мерных пептидов VLDFAPPGA (VLD) или RMFPNAPYL (RMF) с концентрациями пептидов в диапазоне от 0 до 5000 нМ. Отредактированные по гену TCR+T-клетки, суспендировали при 1×10^6 с TCR встроенных клеток/мл в основной среде XVIVO15, содержащей до конечной концентрации 30 мкл/мл CD107a APC/Цианин 7 антител (Biolegend), 1 мкл/мл Golgiplug (BD) и 0,7 мкл/мл Golgistop (BD) и добавляли к пептидным импульсным клеткам-мишеням при соотношении 1:1 эффектор:клеток-мишеней (E:T). Совместные культуры инкубировали в течение ночи при 37° C, и клетки окрашивали на поверхностные маркеры CD3, CD4, CD8 и специфическую бета-цепь TCR из TCR-A или TCR-D и инкубировали в течение 30 минут. После поверхностного окрашивания клетки фиксировали и пермеабелизировали с применением имеющегося в продаже набора (Invitrogen) для внутриклеточного окрашивания IFN- β и TNF α с последующей 30-минутной инкубацией при комнатной температуре. После внутриклеточного окрашивания клетки промывали и анализировали проточной цитометрией.

[00389] Влияние EF1a (или EF-1 α) и эндогенных промоторов на уничтожение Т-клеток и высвобождение цитокинов, измеряли с помощью процента клеток, положительных для CD107a, IFN γ и/или TNF α , присутствующих в каждом образце. Эффекторные Т-клетки с TCR и типом промотора перечислены в Таблице 28. Результаты проточной цитометрии для TCR+ Т-клеток показаны в Таблице 28, а кривые доза-ответ, для клеток экспрессирующих TCR-A, показаны на Фигуре 18А (AV21 и AV11). Процент клеток CD107a+, экспрессирующих TCR-D, показан в Таблице 28 и на Фигуре 18В (AV20 и AV18). Иммунный ответ, вызванный Т-клетками, оценивали путем измерения процентного содержания TNF-альфа и гамма-интерферона, как показано в Таблице 28 и на Фигурах 19А-В.

Таблица 28. Дегрануляция и ответ гамма-интерферона в сконструированных Т-клетках, экспрессирующих TCR с и без экзогенных промоторов.

Констр укт	TCR	Промотор	Концентрация пептида	%CD107 a+	SD	%TNFa+ IFNg+	SD
AV21	TCR-A	Эндогенный	0 нМ	3,79	0,49	0,08	0,02
			0.5 нМ	40,55	0,35	9,66	1,34
			5 нМ	88,70	0,42	22,75	1,34
			50 нМ	97,55	0,07	29,10	0,00
			500 нМ	98,55	0,07	38,55	1,34
			5000 нМ	98,65	0,35	32,80	1,56
			5000 нМ RMF	11,50	0,71	1,60	0,57
AV11	TCR-A	EF1a	0 нМ	3,83	0,33	0,02	0,03
			0.5 нМ	42,85	0,07	4,92	0,40

			5 нМ	90,15	0,78	17,20	0,85
			50 нМ	97,65	0,21	28,90	0,28
			500 нМ	98,15	0,07	37,15	2,19
			5000 нМ	98,60	0,00	3 4,35	0,35
			5000 нМ RMF	11,45	0,21	0,83	0,11
AV20	TCR-D	Эндогенный	0 нМ	1,73	0,18	0,05	0,04
			0.5 нМ	2,16	0,19	0,21	0,08
			5 нМ	11,95	0,21	3,40	0,23
			50 нМ	53,30	0,85	11,35	0,07
			500 нМ	87,15	0,64	21,05	1,91
			5000 нМ	92,30	0,28	26,20	0,85
			5000 нМ RMF	1,82	0,13	0,01	0,01
AV18	TCR-D	EF1a	0 нМ	2,56	0,11	0,01	0,02
			0.5 нМ	3,52	0,45	0,12	0,08
			5 нМ	12,70	1,98	2,12	0,00
			50 нМ	53,25	4,60	10,58	1,87
			500 нМ	85,10	2,40	17,25	1,34
			5000 нМ	91,35	1,63	19,15	2,62
			5000 нМ RMF	2,86	0,25	0,05	0,01

Элементы последовательностей и последовательности, показанные в этой Таблице, дополнительно определены в Таблице 37.

Пример 16: Повышение экспрессии TCR путем нокаута как альфа, так и бета-цепей эндогенного рецептора Т-клетки

[00390] Т-клетки оценивали на поверхностную экспрессию сконструированных TCR-A, TCR-B или TCR-D, содержащих встроенные альфа-цепь и бета-цепь. Три условия для увеличения спаривания вставленных альфа- и бета-цепей были протестированы: (1) добавление остатков цистеина, которые могут образовывать цистеиновые мостики для связывания вставленных альфа- и бета-цепей; (2) экспрессия от эндогенного промотора TRAC или экзогенного промотора и (3) нарушение эндогенных копий TRAC, TRBC1 и TRBC2. Трансфекцию Т-клеток и трансдукцию AAV проводили, как описано в Примере 10. TCR были вставлены через матрицы AAV AV11, AV13, AV18 или AV20 либо с RNP, нацеленным только на локус TRAC, либо с RNP нацеленным на локусы TRAC, TRBC1 и TRBC2, как описано выше. После трансфекции Т-клетки размножали, как описано в Примере 10. Через девять дней после размножения клеток, отредактированные Т-клетки совместно окрашивали анти-CD3ε и соответствующим V-бета реагентом (PE) для идентификации сконструированных TCR с помощью проточной цитометрии. Процентное соотношение TCR-A и TCR-B CD3⁺ Vb7.2⁺ клеток для каждого состояния показано в

Таблице 29. Фигуры 20А и 20В представляют типичный пример поверхностной экспрессии сконструированных TCR-А и TCR-В CD3+ Vb7.2+ клеток для данных в Таблице 29. Поверхностную экспрессию сконструированных TCR-А и TCR-В в популяциях клеток CD8+ и CD4+ также измеряли, как показано в Таблице 29 и на Фигуре 21С.

[00391] Таблица 29. Оценка экспрессии сконструированных TCR-А и TCR-В, содержащих встроенные альфа- и бета-цепи.

Образец	RNP	CD8+				CD4+			
		Среднее значение CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD	Среднее значение CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD
AV13-TCR-B (с cys)	TRAC	62,2	1,56	8487	290`	68,85	0,64	8947	291
	TRAC+ TRBC	69,05	2,05	20709	443,36	75,35	2,05	24521	492
AV11-TCR-A (без cys)	TRAC	60,8	нет данных	12520	нет данных	69,3	нет данных	13782	нет данных
	TRAC+ TRBC	67,55	0,21	40104	2203	74,75	0,50	49273	1743

[00392] Процентное содержание CD3+ Vb7.2+ клеток AV20-TCR-D и AV18-TCR-D с применением эндогенного или экзогенного промотора показано в Таблице 30. Поверхностная экспрессия сконструированного TCR-D в популяциях клеток CD8+ и CD4+ была измерена, как показано в Таблице 30 и на Фигурах 21А-D.

[00393] Таблица 30. Оценка экспрессии сконструированного TCR-D, содержащего встроенные альфа- и бета-цепи

Образец	RNP	CD8+				CD4+			
		CD3 + %Vb+	SD	Vb MFI	SD	CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD
AV18-TCR-D	TRAC	41.3	нет данных	13586	нет данных	58.6	нет данных	22324	нет данных
	TRA	71.4	1.6	5846	12479	74.05	1.15	8536	18034

	C+TR BC			9				0	
AV20- TCR-E	TRA C	40.4	нет данны х	2561 3	нет данны х	62.1	нет данны х	1340 6	нет данны х
	TRA C+TR BC	83.5	0.3	4434 2	11035	84.1	0.3	7100 7	18790

[00394] Пример 17: Влияние нокаута TRBC на спаривание альфа- и бета-цепей из дополнительных TCR.

[00395] Т-клетки оценивали с помощью дополнительных сконструированных TCR на предмет влияния эндогенных бета-цепей на спаривание как встроенной альфа-цепи, так и встроенной бета-цепи. Эксперимент выполняли, как описано в данном документе, за исключением того, что проводили окрашивание тетрамером для измерения MFI и вставки AAV в Таблице 31 были применены для трансдукции. Через девять дней после размножения клеток отредактированные Т-клетки были совместно окрашены VLD-тетрамером, ортогональным способом к V-бета окрашиванию, для идентификации клеток с поверхностной экспрессией TCR проточной цитометрией, как показано в Таблице 31, и данные репрезентативных экспериментов представлены на Фигурах 22, 23 и 24. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) также определяли с помощью проточной цитометрии, как показано в Таблице 31 и на Фигурах 25 и 26.

[00396] Таблица 31. Экспрессия поверхностного TCR в сконструированных Т-клетках

Образец	RNP	CD8+				CD4+			
		Средний % Тетрамер ⁺	SD	Средний тетрамер MFI	SD	Средний % Тетрамер	SD	Средний тетрамер MFI	SD
AV11- TCR-A	TRAC	12,65	0,6	21853,5	12	7,6	0,4	10064,5	634
	TRAC+ TRBC	51,2	3,9	23697	1605	48	2,5	11332	387
AV14- TCR-F	TRAC	61,05	6,2	50097	3828	78,9	0,8	67332,5	1379
	TRAC+ TRBC	76,6	0,3	171770	7974,	81,8	2,3	231348	8432
AV15- TCR-	TRAC	73,6	0,3	101676	2594	77,55	0,77	101366	4317
	TRAC+	81,9	0,1	190002	3919	85,35	2,05	251084	1569

G	TRBC								
AV16-TCR-H	TRAC	68,85	1,8	75226,5	1704	71,65	1,8	64255	3921
	TRAC+TRBC	77,1	3,8	138847	1916	80,25	3,5	131127	5313
ТОЛЬКО RNP	TRAC	0,0555	0,05	нет данных	нет данных	0,112	0,04	нет данных	нет данных
	TRAC+TRBC	0,052	0,02	нет данных	нет данных	0,107	0,06	нет данных	нет данных

[00397] Пример 18 - Сконструированные цитотоксические Т-клетки и высвобождение цитокинов

[00398] Сконструированные Т-клетки были проанализированы на цитотоксичность и цитокиновый ответ посредством измерения апоптоза в клетках-мишенях и измерения высвобожденных цитокинов в питательную среду, соответственно. Т-клетки были сконструированы, как описано в данном документе, с применением последовательностей матриц AAV, описанных в Таблице 32, либо редактирующим RNP, нацеленным только на locus TRAC, либо RNP нацеленным на оба локуса: TRAC и TRBC. Клетки-мишени HLA-02.01 положительной линии T2 клеток, подавали импульсам и совместно культивировали с отредактированными Т-клетками, как описано в Примере 15, за исключением того, что клеточное соотношение TCR+ Т-клеток составляло 2,5:1 Е:Т. Каспаза 3/7 красный реагент (Essen Bioscience) был добавлен в каждую лунку до конечной концентрации 2 мкМ. Систему анализа живых клеток Incucyte Live Cell Analysis System (Essen Bioscience) и программное обеспечение Incucyte S3 для анализа (версия 2018B) использовали для количественной оценки красной флуоресценции для каспазы 3/7 апоптозных клеток через 6 часов. Через 24 часа супернатанты из каждой лунки были собраны, и количественно определяли высвобожденные цитокины IL2 и IFN- γ с помощью ELISA с применением набора Duoset ELISA (R&D Systems) в соответствии с протоколом производителя. Средняя интегральная интенсивность каспазы 3/7 показана в Таблицах 32 и 33 и на Фигурах 27A-C и 28A-D. Высвобождение цитокинов показано в Таблицах 34AD и на Фигурах 29A-G и 30A-D.

[00399] Таблица 32 - Цитотоксичность

Образец	пептид (нМ)	TRAC/TRBC		только TRAC	
		Средняя Интегрированная интенсивность	SD	Средняя Интегрированная интенсивность	SD

		Каспазы3/7		Каспазы 3/7	
AV11-TCR-A	0нМ VLD	92634	7107	132075	37266
	0.005нМ VLD	116733	25315	141590	71782
	0.05нМ VLD	227475	69325	135336	36246
	0.5нМ VLD	729355	193569	345431	43799
	5нМ VLD	1017766	174286	629094	151367
	50нМ VLD	897413	122632	762373	59142
	500нМ VLD	885460	225388	741203	77370
	500нМ RMF	98877	12254	121279	7212
AV13-TCR-B	0нМ VLD	97684	21060	93536	19338
	0.005нМ VLD	126983	7518	88855	42431
	0.05нМ VLD	174492	11465	119259	14122
	0.5нМ VLD	388825	71913	180269	23378
	5нМ VLD	835068	86910	382323	94136
	50нМ VLD	922968	49804	724521	280318
	500нМ VLD	876706	57316	748140	249718
	500нМ RMF	78919	21138	81044	8512
AV12-TCR-C	0 нМ RMF	279375	93562	276204	65787
	0.05 нМ RMF	238879	17971	360532	63189
	0.5нМ RMF	639925	37882	560793	134482
	5нМ RMF	1446931	341193	1463030	193719
	50нМ RMF	1864716	569777	2020037	65722
	500нМ RMF	1519652	256405	2168849	391750
	500нМ VLD	218526	35777	330230	34681

Таблица 33 - Цитотоксичность

		TRAC/TRBC		Только TRAC	
Образец	пептид (нМ)	Средняя Интегрированна я интенсивность Каспазы 3/7	SD	Средняя Интегрированна я интенсивность Каспазы 3/7	SD
AV11-TCR-A	0 нМ VLD	381416	143786	9042	413
	0.005 нМ VLD	374092	69482	9184	1881
	0.05 нМ VLD	1134226	154362	16907	5212

	0.5 нМ VLD	1173265	110362	38844	19238
	5 нМ VLD	1325404	313592	137374	35354
	50 нМ VLD	1197360	92955	207010	81220
	500 нМ VLD	1571735	526514	233358	55713
	500 нМ RMF	280465	54951	7342	1113
AV14-TCR-F	0 нМ VLD	21702	8974	18238	3665
	0.005 нМ VLD	17809	2730	24480	7844
	0.05 нМ VLD	25664	9946	31096	6502
	0.5 нМ VLD	528157	163446	346541	71382
	5 нМ VLD	1297535	240491	930724	169903
	50 нМ VLD	1150859	143371	1198605	138751
	500 нМ VLD	1228755	146056	845589	119495
	500 нМ RMF	8578	1615	9659	2534
AV15-TCR-G	0 нМ VLD	12408	4254	12182	2841
	0.005 нМ VLD	20974	7838	21046	12983
	0.05 нМ VLD	310566	130784	199014	55935
	0.5 нМ VLD	963870	113005	1007001	378833
	5 нМ VLD	1255083	289237	1143162	399176
	50 нМ VLD	1037328	87408	1276265	379466
	500 нМ VLD	1187161	202415	1305422	104837
	500 нМ RMF	6795	1439	4949	1238
AV16-TCR-H	0 нМ VLD	7388	1738	6560	1298
	0.005 нМ VLD	9815	1987	7651	4159
	0.05 нМ VLD	32360	3457	23556	6335
	0.5 нМ VLD	627805	91413	549651	126913
	5 нМ VLD	983752	124769	991625	147487
	50 нМ VLD	1080676	152098	1082346	86963
	500 нМ VLD	1181699	122175	1180497	276768
	500 нМ RMF	3889	3101	4189	944

Таблица 34А - Высвобождение цитокинов IL2

		IL2 TRAC/TRBC	IL2 только TRAC
--	--	---------------	-----------------

Конструкт	пептид (нМ)	Среднее значени е (пг/мл)	SD (пг/мл)	N	Среднее значени е (пг/мл)	SD (пг/мл)	N
AV11-TCR-A	0нМ VLD	46	3	3	1715	119	3
	0,005нМ VLD	34	3	3	1490	79	3
	0,05нМ VLD	52	19	3	1436	18	3
	0,5нМ VLD	50	10	3	1186	170	3
	5нМ VLD	506	29	3	1713	264	3
	50нМ VLD	1902	104	3	3554	223	3
	500нМ VLD	4804	345	3	5003	112	3
	500нМ RMF	46	3	3	1615	194	3
AV13-TCR-B	0нМ VLD	46	3	3	1109	181	3
	0,005нМ VLD	42	2	3	1048	60	3
	0,05нМ VLD	39	5	3	913	44	3
	0,5нМ VLD	55	10	3	868	73	3
	5нМ VLD	248	17	3	976	66	3
	50нМ VLD	1095	90	3	2160	240	3
	500нМ VLD	3363	303	3	3547	121	3
	500нМ RMF	51	18	3	1011	64	3
AV12-TCR-C	0нМ RMF	нет данных	нет данных	нет данных	498	49	3
	0,05 нМ RMF	398	210	3	511	40	3
	0,5нМ RMF	320	15	2	481	42	3
	5нМ RMF	182	17	3	333	19	3
	50нМ RMF	392	56	3	396	79	3
	500нМ RMF	3193	165	3	2386	207	3
	500нМ VLD	7776	539	3	7830	557	3
	0нМ VLD	378	113	3	415	66	3

Таблица 34В - Выделение гамма-интерферона

Конструкт	Пептид (нМ)	TRAC/TRBC			только TRAC		
		Среднее значени е (пг/мл)	SD (пг/мл)	N	Среднее значени е (пг/мл)	SD (пг/мл)	N

AV11-TCR-A	0 _{нМ} VLD	<LLOD*	<LLO D	3	1313	446	3
	0,005 _{нМ} VLD	<LLOD	<LLO D	3	904	243	3
	0,05 _{нМ} VLD	<LLOD	<LLO D	3	731	68	3
	0,5 _{нМ} VLD	<LLOD	<LLO D	3	1442	148	3
	5 _{нМ} VLD	7361	399	3	4323	332	3
	50 _{нМ} VLD	15845	1783	3	9221	381	3
	500 _{нМ} VLD	25242	3021	3	11558	407	3
	500 _{нМ} RMF	<LLOD	<LLO D	3	1656	115	3
AV13-TCR-B	0 _{нМ} VLD	<LLOD	<LLO D	3	406	75	3
	0,005 _{нМ} VLD	<LLOD	<LLO D	3	265	36	3
	0,05 _{нМ} VLD	<LLOD	<LLO D	3	981	896	3
	0,5 _{нМ} VLD	<LLOD	<LLO D	3	471	140	3
	5 _{нМ} VLD	4643	154	3	1865	183	3
	50 _{нМ} VLD	11273	643	3	3645	184	3
	500 _{нМ} VLD	19868	1925	3	6476	434	3
	500 _{нМ} RMF	<LLOD	<LLO D	3	648	199	3
AV12-TCR-C	0 нМ RMF	нет данных	нет данны х	нет данны х	1243	92	3
	0,05 нМ RMF	<LLOD	<LLO D	3	839	144	3
	0,5 _{нМ} RMF	<LLOD	<LLO D	2	1151	93	3
	5 _{нМ} RMF	<LLOD	<LLO	3	1181	96	3

			D				
	50нМ RMF	4643	154	3	2434	26	3
	500нМ RMF	11273	643	3	5302	723	3
	500нМ VLD	19868	1925	3	16247	192	3
	0нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	1058	93	3

* LLOD указывает, что показание ниже уровня обнаружения в конкретном используемом анализе.

Таблица 34С - Высвобождение цитокинов IL2

TCR	Пептид (нМ)	TRAC/TRBC			Только TRAC		
		Среднее значение (пг/мл)	SD (пг/мл)	N	Среднее значение (пг/мл)	SD (пг/мл)	N
AV11-TCR-A	0 нМ VLD	314	46	3	2259	156	3
	0,005 нМ VLD	304	42	3	2247	122	3
	0,05 нМ VLD	227	29	3	2046	188	3
	0,5 нМ VLD	200	63	3	2007	73	3
	5 нМ VLD	494	15	3	4266	96	3
	50 нМ VLD	1182	157	3	7062	283	3
	500 нМ VLD	1511	141	3	8375	385	3
	500 нМ RMF	81	19	3	2135	245	3
AV16-TCR-H	0 нМ VLD	17	21	2	102	9	2
	0,005 нМ VLD	15	0	1	44	27	3
	0,05 нМ VLD	40	0	1	2	0	1
	0,5 нМ VLD	17	17	2	23	11	3
	5 нМ VLD	30	6	2	175	79	2
	50 нМ VLD	286	8	2	111	32	3
	500 нМ VLD	455	90	3	387	17	3
	500 нМ RMF	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных
AV15-TCR-G	0 нМ VLD	306	144	3	338	28	3
	0,005 нМ VLD	196	40	3	326	49	3
	0,05 нМ VLD	198	42	3	284	14	3
	0,5 нМ VLD	248	72	3	305	26	3

	5 нМ VLD	351	27	3	442	21	3
	50 нМ VLD	764	47	3	1053	89	3
	500 нМ VLD	1203	111	3	1566	112	3
	500 нМ RMF	157	29	3	242	10	3
AV14-TCR-F	0 нМ VLD	283	16	3	295	55	3
	0,005 нМ VLD	303	84	3	316	24	3
	0,05 нМ VLD	274	46	3	361	25	3
	0,5 нМ VLD	836	103	3	724	129	3
	5 нМ VLD	1406	69	3	1634	51	3
	50 нМ VLD	3755	180	3	3850	116	3
	500 нМ VLD	4301	57	3	4289	459	3
	500 нМ RMF	117	53	3	190	19	2

Таблица 34D - Выделение гамма-интерферона

TCR	пептид (нМ)	TRAC/TRBC			только TRAC		
		Среднее значение	SD	N	Среднее значение	SD	N
AV11-TCR-A	0 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	3491	108	3
	0,005 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	4489	444	3
	0,05 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	5126	262	3
	0,5 нМ VLD	1257	23	3	8284	1195	3
	5 нМ VLD	21739	653	3	16572	1237	3
	50 нМ VLD	40200	2121	3	28080	1871	3
	500 нМ VLD	47628	1520	3	31541	3672	3
	500 нМ RMF	0	0	3	3590	389	3
AV16-TCR-H	0 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0,005 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0,05 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0,5 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	5 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	50 нМ VLD	16058	422	3	15923	427	3
	500 нМ VLD	24426	61	3	24319	849	3
	500 нМ RMF	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3

AV15-TCR-G	0 нМ VLD	219	15	3	260	33	3
	0,005 нМ VLD	219	56	3	429	196	3
	0,05 нМ VLD	549	102	3	854	54	3
	0,5 нМ VLD	1850	258	3	2265	391	3
	5 нМ VLD	7034	497	3	6424	616	3
	50 нМ VLD	23558	1135	3	23733	1748	3
	500 нМ VLD	31629	1790	3	27473	663	3
	500 нМ RMF	235	33	3	416	199	3
AV14-TCR-F	0 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0,005 нМ VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0,05 нМ VLD	4088	1334	3	<LLOD	<LLOD	3
	0,5 нМ VLD	12141	321	3	10419	934	3
	5 нМ VLD	26510	1161	3	25934	611	3
	50 нМ VLD	42858	1197	3	40326	2516	3
	500 нМ VLD	50607	2350	3	51106	2385	3
	500 нМ RMF	1230	938	3	<LLOD	<LLOD	3

[00400] Пример 19: Цитотоксичность сконструированных Т-клеток определялась дегрануляцией CD107a и окрашиванием внутриклеточных цитокинов (ICS)

[00401] Сконструированные Т-клетки также оценивали на цитотоксичность и цитокиновый ответ посредством измерения CD107a и окрашивания внутриклеточных цитокинов, соответственно. Т-клетки были сконструированы, как описано в Примере 18, с применением матричных последовательностей AAV, описанных в Таблице 35, с RNP, нацеленным только на locus TRAC или на оба локуса: TRAC и TRBC. HLA-02.01 положительную линию T2 клеток подвергали импульсному воздействию, как описано в Примере 18, за исключением того, что отредактированные TCR⁺ Т-клетки были добавлены к *пептидно-импульсным* клеткам-мишеням при соотношении Е:Т-клетки 1:1. Совместные культуры инкубировали в течение ночи при 37° С, и клетки окрашивали поверхностными маркерами CD3, CD4, CD8 и специфической бета-цепью TCR или тетрамером. После окрашивания поверхности клетки фиксировали и пермеабелизировали для внутриклеточного окрашивания IFN-γ и TNFα с применением доступного на рынке набора (Invitrogen). Иммунный ответ, вызываемый экспрессией TCR, показан в Таблице 35А и на Фигурах 31А-В. Цитотоксичность в результате экспрессии TCR и с нокаутом TRBC оценивали путем измерения CD107a в сконструированных Т-клетках, как показано в Таблице 35В и на Фигуре 32А-В.

Таблица 35А. Окрашивание внутриклеточных цитокинов

		CD8+TNFa+ IFNg+			CD4+TNFa+ IFNg+		
Название образца	VLD пептид (нМ)	Средний % клеток	SD	N	Средний % клеток	SD	N
AV11-TCR-A TRAC/TR BC	0	9,4	0,2	2	1,1	0,5	2
	0,005	21,0	0,1	2	1,6	0,5	2
	0,05	53,0	0,4	2	1,2	0,1	2
	0,5	74,3	1,3	2	1,8	0,4	2
	5	79,8	0,1	2	11,1	0,7	2
	50	81,3	1,0	2	25,1	2,0	2
	50 RMF	10,0	0,3	2	1,6	0,1	2
ТОЛЬКО AV14-TCR-F TRAC	0	0,8	0,0	2	2,0	0,0	2
	0,005	1,0	0,2	2	1,9	0,0	2
	0,05	6,4	0,6	2	1,9	0,6	2
	0,5	44,1	1,5	2	1,3	0,1	2
	5	69,6	1,0	2	1,0	0,1	2
	50	74,1	0,2	2	1,3	0,5	2
	50 RMF	0,7	0,1	2	2,9	0,9	2
AV14-TCR-F TRAC/TR BC	0	1,3	0,0	2	1,2	0,3	2
	0,005	1,9	0,3	2	1,4	0,3	2
	0,05	8,5	0,3	2	1,1	0,5	2
	0,5	44,6	0,6	2	0,4	0,2	2
	5	68,0	1,8	2	0,3	0,0	2
	50	78,7	0,4	2	2,1	0,4	2
	50 RMF	1,8	0,1	2	1,5	0,0	2
AV15-TCR-G TRAC/TR BC	0	0,4	0,1	2	2,1	0,1	2
	0,005	7,6	0,9	2	1,6	0,2	2
	0,05	28,7	0,6	2	0,9	0,0	2
	0,5	46,5	1,3	2	0,6	0,0	2
	5	63,1	0,4	2	0,2	0,0	2
	50	71,4	1,2	2	0,1	0,1	2
	50 RMF	0,4	0,0	2	2,2	0,1	2
AV16-	0	0,5	0,1	2	3,1	0,1	2

TCR-H	0,005	3,7	0,0	2	2,1	0,5	2
TRAC/TR	0,05	27,1	1,0	2	3,0	0,6	2
BC	0,5	48,7	1,0	2	4,4	0,1	2
	5	67,5	1,5	2	6,0	0,1	2
	50	79,2	0,6	2	6,9	0,4	2
	50 RMF	0,6	0,4	2	2,9	0,5	2

Таблица 35В. CD107a дегрануляция

		CD8+ CD107a+			CD4+ CD107a+		
Название образца	VLD пептид (нМ)	Средний % клеток	SD	N	Средний % клеток	SD	N
AV11-TCR-A TRAC/T RBC	0	21,95	1,06	2	4,45	1,51	2
	0,005	37,30	0,28	2	4,64	0,78	2
	0,05	64,10	0,57	2	4,68	0,44	2
	0,5	73,05	0,35	2	4,23	0,96	2
	5	75,80	1,84	2	11,85	0,49	2
	50	76,20	0,99	2	21,10	0,99	2
	50 RMF	22,05	0,49	2	4,30	0,28	2
Только AV14-TCR-F TRAC	0	6,33	0,03	2	7,14	0,52	2
	0,005	5,93	0,13	2	7,73	1,29	2
	0,05	10,30	0,00	2	7,39	1,10	2
	0,5	42,75	0,78	2	9,08	0,46	2
	5	57,05	0,92	2	8,35	0,36	2
	50	60,75	0,07	2	9,38	0,88	2
	50 RMF	5,42	0,02	2	6,63	0,76	2
AV14-TCR-F TRAC/T RBC	0	15,90	0,14	2	5,84	0,41	2
	0,005	14,75	0,92	2	5,14	0,03	2
	0,05	22,55	1,06	2	4,89	0,40	2
	0,5	63,15	1,34	2	4,94	0,90	2
	5	78,25	0,78	2	4,71	1,35	2
	50	82,05	0,78	2	5,14	1,26	2
	50 RMF	12,00	0,00	2	3,78	0,23	2
AV15-TCR-G	0	3,15	0,40	2	4,62	0,47	2
	0,005	12,15	1,34	2	5,06	0,47	2

TRAC/T RBC	0,05	34,25	1,06	2	4,23	1,06	2
	0,5	53,30	0,99	2	4,74	1,32	2
	5	65,75	0,64	2	4,44	0,88	2
	50	73,25	0,21	2	4,52	0,05	2
AV16- TCR-H TRAC/T RBC	50 RMF	2,82	0,37	2	4,67	0,65	2
	0	2,29	0,07	2	3,42	0,60	2
	0,005	5,05	0,17	2	3,63	0,46	2
	0,05	23,60	0,85	2	4,48	0,24	2
	0,5	45,65	0,92	2	6,82	0,24	2
	5	60,70	0,28	2	8,09	0,30	2
	50	70,55	1,06	2	8,28	0,08	2
	50 RMF	2,64	0,84	2	3,70	0,15	2

[00402] Пример 20: Анализ аллореактивности

[00403] Сконструированные Т-клетки, полученные в Примере 18, также анализировали на неспецифическую реактивность к антигенпрезентирующим клеткам в тесте подавления *смешанной культуры лимфоцитов* (MLR). Сконструированные Т-клетки метили с помощью Cell Trace Violet (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Из аллогенных PBMC извлекли CD3⁺ клетки с применением MACS (Miltenyi) и использовали для возбуждения CTV-меченных Т-клеток. В частности, Т-клетки 5×10^4 высевали с 3×10^4 CD3⁻ деплеции аллогенных PBMC в 96-луночный планшет с U-образным дном (Corning). Через пять дней клетки собирали, окрашивали анти-CD4 и анализировали проточной цитометрией. Уровень пролиферации определяли разбавлением красителя Cell Trace Violet. В среду Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI; Corning) с глутамином добавляли 10% FBS, 1x GlutaMAX, 10 mM HEPES, 1x пенициллин/стрептомицин, 1 mM пируват натрия, 50 мкМ 2-ME и 1x заменимые аминокислоты были применены повсеместно в MLR анализе. Средний процент окрашивания клеток низкими уровнями Cell Trace Violet (CTV), то есть клеток с высокой пролиферацией, показан в Таблице 36 и на Фигурах 33А-В. На Фигурах 33А и 33В показано гейтирование, используемое для анализа уровней CTV. Клетки, обработанные TRBC RNP, показали меньшую пролиферацию, чем клетки, не обработанные TRBC RNP, как в CD4⁺, так и в CD4⁻ (CD8⁺) клетках для каждого тестируемого вставленного TCR, как показано в Таблице 36 и на Фигурах 33С и 33D.

[00404] Таблица 36 - Пролиферация в ответ на аллогенные PBMC

Тип Т-клетки	Название образца	TRAC RNP+TRBC RNP			TRAC RNP		
		Средний % клеток с низким CTV	SD	n	Средний % клеток с низким CTV	SD	n

CD4-	AV12-TCR-C	18%	13%	3	52%	2%	3
	AV11-TCR-A	16%	3%	3	70%	2%	3
	AV13-TCR-B	21%	5%	3	61%	2%	3
CD4+	AV12-TCR-C	14%	1%	3	36%	3%	3
	AV11-TCR-A	16%	7%	3	40%	2%	3
	AV13-TCR-B	22%	2%	3	32%	1%	3

Таблица 37 - Шаблоны нуклеиновых кислот. Обратите внимание, что все шаблоны, поставляются как ssAAV и содержат AAV2 ITR 5' и 3'. Гомологичные плечи являются такими, как описаны выше. Многие дополнительно содержат одну или более последовательностей промотора, расщепления или полиА, как изложено ниже. Знак «*» указывает на стоп-кодон, ниже.

Таблица 37

Шаблон	Трансген	Промотор или (без Промотора/ Пептид)	TCR ORF Конфигурация	полиА
AV1 (SEQ ID №: 613)	TCR-C	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV2 (SEQ ID №: 614)	TCR-C	Ef1a - короткий	β -P2A- α -*	bGH
AV3 (SEQ ID №: 615)	TCR-C	MND-1	β -P2A- α -*	bGH
AV4 (SEQ ID №: 616)	TCR-C	MND-2	β -P2A- α -*	bGH
AV5 (SEQ ID №: 617)	TCR-C	PGK	β -P2A- α -*	bGH
AV6 (SEQ ID №: 618)	TCR-C	MND-1	β -P2A- α -*	bGH
AV7 (SEQ ID №: 619)	TCR-C	PGK	β -P2A- α -*	bGH
AV8 (SEQ ID №: 620)	TCR-C	MND-2	β -P2A- α -*	bGH
AV9 (SEQ ID №: 621)	EGFP	EF1a	не применимо	SV40
AV10 (SEQ ID №: 622)	EGFP	(T2A)	не применимо	bGH
AV11 (SEQ ID №: 623)	TCR-A	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV12 (SEQ ID №: 624)	TCR-C	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV13 (SEQ ID №: 625)	TCR-B	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV14 (SEQ ID №: 626)	TCR-F	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV15 (SEQ ID №: 627)	TCR-G	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV16 (SEQ ID №: 628)	TCR-H	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV18 (SEQ ID №: 629)	TCR-D	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV19 (SEQ ID №: 630)	TCR-C	(T2A)	β -P2A- α -*	bGH
AV20 (SEQ ID №: 631)	TCR-E	(T2A)	β -P2A- α -*	bGH
AV21 (SEQ ID №: 632)	TCR-B	(T2A)	β -P2A- α -*	bGH

Элементы шаблонов, определенные в Таблице 37, определены согласно следующим последовательностям: EF1a (SEQ ID №: 603); EF1 (SEQ ID №: 604); MND-1 (SEQ ID №: 605); MND-2 (SEQ ID №: 606); PGK (SEQ ID №: 607); T2A (SEQ ID №: 608); P2A (SEQ ID №: 609); EGFP (SEQ ID №: 610); SV40 полиА (SEQ ID №: 611); bGH полиА (SEQ ID №: 612).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ изменения последовательности ДНК в гене TRBC1 и/или TRBC2, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

- i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
- ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;
- iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6; или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

2. Способ изменения последовательности ДНК, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. последовательности, которая содержит 15 последовательных нуклеотидов $\pm$ 10 нуклеотидов с координатами генома, перечисленными в любой из Таблиц 1 и/или 3 для SEQ ID №: 1-89 и 179-184;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (i);

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из (i);

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

3. Способ снижения экспрессии гена TRBC1 и/или TRBC2, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6; или
 (б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и
 необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

4. Способ иммунотерапии, включающий введение композиции субъекту, его аутологичной клетке и/или аллогенной клетке, при этом композиция содержит:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6; или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и
 необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

5. Способ изменения последовательности ДНК в гене TRAC, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113, 185 и 213-218; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95;
 или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и
 необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

6. Способ изменения последовательности ДНК, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. последовательности, которая содержит 15 последовательных нуклеотидов $\pm$ 10 нуклеотидов с координатами генома, перечисленными в любой из Таблиц 2 и/или 3 для SEQ ID №: 90-218;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (i);

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из (i);

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

7. Способ снижения экспрессии гена TRAC, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113, 185 и 213-218; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95; или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

8. Способ иммунотерапии, включающий введение композиции субъекту, его аутологичной клетке и/или аллогенной клетке, при этом композиция содержит:

(а) направляющую РНК, содержащую последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной

из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113, 185 и 213-218; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95; или

(б) нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК из (а); и необязательно

(в) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

9. Способ изменения последовательности ДНК в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, включающий доставку в клетку первой направляющей РНК, второй направляющей РНК и, необязательно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, где первая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6, и

при этом вторая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

vi. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

viii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ix. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113, 185 и 213-218; и

x. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95.

10. Способ снижения экспрессии генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, включающий доставку в клетку первой направляющей РНК, второй направляющей РНК и, необязательно, РНК направляемого ДНК-связывающего агента или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, где первая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности,

выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6, и

при этом вторая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113, 185 и 213-218; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95.

11. Способ иммунотерапии, включающий введение композиции субъекту, его аутологичной клетке или аллогенной клетке, при этом композиция содержит: первую направляющую РНК, вторую направляющую РНК и, необязательно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, при этом первая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-24; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1-6, и

при этом вторая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

vi. направляющей последовательности выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

viii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218;

ix. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-113,

185 и 213-218; и

х. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90-95.

12. Способ экспрессии гетерологичного иммунологического рецептора посредством локуса вставки в локус TRAC, включающий доставку в клетку первой направляющей РНК, второй направляющей РНК и РНК направляемого ДНК-связывающего агента или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, где первая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

i. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89;

iv. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 1, 2, 3, 5, 6; и

v. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 2, 3, 5, 6 и при этом вторая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из:

vi. направляющей последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90, 95, 97, 98, 185, 214, 218;

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90, 95, 97, 98, 185, 214 и 218;

viii. направляющей последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90, 95, 97, 98, 185, 214 и 218;

ix. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90, 95, 97, 185 и 214;

x. направляющей последовательности, содержащей любую из SEQ ID №: 90, 95 и 185; и

xi. направляющей последовательности, содержащей SEQ ID №: 90 или 214.

13. Способ по любому из п.п. 9-12, отличающийся тем, что первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID № 2, а вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID № 90.

14. Способ по любому из п.п. 9-12, отличающийся тем, что первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID № 180, а вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID № 186.

15. Способ по любому из п.п. 9-12, отличающийся тем, что первая направляющая РНК содержит последовательность любой из SEQ ID №: 1, 2, 3, 5, 6, а вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID № 90.

16. Способ по любому из п.п. 9-12, отличающийся тем, что первая направляющая

РНК содержит последовательность любого из SEQ ID №: 1, 2, 3, 5, 6, а вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID № 214.

17. Способ по любому из п.п. 9-16, отличающийся тем, что первую направляющую РНК, вторую направляющую РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, вводят в основном в одно и то же время.

18. Способ по любому из п.п. 9-17, отличающийся тем, что последовательности ДНК в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC изменяются одновременно.

19. Способ по любому из п.п. 1-18, отличающийся тем, что вводят РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

20. Способ по любому из п.п. 1-19, отличающийся тем, что дополнительно включает:

а. индуцирование двухцепочечного разрыва (DSB) в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в клетке и/или субъекте; или

б. индуцирование одноцепочечного разрыва (SSB) в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в клетке и/или субъекте; или

в. снижение экспрессии генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в клетке и/или субъекте.

21. Способ по любому из п.п. 1-20, отличающийся тем, что дополнительно включает введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей интересующий полипептид, где необязательно:

а. один или более представляющих интерес полипептидов содержат рецептор;

б. один или более представляющих интерес полипептидов содержат иммунологический рецептор;

в. один или более представляющих интерес полипептидов содержат Т-клеточный рецептор, далее необязательно, где Т-клеточный рецептор распознает раковый антиген;

г. один или более представляющих интерес полипептидов включают WT1-специфический Т-клеточный рецептор, где Т-клеточный рецептор распознает WT1 или его фрагмент;

д. один или более представляющих интерес полипептидов содержат рецептор химерного антигена, далее необязательно, где рецептор химерного антигена распознает раковый антиген; или

е. один или более представляющих интерес полипептидов содержат рецептор химерного антигена, специфичный для WT1, при этом рецептор химерного антигена распознает WT1 или его фрагмент.

22. Способ по любому из п.п. 1-20, отличающийся тем, что дополнительно включает:

а. введение α -цепи TCR и β -цепи TCR;

б. введение одной или более последовательностей нуклеиновых кислот, которые

кодируют α -цепь TCR и β -цепь TCR;

в. введение WT1-специфической α -цепи и β -цепи TCR;

г. введение одной или более последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют α -цепь и β -цепь WT1-специфичного TCR;

д. введение первой последовательности TCR, выбранной из: (i) SEQ ID № 501 или 504; (ii) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 501 или 504; и (iii) смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 или 250 аминокислот SEQ ID № 501 или 504,

и

введение второй последовательности TCR, выбранной из: (i) SEQ ID № 502 или 505; (ii) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 502 или 505; и (iii) смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или 300 аминокислот SEQ ID № 502 или 505,

е. введение первой последовательности TCR, выбранной из: (i) SEQ ID № 501 или 513; (ii) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 510 или 513; и (iii) смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 или 250 аминокислот SEQ ID №: 510 или 513,

и

введение второй последовательности TCR, выбранной из: (i) SEQ ID № 511 или 514; (ii) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60% идентична SEQ ID № 511 или 514; и (iii) смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или 300 аминокислот SEQ ID № 511 или 514,

ж. введение последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую первую последовательность TCR из (д) или (е);

з. введение последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую вторую последовательность TCR из (д) или (е);

и. введение последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты из (ж) и (з);

к. введение полипептида, выбранного из SEQ ID №: 500, 503, 506, 509, 512, 515, 518 или 521, или аминокислотной последовательности, которая идентична ему по меньшей мере на 99%, 95%, 90% необязательно путем введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей то же самое;

л. введение α -цепи TCR и β -цепи TCR полипептидов, выбранных из (i) - (vii) ниже или аминокислотной последовательности, которая им по меньшей мере на 99%, 95%, 90% идентична:

i) SEQ ID №: 501 и SEQ ID №: 502;

- ii) SEQ ID №: 504 и SEQ ID №: 505;
- iii) SEQ ID №: 507 и SEQ ID №: 508;
- iv) SEQ ID №: 510 и SEQ ID №: 511;
- v) SEQ ID №: 513 и SEQ ID №: 514;
- vi) SEQ ID №: 516 и SEQ ID №: 517;
- vii) SEQ ID №: 519 и SEQ ID №: 520;

м. введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид α -цепи TCR и β -цепи TCR (л).

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что первая последовательность нуклеиновой кислоты фланкирована последовательностями, гомологичными первому целевому локусу.

24. Способ по п. 22, отличающийся тем, что вторая последовательность нуклеиновой кислоты фланкирована последовательностями, гомологичными второму целевому локусу.

25. Способ по любому из п.п. 23-24, отличающийся тем, что первый целевой локус является геном TRAC, TRBC1 или TRBC2, например, геном TRAC.

26. Способ по любому из п.п. 24-25, отличающийся тем, что второй целевой локус является геном TRAC, TRBC1 или TRBC2, например, либо геном TRBC1, либо TRBC2.

27. Способ по любому из п.п. 23-26, отличающийся тем, что фланкирующие последовательности имеют длину по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов.

28. Способ по любому из п.п. 22-27, отличающийся тем, что введенная последовательность нуклеиновой кислоты или первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты не содержат промоторов.

29. Способ по любому из п.п. 22-27, отличающийся тем, что введенная последовательность нуклеиновой кислоты или первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны с промотором, необязательно, где промотор является промотором EF-1 α (например, SEQ ID №: 603).

30. Способ по любому из п.п. 22-29, отличающийся тем, что введенная последовательность нуклеиновой кислоты или первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты вводятся через вектор, через трансфекцию, через липидную наночастицу или через микроинъекцию.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что вектором является вирусный вектор, далее необязательно, где вирусным вектором является аденоассоциированный вирусный вектор.

32. Способ встраивания в локус TCR (такого, как WT1-специфический TCR), содержащий доставку в клетку (i) первой направляющей РНК для вставки TCR, которая содержит направляющую последовательность, выбранную из: SEQ ID №: 90, 95, 97, 98, 185, 214 и 218, (ii) РНК направляющего ДНК-связывающего агента или нуклеиновой

кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и (iii) молекулы донорной нуклеиновой кислоты, которая кодирует TCR (такой, как WT1-специфический TCR).

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что дополнительно включает доставку второй направляющей РНК, содержащей последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-89.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что вторая направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из SEQ ID №: 179-184.

35. Способ по любому из п.п. 32-34, отличающийся тем, что TCR является WT1-специфическим TCR, который содержит:

(а) полипептид, выбранный из SEQ ID NO: 500, 503, 506, 509, 512, 515, 518 или 521, или аминокислотную последовательность, которая идентична ей по меньшей мере на 99%, 95%, 90%; или

(б) полипептиды α -цепи TCR и β -цепи TCR, выбранные из (i) - (viii) ниже или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90% им идентична:

- i) SEQ ID №: 501 и SEQ ID №: 502;
- ii) SEQ ID №: 504 и SEQ ID №: 505;
- iii) SEQ ID №: 507 и SEQ ID №: 508;
- iv) SEQ ID №: 510 и SEQ ID №: 511;
- v) SEQ ID №: 513 и SEQ ID №: 514;
- vi) SEQ ID №: 516 и SEQ ID №: 517;
- vii) SEQ ID №: 519 и SEQ ID №: 520;
- viii) SEQ ID №: 522 и SEQ ID №: 523.

36. Композиция, содержащая:

- а. направляющую РНК, содержащую
 - i. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-89; или
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89; или
 - iii. направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89; или
 - iv. направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1-24; или
 - v. направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1-6; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

37. Композиция по п. 36, отличающаяся тем, что ее применяют при изменении последовательности ДНК с помощью гена TRBC1 и/или TRBC2 в клетке.

38. Композиция по п.п. 36 или 37, отличающаяся тем, что ее используют для снижения экспрессии генов TRBC1 и/или TRBC2 в клетке.

39. Композиция по любому из п.п. 36-38, отличающаяся тем, что направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 196-200.

40. Композиция, содержащая:

а. направляющую РНК, содержащую

i. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218; или

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218; или

iii. направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218; или

iv. направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; или

v. направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 90-95; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

41. Композиция по п. 40, отличающаяся тем, что ее применяют при изменении последовательности ДНК с помощью гена TRAC в клетке.

42. Композиция по п.п. 40 или 41, отличающаяся тем, что ее применяют для снижения экспрессии гена TRAC в клетке.

43. Композиция по любому из п.п. 40-42, отличающаяся тем, что направляющая РНК содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 185-192 и 201-212.

44. Клетка, измененная способом по любому из п.п. 1-43.

45. Клетка по п. 44, где клетка изменена *ex vivo*.

46. Клетка по п.п. 44 или 45, отличающаяся тем, что клетка является Т-клеткой.

47. Клетка по любому из п.п. 44-46, отличающаяся тем, что клетка является CD3⁺, CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеткой.

48. Клетка по любому из п.п. 44-47, отличающаяся тем, что клетка является клеткой млекопитающего, примата или человека.

49. Клетка по любому из п.п. 44-48, отличающаяся тем, что она лишена эндогенного Т-клеточного рецептора, для получения Т-клетки, экспрессирующей неэндогенный Т-клеточный рецептор.

50. Клетка по любому из п.п. 44-48, отличающаяся тем, что она лишена эндогенного Т-клеточного рецептора, для получения Т-клетки, экспрессирующей CAR.

51. Клетка по любому из п.п. 44-50, отличающаяся тем, что измененная клетка является CD3⁻ клеткой.

52. Клетка по любому из п.п. 44-51, отличающаяся тем, что клетка является клеткой CD3⁺ до изменения, а измененная клетка является клеткой CD3⁻.

53. Клетка по любому из п.п. 44-52, отличающаяся тем, что дополнительно содержит одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих интересующий полипептид, необязательно где:

- а. один или более представляющих интерес полипептидов содержат рецептор;
- б. один или более представляющих интерес полипептидов содержат иммунологический рецептор;
- в. один или более представляющих интерес полипептидов включают Т-клеточный рецептор, при этом дополнительно Т-клеточный рецептор необязательно специфичен для WT1; или
- г. один или более представляющих интерес полипептидов содержат рецептор химерного антигена, при этом дополнительно рецептор химерного антигена необязательно специфичен для WT1.

54. Клетка по любому из п.п. 44-53, отличающаяся тем, что дополнительно содержит одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих α - и β -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора.

55. Клетка по п. 54, отличающаяся тем, что одна или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих α - и β -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора, находятся в локусе TRAC генома.

56. Клетка по любому из п.п. 44-55, отличающаяся тем, что дополнительно содержит одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих γ - и δ -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора.

57. Клетка по п. 56, отличающаяся тем, что одна или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих γ - и δ -цепи экзогенного Т-клеточного рецептора, находятся в локусе TRAC генома.

58. Клетка по любому из п.п. 54-57, отличающаяся тем, что последовательность α -цепи TCR выбрана из: (i) SEQ ID №: 501 или 504; (ii) последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% или 60% идентична SEQ ID №: 501 или 504; и смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 или 250 аминокислот SEQ ID №: 501 или 504, и

где последовательность β -цепи TCR выбрана из: (i) SEQ ID №: 502 или 505; (ii) последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% или 60% идентична SEQ ID №: 502 или 505; и смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или 300 аминокислот из SEQ ID №: 502 или 505.

59. Клетка по любому из п.п. 54-58, где α -цепь TCR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты согласно любой из SEQ ID №: 500, 501, 503 и 504, а β -TCR-цепь кодируется согласно любой из SEQ ID №: 500, 502, 503 и 505.

60. Клетка по любому из п.п. 54-59, отличающаяся тем, что последовательность α -

цепи TCR выбрана из: (i) SEQ ID №: 513; (ii) последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% или 60% идентична SEQ ID №: 513; и смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 или 250 аминокислот SEQ ID №: 513, и

при этом последовательность нуклеиновой кислоты β -цепи TCR выбрана из: (i) SEQ ID №: 514; (ii) последовательности, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% или 60% идентична SEQ ID №: 514; и смежной подпоследовательности из по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или 300 аминокислот SEQ ID №: 514.

61. Клетка по любому из п.п. 54-60, отличающаяся тем, что α -цепь TCR является SEQ ID №: 513, а β -цепь TCR является SEQ ID №: 514.

62. Клетка по любому из п.п. 44-61, отличающаяся тем, что один или более генов экспрессируются под эндогенным промотором.

63. Клетка по любому из п.п. 44-62, в которой один или более генов экспрессируются под гетерологичным промотором, при этом гетерологичный промотор необязательно является промотор EF-1 α .

64. Популяция клеток, содержащая клетки по любому из п.п. 44-63, отличающаяся тем, что более чем примерно 50%, более чем примерно 55%, более чем примерно 60%, более чем примерно 65%, более чем примерно 70%, более чем примерно 75%, более чем примерно 80%, более чем примерно 85%, более чем примерно 90%, более чем примерно 95%, более чем примерно 98% или более чем примерно 99% измененной популяции являются CD3⁺ клетками.

65. Популяция по п. 64, отличающаяся тем, что более чем примерно 90% популяции составляют CD3⁺.

66. Популяция по п. 64, отличающаяся тем, что более чем примерно 95% популяции составляют CD3⁺.

67. Популяция по п. 64, отличающаяся тем, что более чем около 99% популяции составляют CD3⁺.

68. Популяция клеток, содержащая клетки по любому из п.п. 44-63, отличающаяся тем, что более чем около 50%, более чем около 55%, более чем около 60%, более чем около 65%, более чем около 70%, более чем около 75%, более чем около 80%, более чем около 85%, более чем около 90%, более чем около 95%, более чем около 98% или более чем около 99% популяции не имеют эндогенного Т-клеточного рецептора.

69. Популяция по п. 68, отличающаяся тем, что более чем примерно 90% популяции не имеют эндогенного Т-клеточного рецептора.

70. Популяция по п. 68, отличающаяся тем, что более чем примерно 95% популяции не имеют эндогенного Т-клеточного рецептора.

71. Популяция по п. 68, отличающаяся тем, что более чем примерно 99% популяции не имеют эндогенного Т-клеточного рецептора.

72. Популяция клеток, содержащая клетки по любому из п.п. 44-63, отличающаяся

тем, что экспрессия генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC в популяции снижена по сравнению с неизменной популяцией той же клетки по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 55%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 65%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 75%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 85%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95%, по меньшей мере, примерно на 98% или по меньшей мере, примерно на 99%.

73. Популяция по п. 72, отличающаяся тем, что снижение экспрессии генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC составляет по меньшей мере примерно 90%.

74. Популяция по п. 72, отличающаяся тем, что снижение экспрессии генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC составляет по меньшей мере примерно 95%.

75. Популяция по п. 72, отличающаяся тем, что снижение экспрессии генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC составляет по меньшей мере около 99%.

76. Популяция по любому из п.п. 64-75, отличающаяся тем, что происходит снижение экспрессии гена TRBC1.

77. Популяция по любому из п.п. 64-76, отличающаяся тем, что происходит снижение экспрессии гена TRBC2.

78. Популяция по любому из п.п. 64-77, отличающаяся тем, что происходит снижение экспрессии гена TRAC.

79. Популяция клеток, содержащая клетки по любому из п.п. 44-78, отличающаяся тем, что от 10 до 100% популяции, например, от 30 до 99% популяции имеет инсерцию в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

80. Популяция по п. 79, отличающаяся тем, что от 30 до 35%, от 35 до 40%, от 40 до 45%, от 45 до 50%, от 50 до 55%, от 55 до 60%, от 60 до 65%, от 65 до 70%, от 70 до 75%, от 75 до 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95% или от 95 до 99% популяции имеют инсерцию в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

81. Популяция по п.п. 76 или 79, отличающаяся тем, что инсерция или вставка находится в гене TRBC1.

82. Популяция по пункту 77 или 79, отличающаяся тем, что инсерция или вставка находится в гене TRBC2.

83. Популяция по пункту 78 или 79, отличающаяся тем, что инсерция или вставка находится в гене TRAC.

84. Способ или композиция для применения по любому из п.п. 1-4 или 9-43, отличающиеся тем, что композиция приводит к редактированию генов TRBC1 и/или TRBC2.

85. Способ или композиция для применения по любому из п.п. 4-43, отличающиеся тем, что композиция приводит к редактированию гена TRAC.

86. Способ или композиция для применения по любому из п.п. 9-43, отличающиеся тем, что композиция приводит к редактированию гена TRBC и гена TRAC.

87. Способ или композиция для применения по любому из п.п. 79-86,

отличающиеся тем, что редактирование вычисляется в процентах от редактируемой популяции (процент редактирования или процент инсерций).

88. Способ или композиция для применения по любому из п.п. 84-87, отличающиеся тем, что процент редактирования составляет от 30 до 35%, от 35 до 40%, от 40 до 45%, от 45 до 50%, от 50 до 55%, от 55 до 60%, от 60 до 65%, от 65 до 70%, от 70 до 75%, от 75 до 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95% или от 95 до 99% популяции.

89. Способ или композиция по любому из п.п. 4-43, отличающиеся тем, что композиция содержит sgPНК, содержащую:

- а. любую из SEQ ID №: 179-184 и 196-200; или
- б. направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 1-89; или
- в. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-24; или
- г. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-6.

90. Способ или композиция по любому из п.п. 4-43, отличающиеся тем, что композиция содержит sgPНК, содержащую:

- а. любую из SEQ ID №: 186-192 и 201-212; или
- б. направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 90-178 и 213-218; или
- в. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 90-113 и 213-218; или
- г. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 90-95.

91. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43, отличающиеся тем, что целевая последовательность находится в экзоне 1, 2, 3 или 4 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

92. Способ или композиция по п. 91, отличающиеся тем, что целевая последовательность находится в экзоне 1 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

93. Способ или композиция по п. 91, отличающиеся тем, что целевая последовательность находится в экзоне 2 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

94. Способ или композиция по п. 91, отличающиеся тем, что целевая последовательность находится в экзоне 3 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

95. Способ или композиция по п. 91, отличающиеся тем, что целевая последовательность находится в экзоне 4 генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

96. Способ или композиция по любому из п.п. 91-95, отличающиеся тем, что целевая последовательность находится в генах TRBC1, TRBC2 и/или TRAC человека.

97. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43, отличающиеся тем, что направляющая последовательность комплементарна целевой последовательности в положительной цепи TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

98. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43, отличающиеся тем, что направляющая последовательность комплементарна целевой последовательности отрицательной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

99. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 и п.п. 84-98, отличающиеся тем,

что первая направляющая последовательность комплементарна первой целевой последовательности в положительной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC, и где композиция дополнительно содержит вторую направляющую последовательность, которая комплементарна второй целевой последовательности в отрицательной цепи генов TRBC1, TRBC2 и/или TRAC.

100. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 и 84-98, отличающиеся тем, что направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 1-178, и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID №: 400, где нуклеотиды SEQ ID №: 400 следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце.

101. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 или 84-98, отличающиеся тем, что направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 1-178, и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 401, где нуклеотиды SEQ ID №: 401 следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце.

102. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 и 84-98, отличающиеся тем, что направляющая РНК модифицирована в соответствии с паттерном SEQ ID №: 300, где N вместе представляют собой любую из направляющих последовательностей SEQ ID № 1-89.

103. Способ или композиция по п. 102, отличающиеся тем, что каждым N в SEQ ID №: 300 является любой природный или неприродный нуклеотид, где N образуют направляющую последовательность, а направляющая последовательность нацелена на Cas9 в TRBC1, TRBC2 и/или гены TRAC.

104. Способ или композиция по любому из п.п. 100-103, отличающиеся тем, что sgРНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 98%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-89.

105. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 и 84-104, отличающиеся тем, что направляющая РНК содержится в вирусном векторе.

106. Способ или композиция по п. 105, отличающиеся тем, что вирусным вектором является вектор аденоассоциированного вируса (AAV).

107. Способ или композиция по пункту 105 или 106, отличающиеся тем, что вирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты любой из SEQ ID №: 613-632 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, или 60% идентична ему.

108. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 и 84-107, отличающиеся тем, что направляющая РНК содержит по меньшей мере одну модификацию.

109. Способ или композиция по п. 108, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация содержит модифицированный 2'-О-метил (2'-О-Ме) нуклеотид.

110. Способ или композиция по п.п. 108 или 109, отличающиеся тем, что содержат

фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

111. Способ или композиция по любому из п.п. 108-110, отличающиеся тем, что содержат 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

112. Способ или композиция по любому из п.п. 108-111, отличающиеся тем, что включает модификацию одного или более из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК.

113. Способ или композиция по любому из п.п. 108-112, отличающиеся тем, что включает модификацию одного или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК.

114. Способ или композиция по любому из п.п. 108-113, отличающиеся тем, что включает связь PS между первыми четырьмя нуклеотидами на 5'-конце направляющей РНК.

115. Способ или композиция по любому из п.п. 108-114, отличающиеся тем, что включает связь PS между последними четырьмя нуклеотидами на 3'-конце направляющей РНК.

116. Способ или композиция по любому из п.п. 108-115, отличающиеся тем, что содержит модифицированный 2'-О-Ме нуклеотид в первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей РНК.

117. Способ или композиция по любому из п.п. 108-116, отличающиеся тем, что содержит модифицированный 2'-О-Ме нуклеотид на последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК.

118. Способ или композиция по любому из п.п. 108-117, отличающиеся тем, что направляющая РНК содержит модифицированные нуклеотиды SEQ ID №: 300.

119. Способ или композиция по любому из п.п. 108-118, отличающиеся тем, что композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель.

120. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 и 84-119, отличающиеся тем, что композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

121. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 и 84-120, в которой направляющая РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент композиции содержится в рибонуклеопротеине (RNP).

122. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 и 84-120, отличающиеся тем, что композиция дополнительно содержит мРНК, которая кодирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

123. Способ или композиция по п.п. 121 или 122, отличающиеся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, является Cas9.

124. Способ или композиция по п. 123, отличающиеся тем, что РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом является белок Cas9.

125. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 и 84-124, отличающиеся тем, что композиция представляет собой фармацевтический препарат и дополнительно содержит фармацевтический приемлемый носитель.

126. Применение композиции, состава, популяции или клетки по любому из п.п. 36-125 для приготовления лекарственного средства.

127. Применение композиции, состава, популяции или клетки по любому из п.п. 36-125, отличающиеся тем, что используются для приготовления лекарственного средства при лечении рака.

128. Применение композиции, состава, популяции или клетки по любому из п.п. 36-125, отличающиеся тем, что используются для приготовления лекарственного средства в иммунотерапии субъекта.

129. Применение композиции, состава, популяции или клетки по любому из п.п. 36-125, отличающиеся тем, что используются для приготовления лекарственного средства при лечении опухолей, которые сверхэкспрессируют опухолевый антиген Вильмса (WT1).

130. Композиция, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 36-125, отличающиеся тем, что применяются при лечении заболевания или расстройства.

131. Композиция, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 36-125, отличающиеся тем, что применяются в иммунотерапии.

132. Композиция, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 36-125, отличающиеся тем, что применяются при лечении рака.

133. Композиция, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 36-125, отличающиеся тем, что применяются при лечении опухолей, которые сверхэкспрессируют опухолевый антиген Вильмса (WT1).

134. Способ лечения человека или животного, включающий введение композиции, состава, популяции или клетки по любому из п.п. 36-125.

135. Способ лечения рака у человека или животного, включающий введение композиции, состава, популяции или клетки по любому из п.п. 36-125.

136. Способ иммунотерапии человека или животного, включающий введение композиции, состава, популяции или клетки по любому пункту из п.п. 36-125.

137. Способ лечения опухолей сверхэкспрессирующих опухолевый антиген Вильмса (WT1), у человека или животного, включающий введение композиции, состава, популяции или клетки по любому из п.п. 36-125.

138. Способ, применение, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 1-4, 9-39, 44-77, 79-82, 84, 86-89 или 91-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 1-89 является SEQ ID №: 1.

139. Способ, применение, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 1-4, 9-39, 44-77, 79-82, 84, 86-89 или 91-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 1-89, является SEQ ID №: 2.

140. Способ, применение, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 1-4, 9-39, 44-77, 79-82, 84, 86-89 или 91-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 1-89, является SEQ ID №: 3.

141. Способ, применение, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 1-4, 9-39, 44-77, 79-82, 84, 86-89 или 91-137, отличающиеся тем, что последовательность

направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 1-89, является SEQ ID №: 84.

222. Способ, применение, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 1-4, 9-39, 44-77, 79-82, 84, 86-89 или 91-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 1-89, является SEQ ID №: 85.

223. Способ, применение, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 1-4, 9-39, 44-77, 79-82, 84, 86-89 или 91-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 1-89, является SEQ ID №: 86.

224. Способ, применение, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 1-4, 9-39, 44-77, 79-82, 84, 86-89 или 91-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 1-89, является SEQ ID №: 87.

225. Способ, применение, состав, популяция или клетка по любому из п.п. 1-4, 9-39, 44-77, 79-82, 84, 86-89 или 91-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 1-89, является SEQ ID №: 88.

226. Способ, применение, композиция или клетка по любому из п.п. 1-4, 9-39, 44-77, 79-82, 84, 86-89 или 91-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК выбранной из SEQ ID №: 1-89 является SEQ ID №: 89.

227. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 185.

228. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 90.

229. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 91.

230. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 92.

231. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 93.

232. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 94.

8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 175.

314. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 176.

315. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 177.

316. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 178.

317. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 213.

318. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 214.

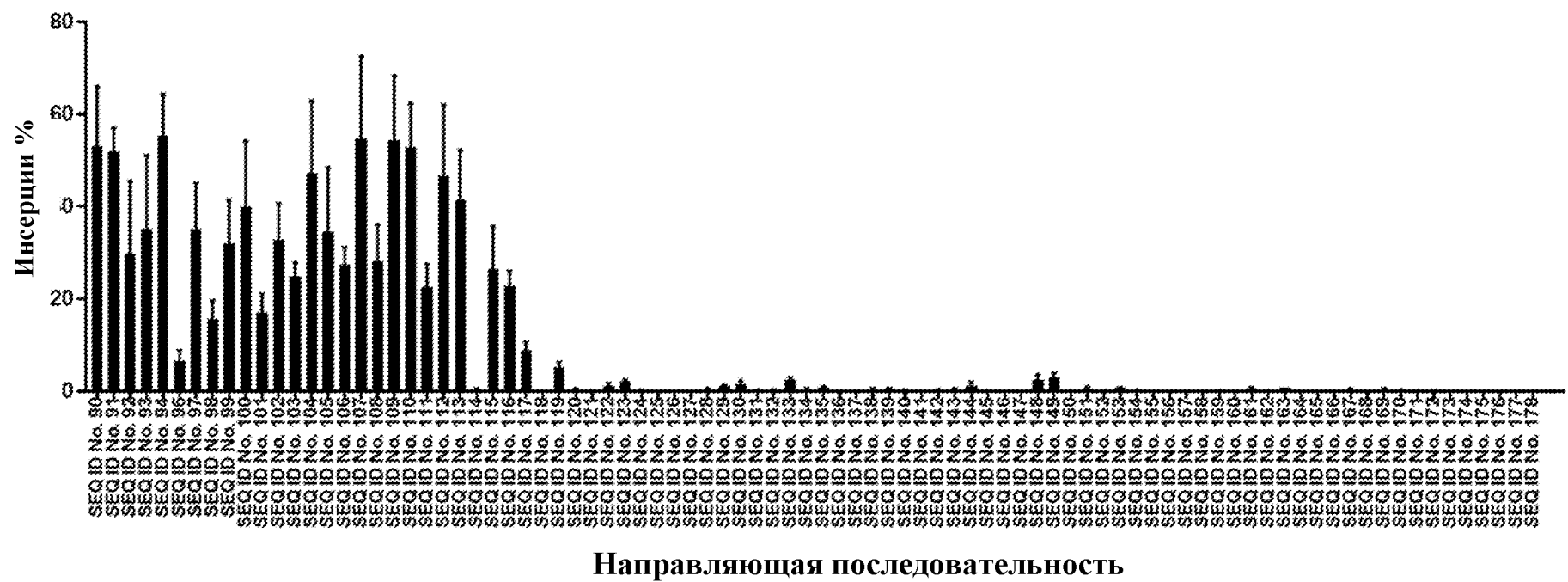
319. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 215.

320. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 216.

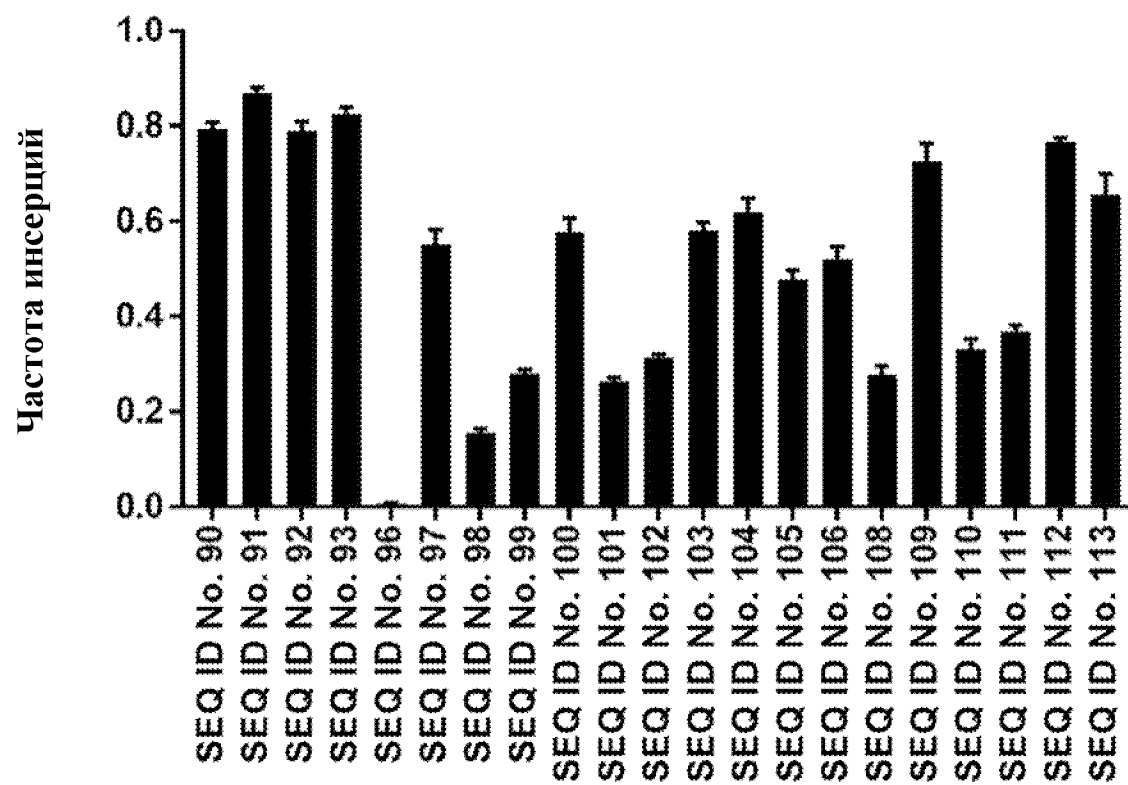
321. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 217.

322. Способ, применение, популяция, клетка или композиция по любому из п.п. 5-8, 9-35, 40-75, 78-80, 83, 85-87 или 90-137, отличающиеся тем, что последовательность направляющей РНК, выбранная из SEQ ID №: 90-178, 185 и 213-218, является SEQ ID №: 218.

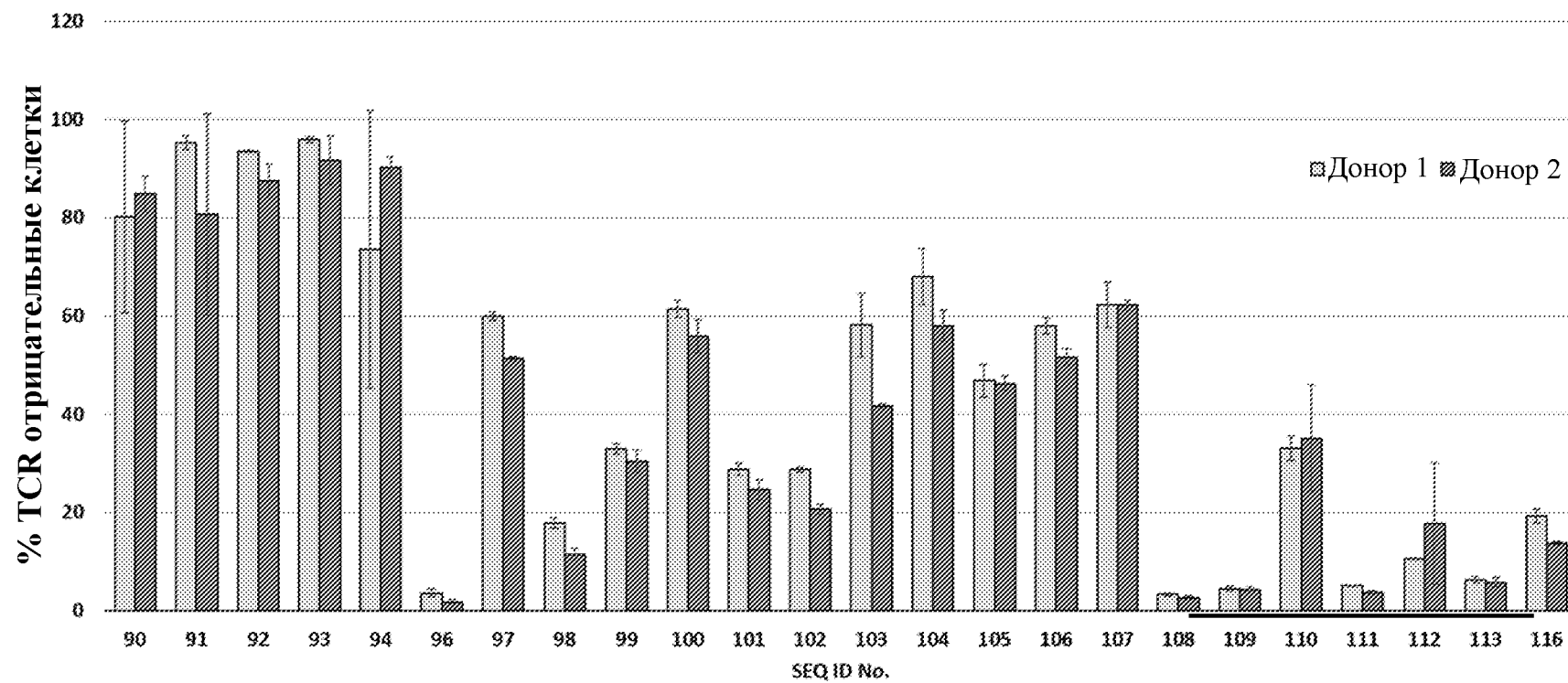
По доверенности



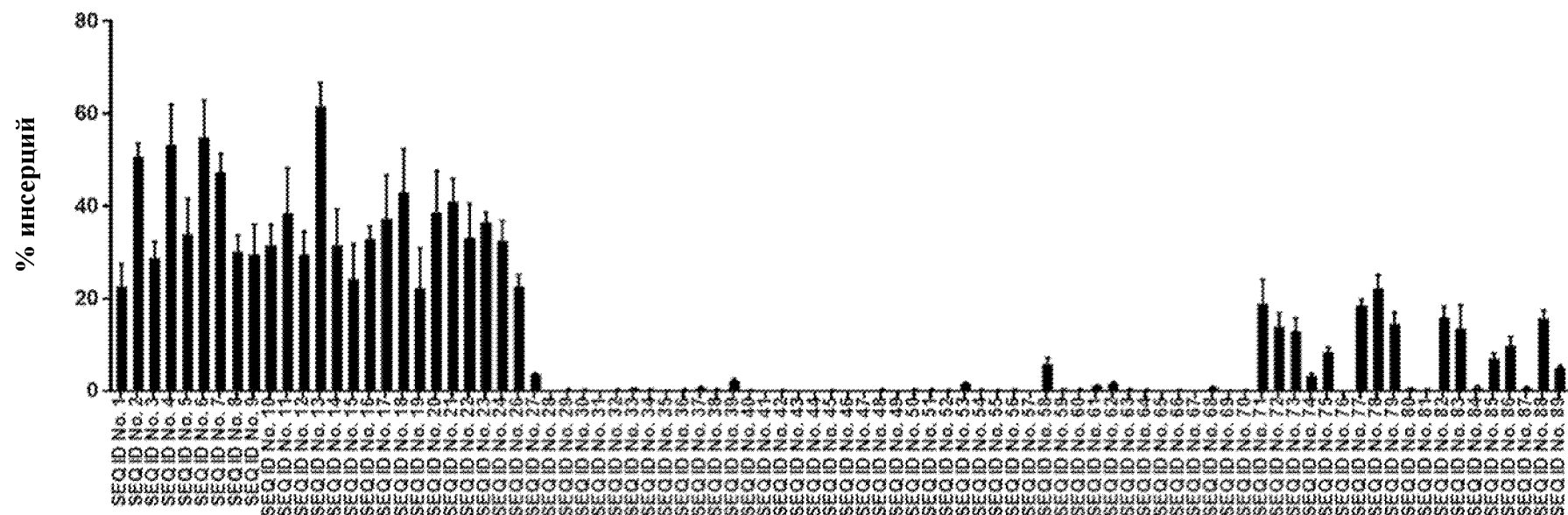
ФИГ. 1



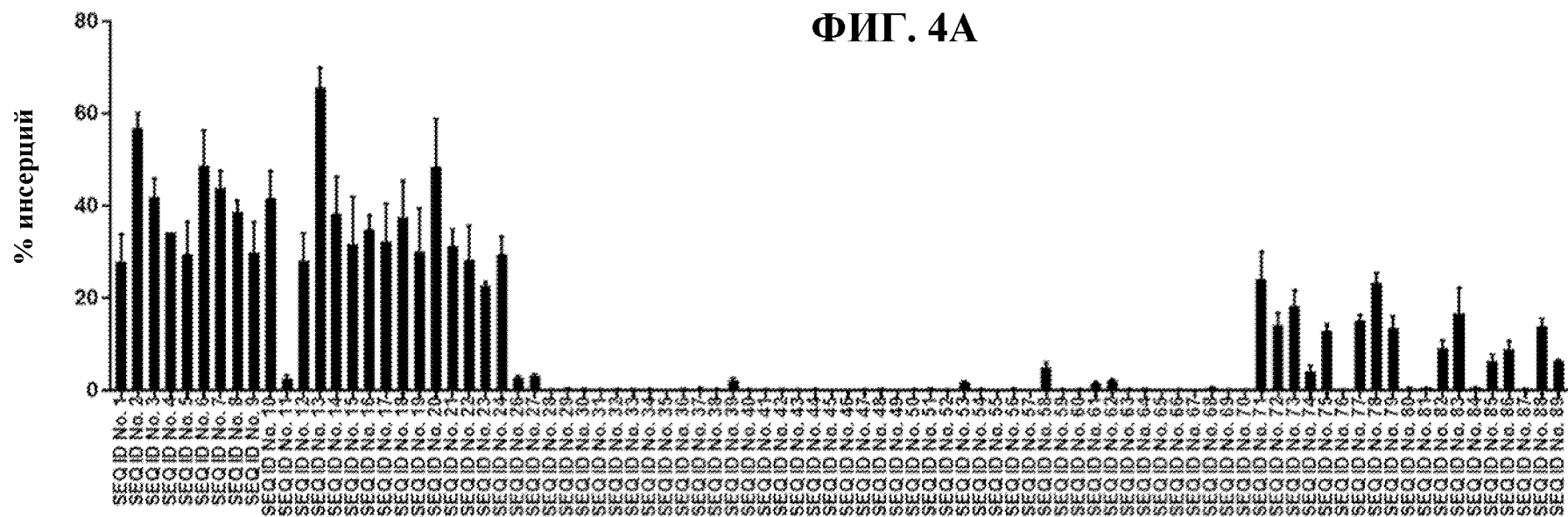
ФИГ. 2



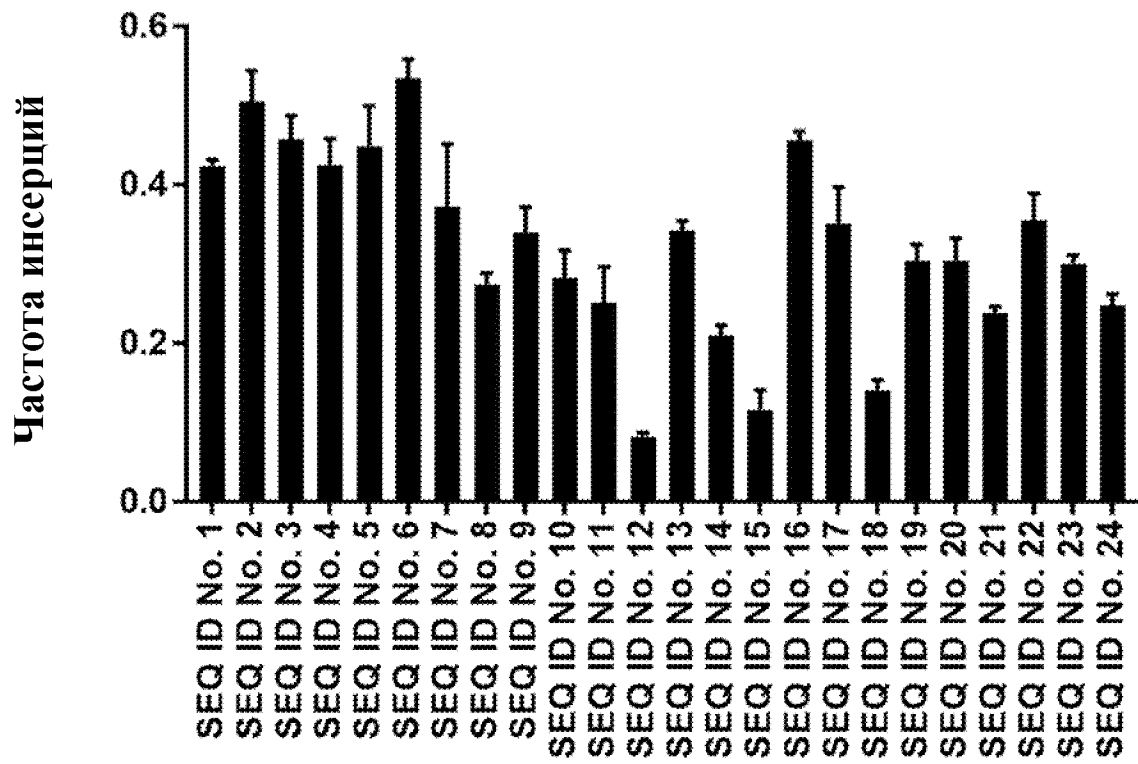
ФИГ. 3



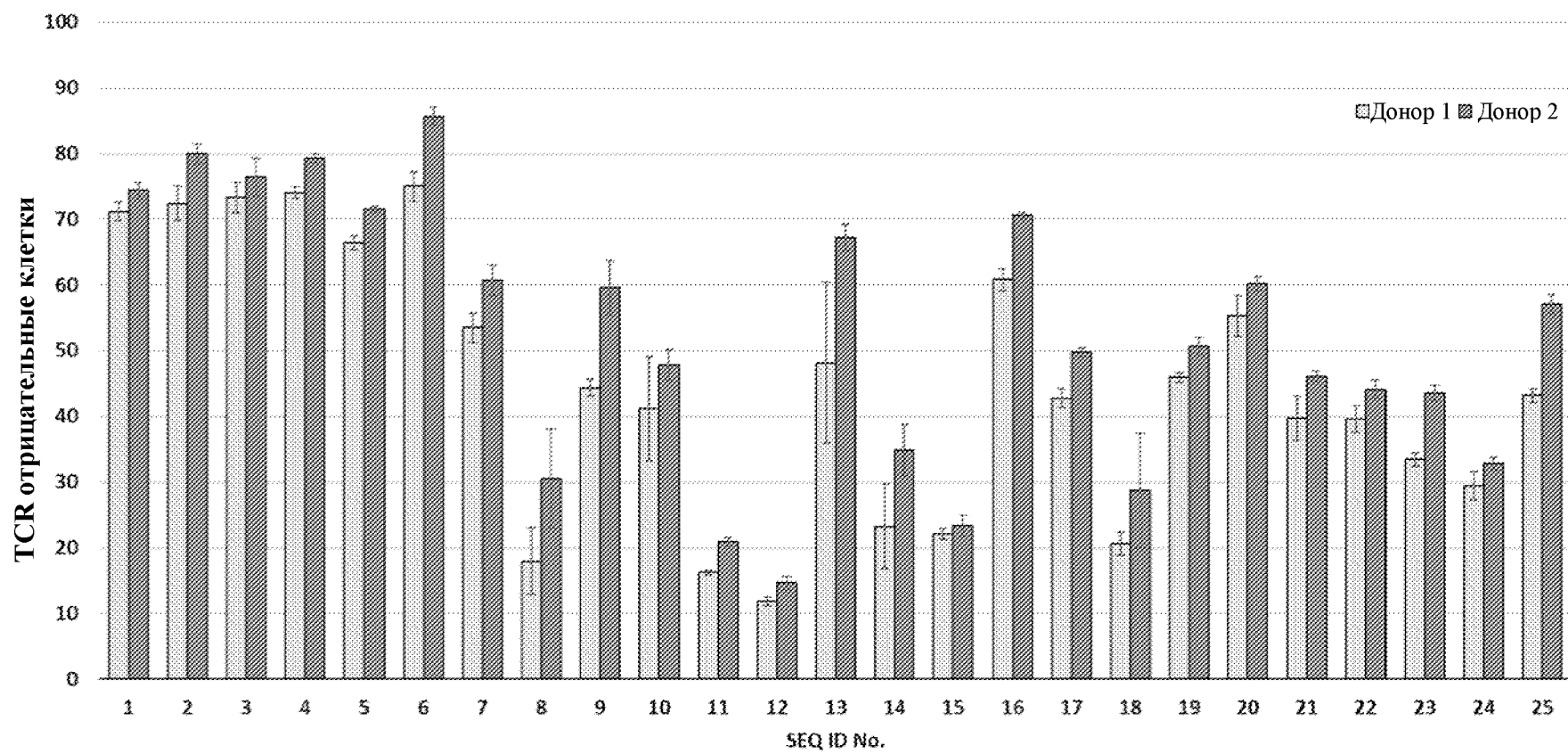
ФИГ. 4А



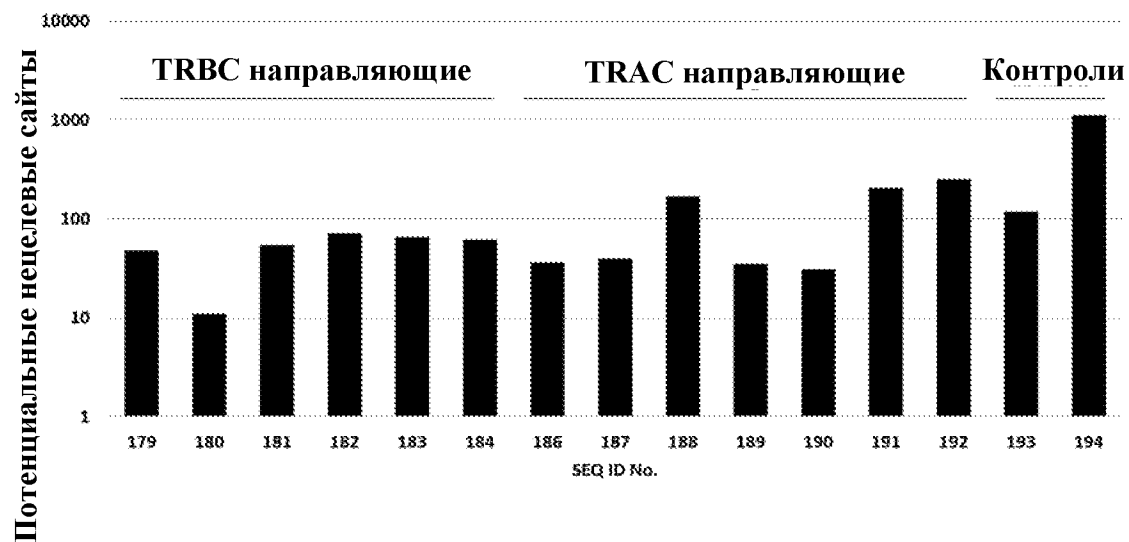
ФИГ. 4В



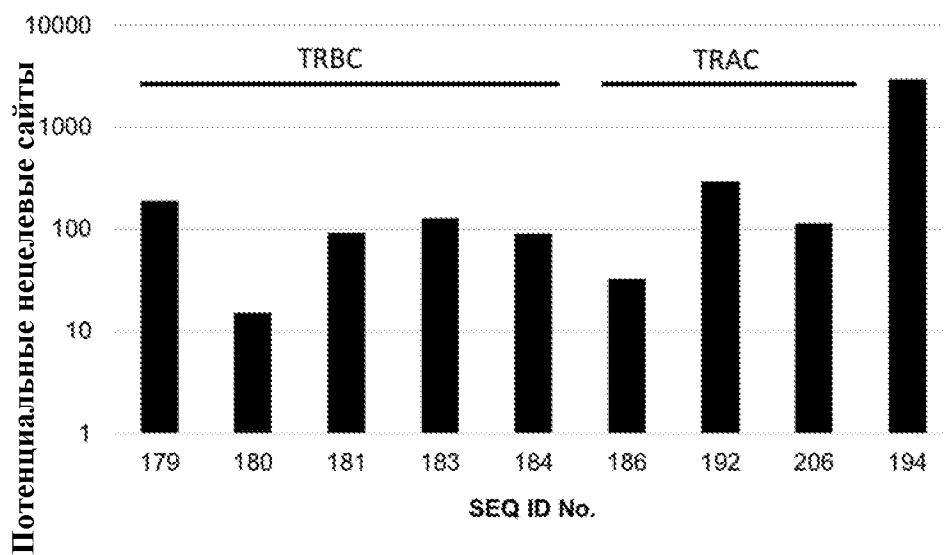
ФИГ. 5



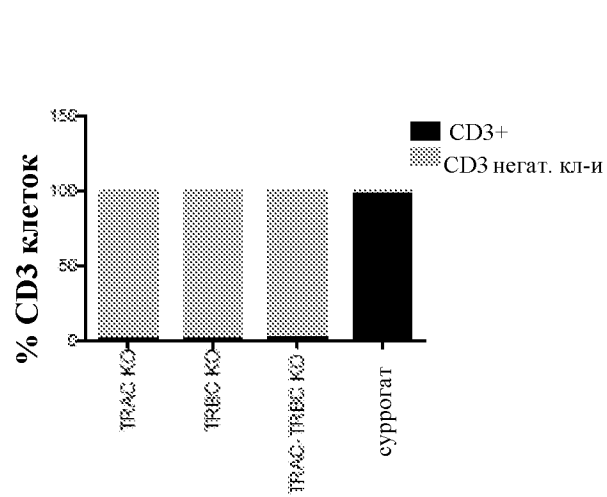
ФИГ. 6



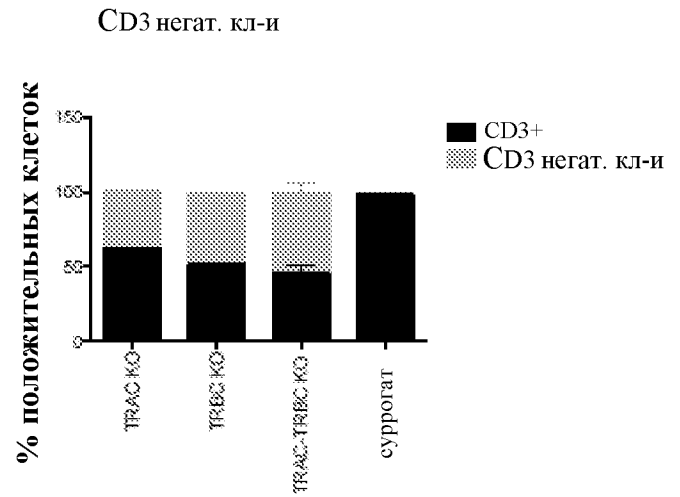
ФИГ. 7А



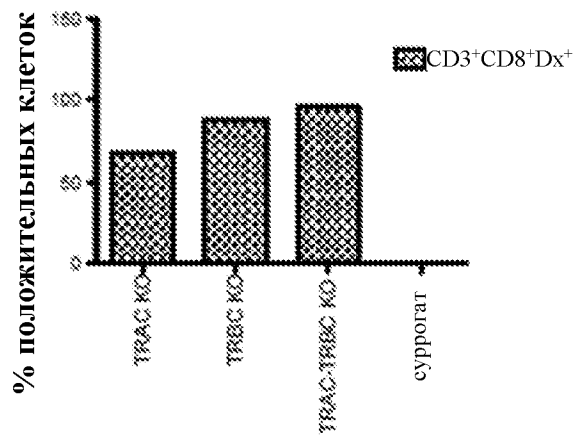
ФИГ. 7В



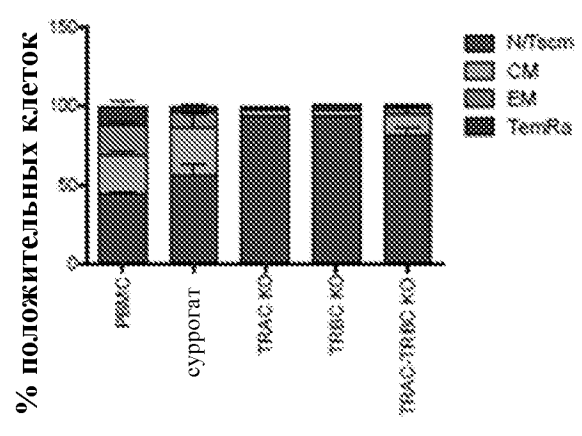
ФИГ. 8А



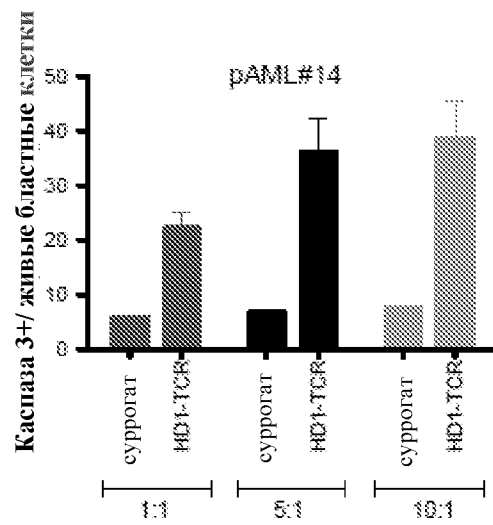
ФИГ. 8В



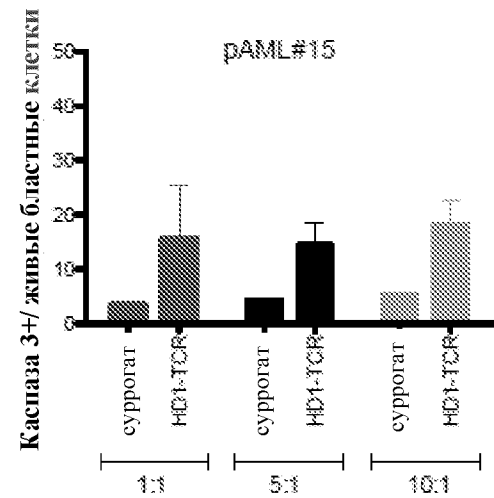
ФИГ. 8С



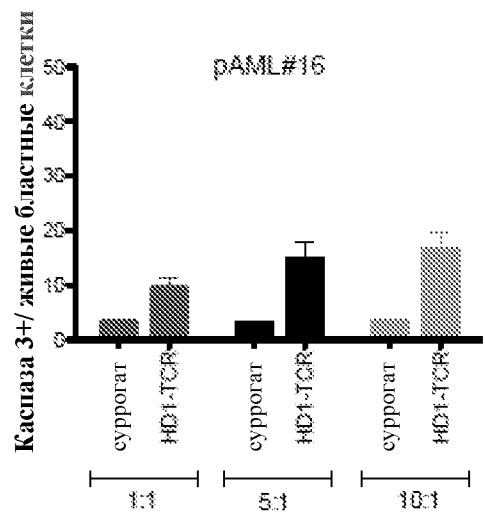
ФИГ. 8D



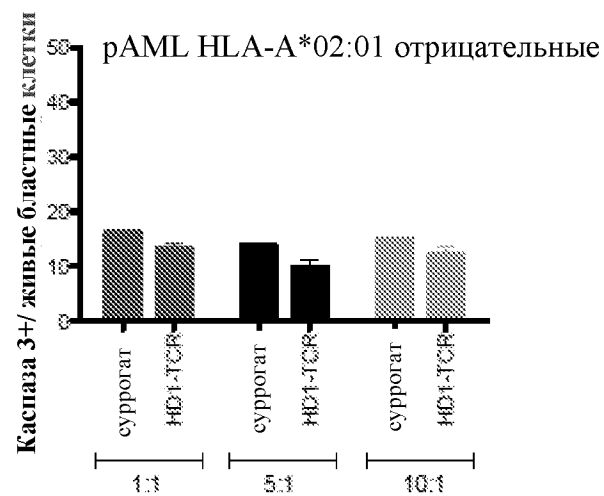
ФИГ. 9А



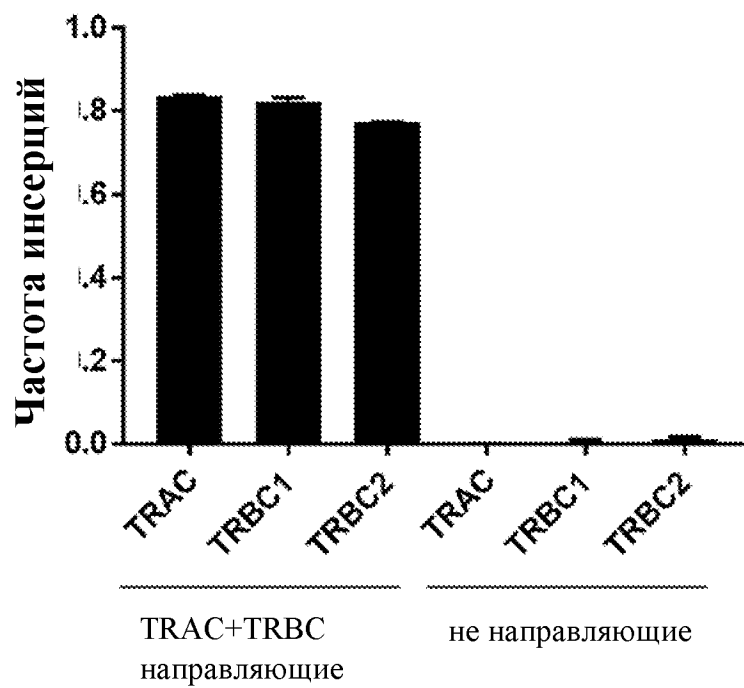
ФИГ. 9В



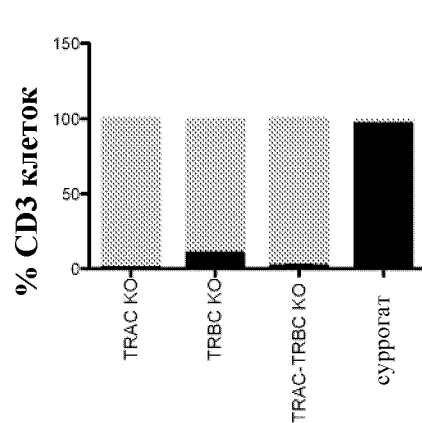
ФИГ. 9С



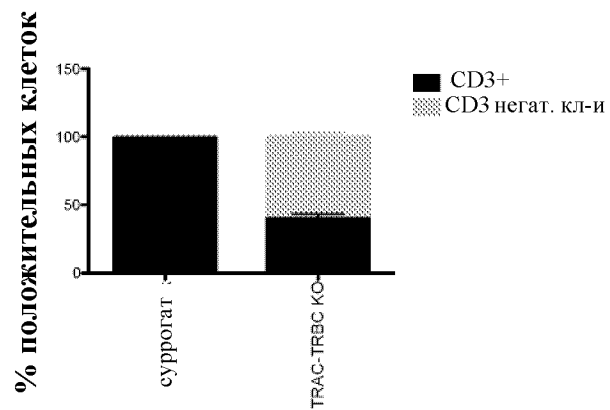
ФИГ. 9D



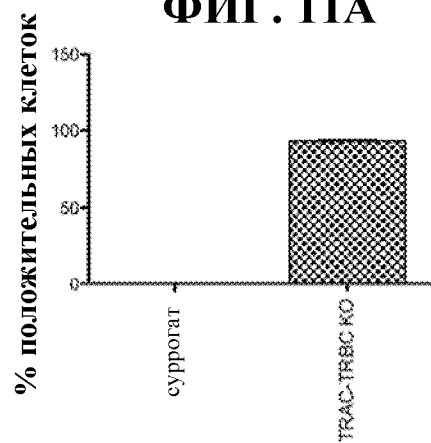
ФИГ. 10



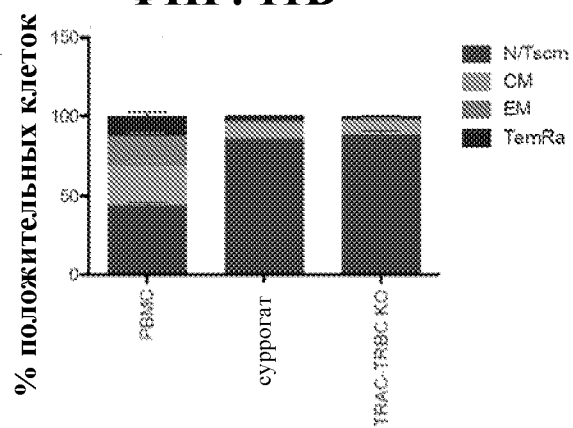
ФИГ. 11А



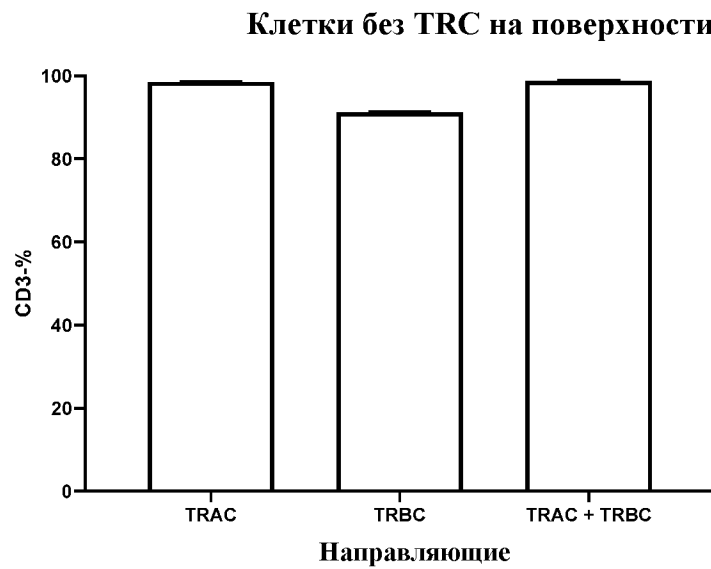
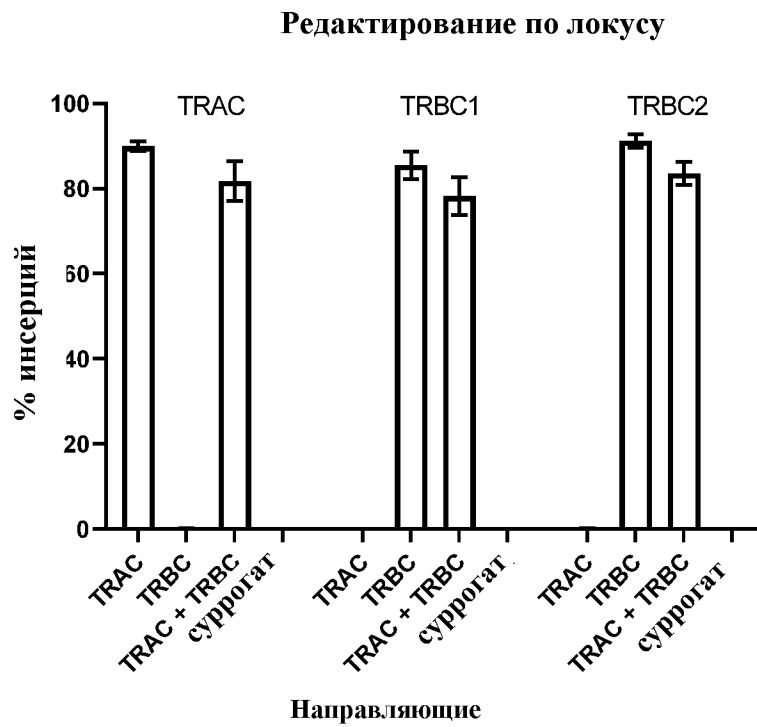
ФИГ. 11В

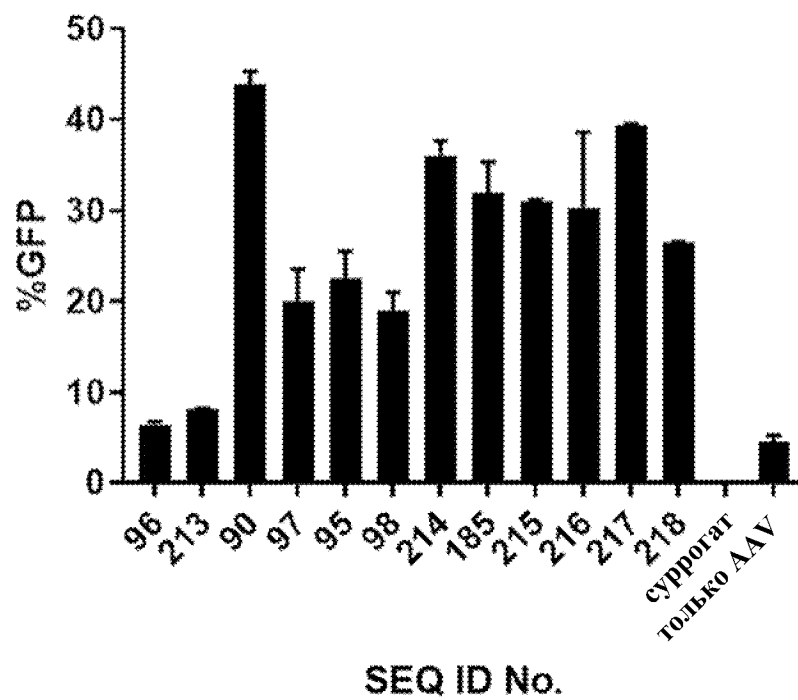


ФИГ. 11С

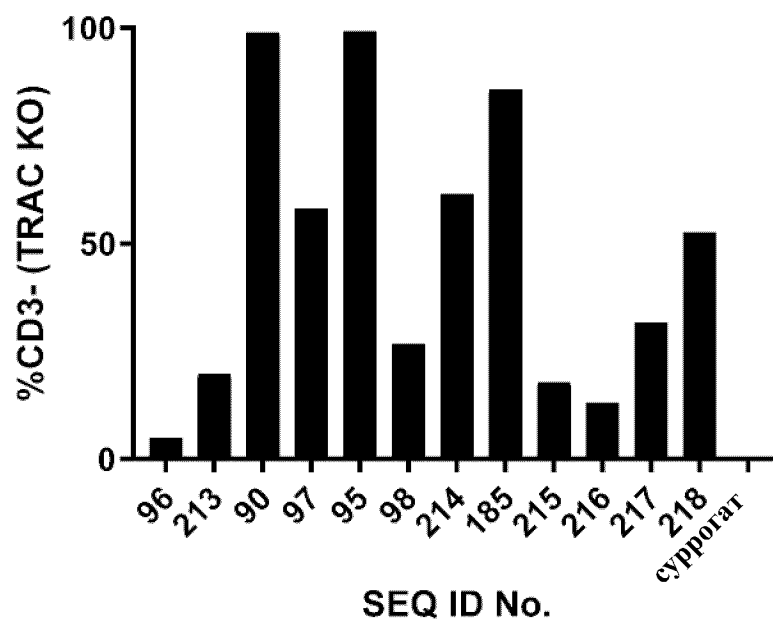


ФИГ. 11D

**ФИГ. 12А****ФИГ. 12В**

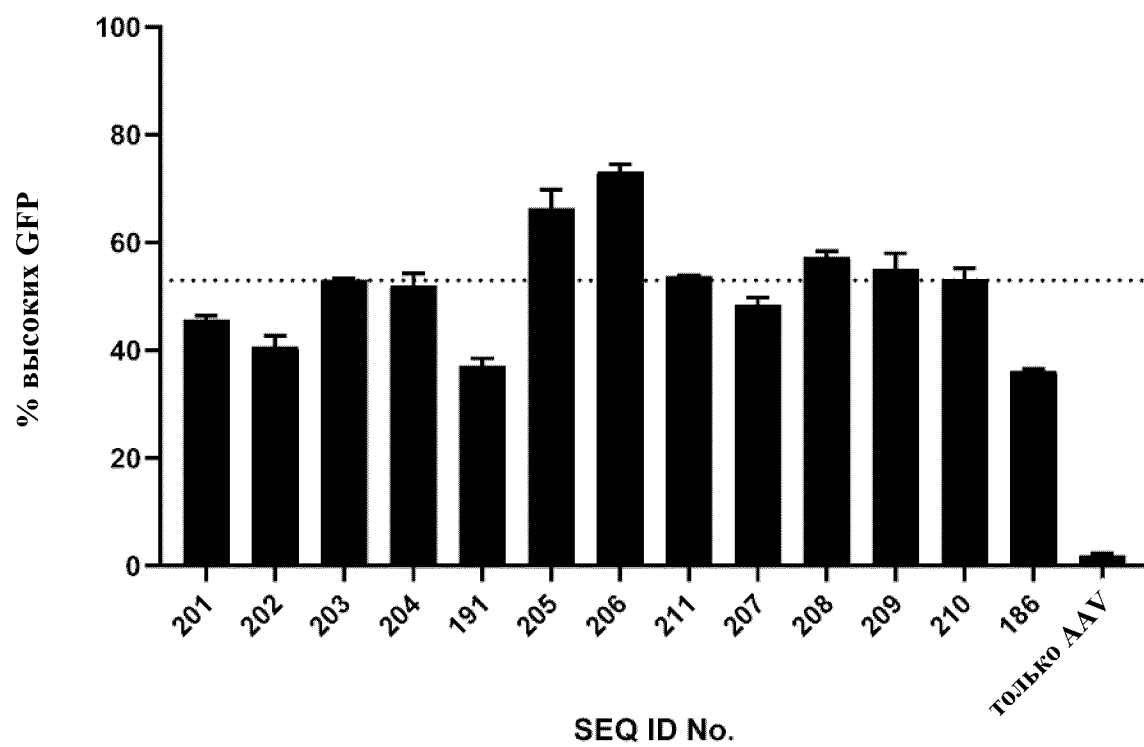


ФИГ. 13А

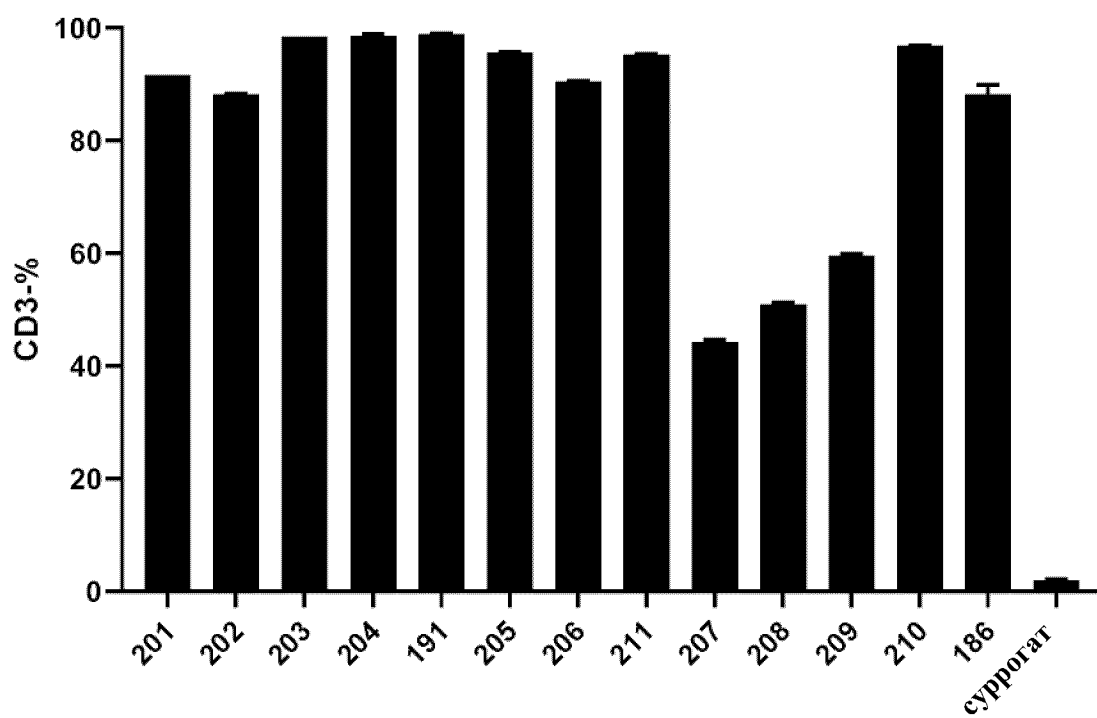


ФИГ. 13В

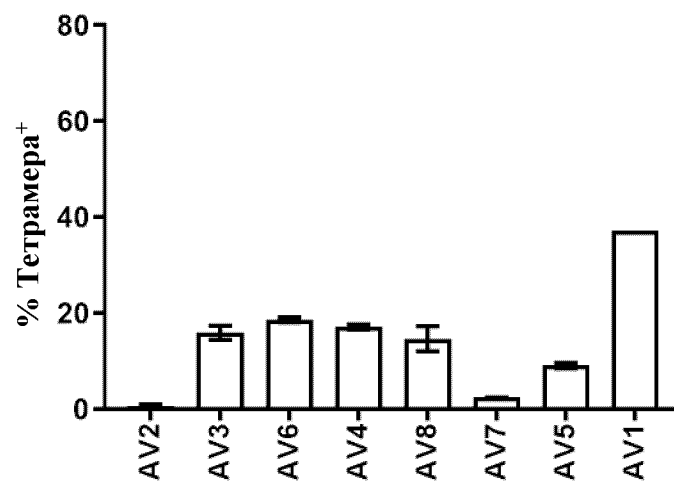
14/39



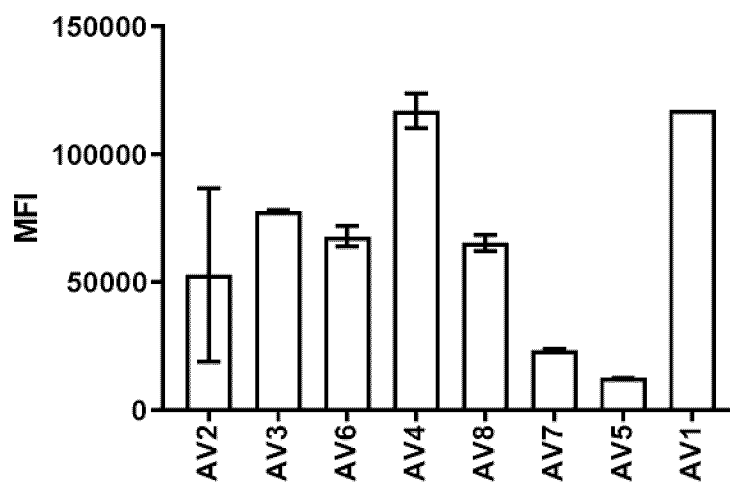
ФИГ. 14А



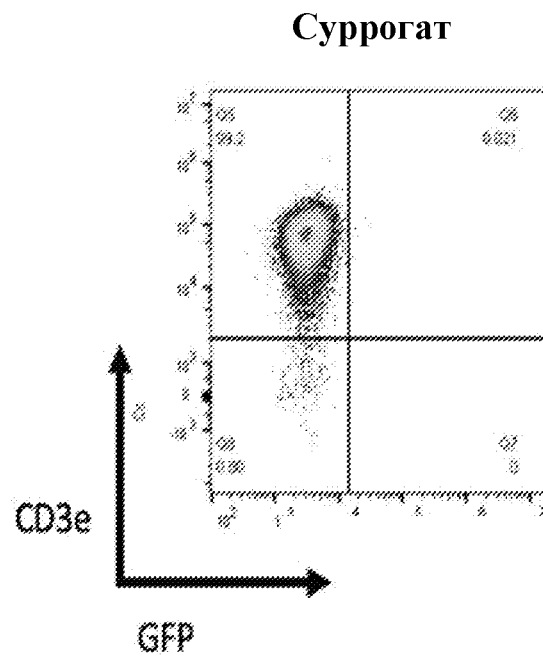
ФИГ. 14В



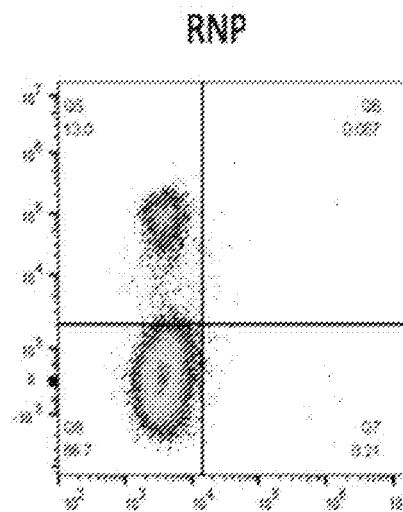
ФИГ. 15А



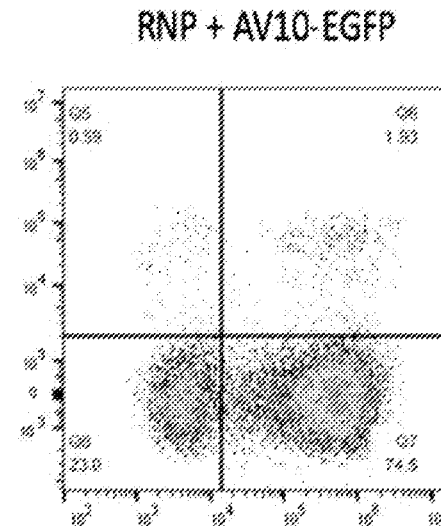
ФИГ. 15В



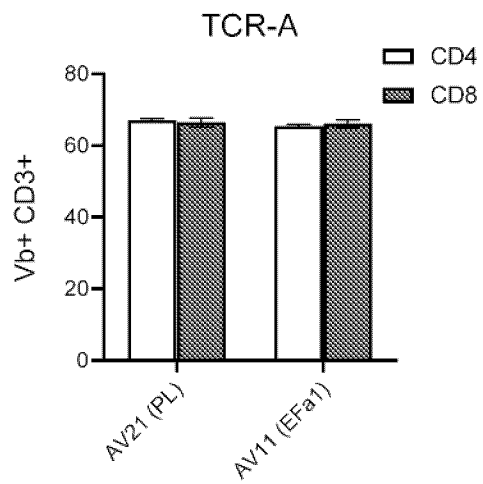
ФИГ. 16А



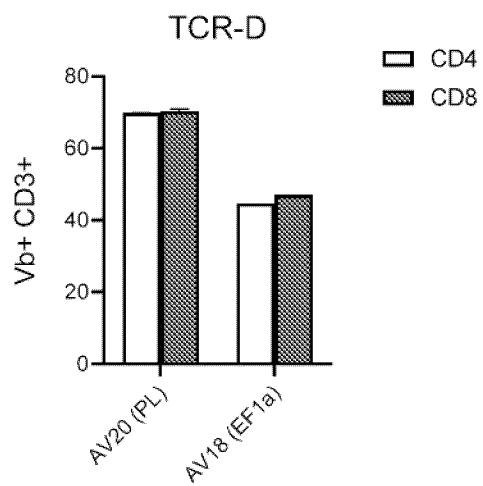
ФИГ. 16В



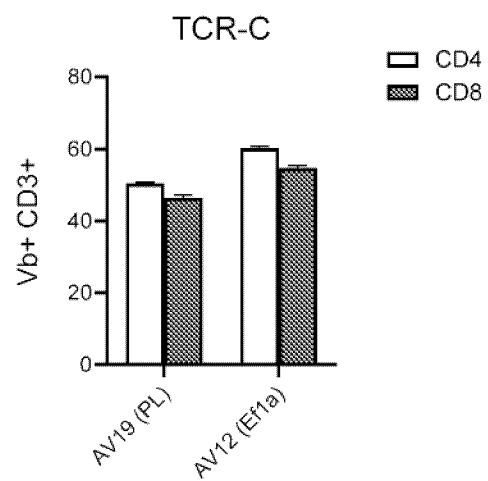
ФИГ. 16С



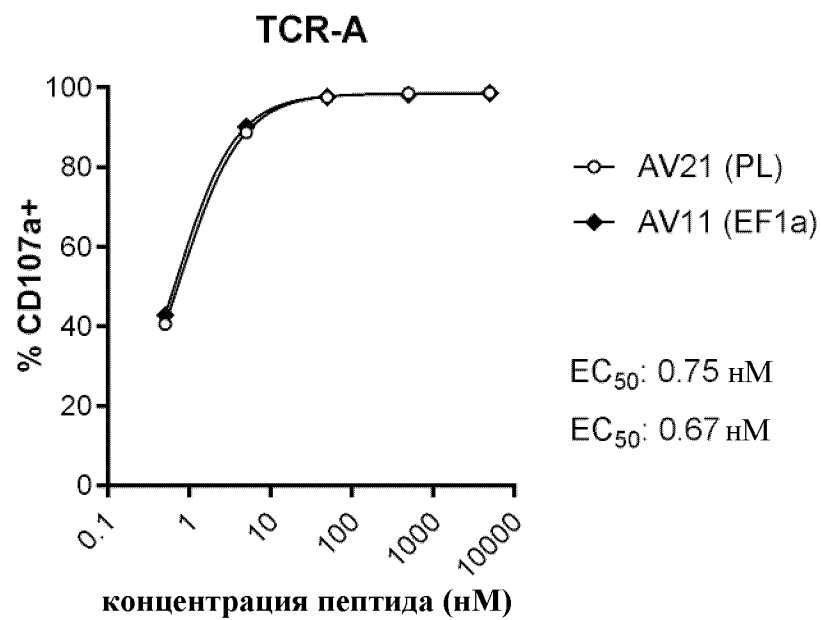
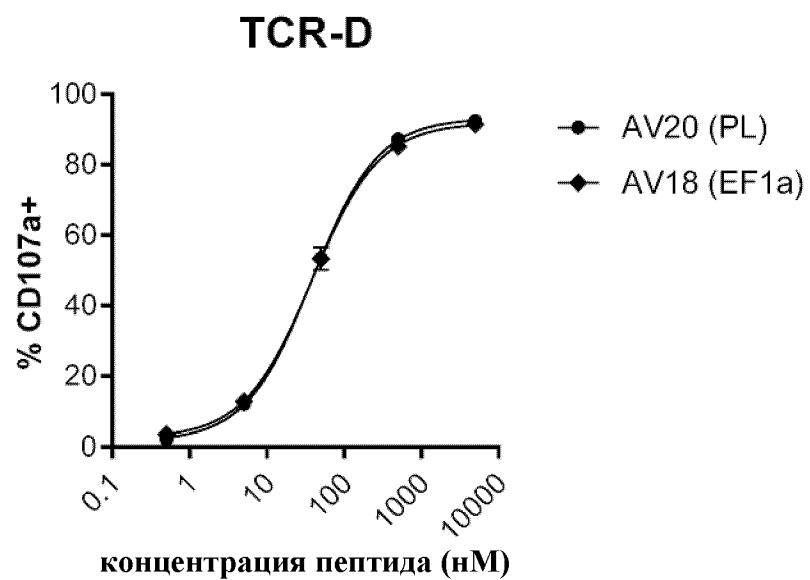
ФИГ. 17А

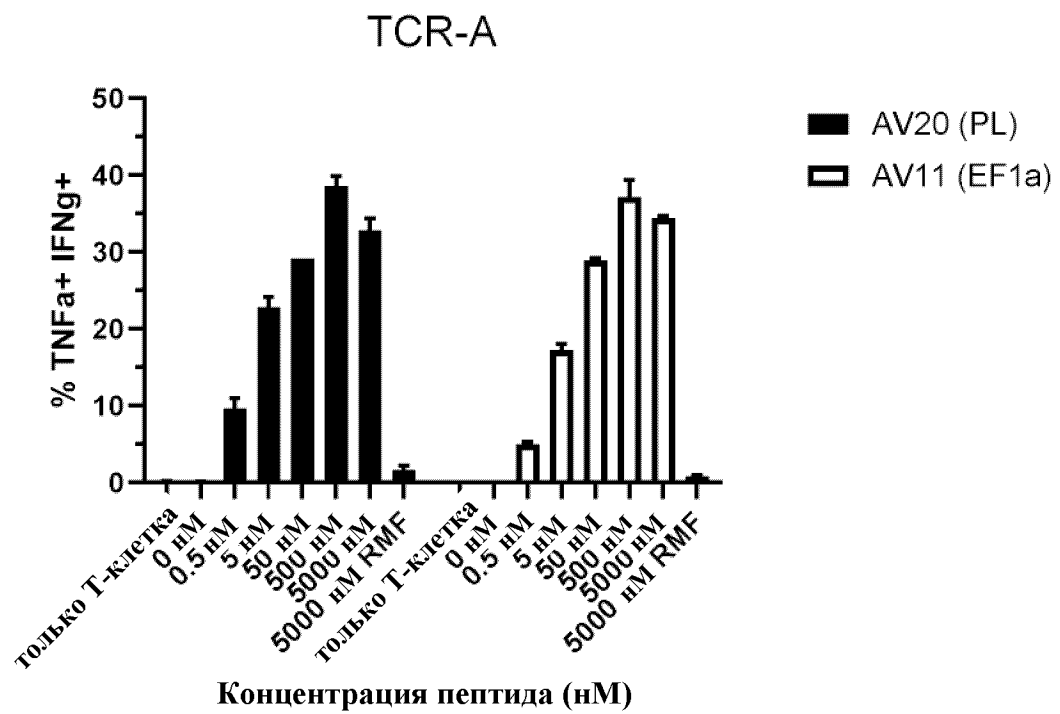


ФИГ. 17В

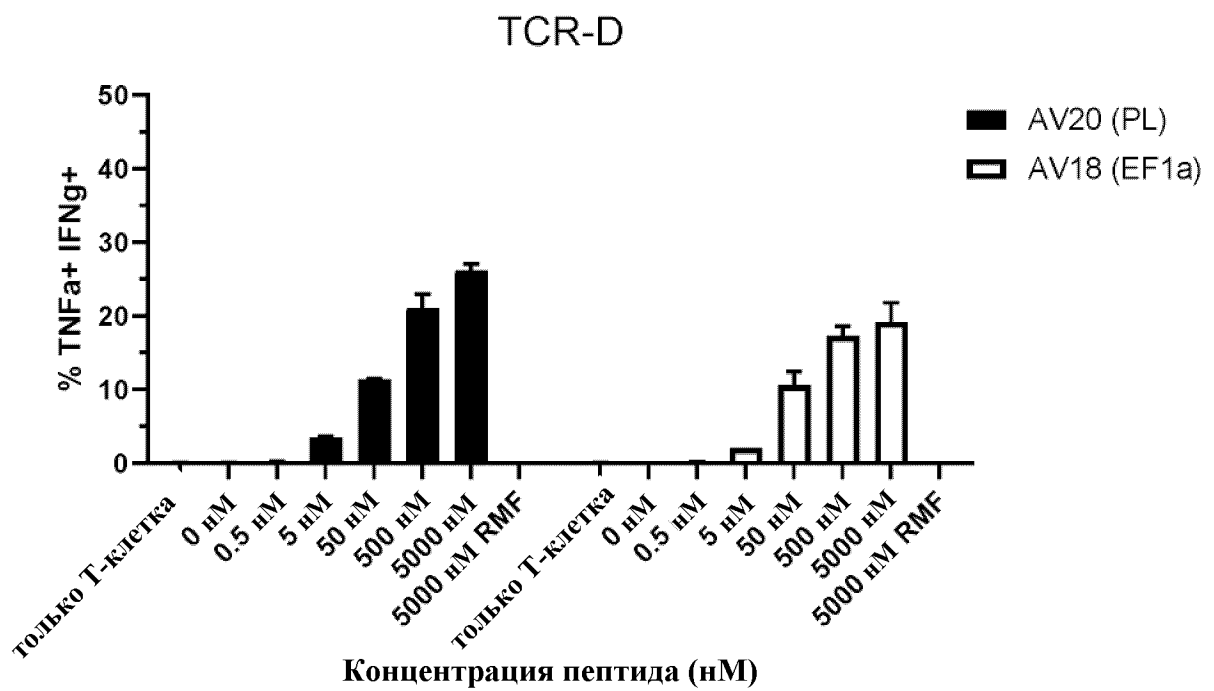


ФИГ. 17С

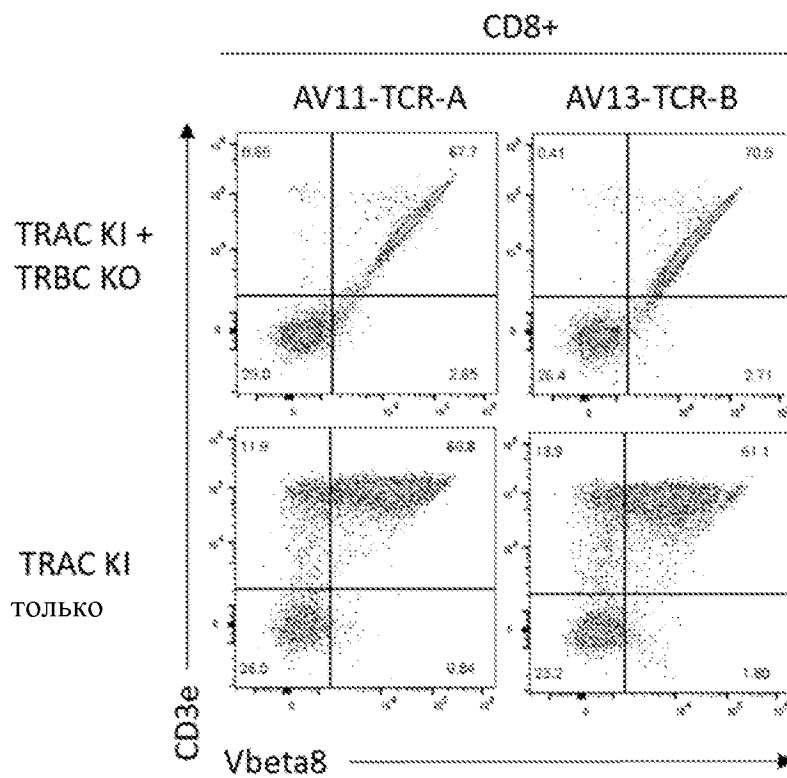
**ФИГ. 18А****ФИГ. 18В**



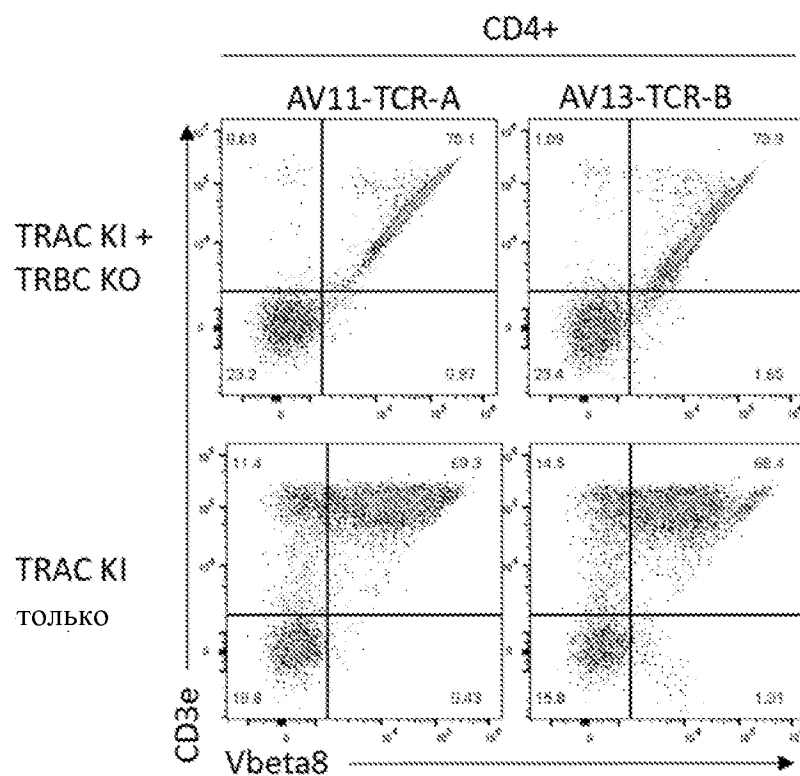
ФИГ. 19А



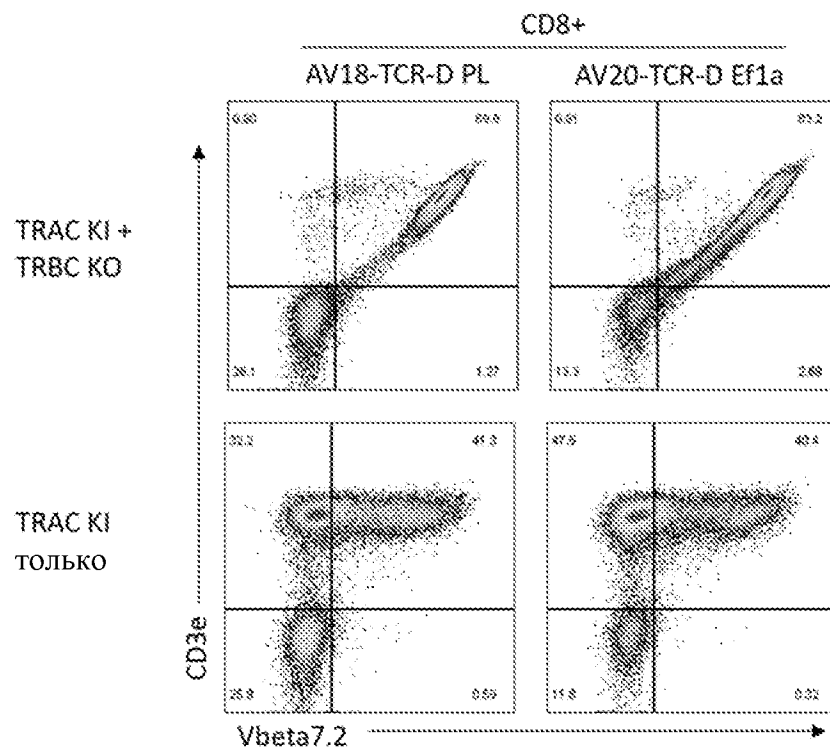
ФИГ. 19В



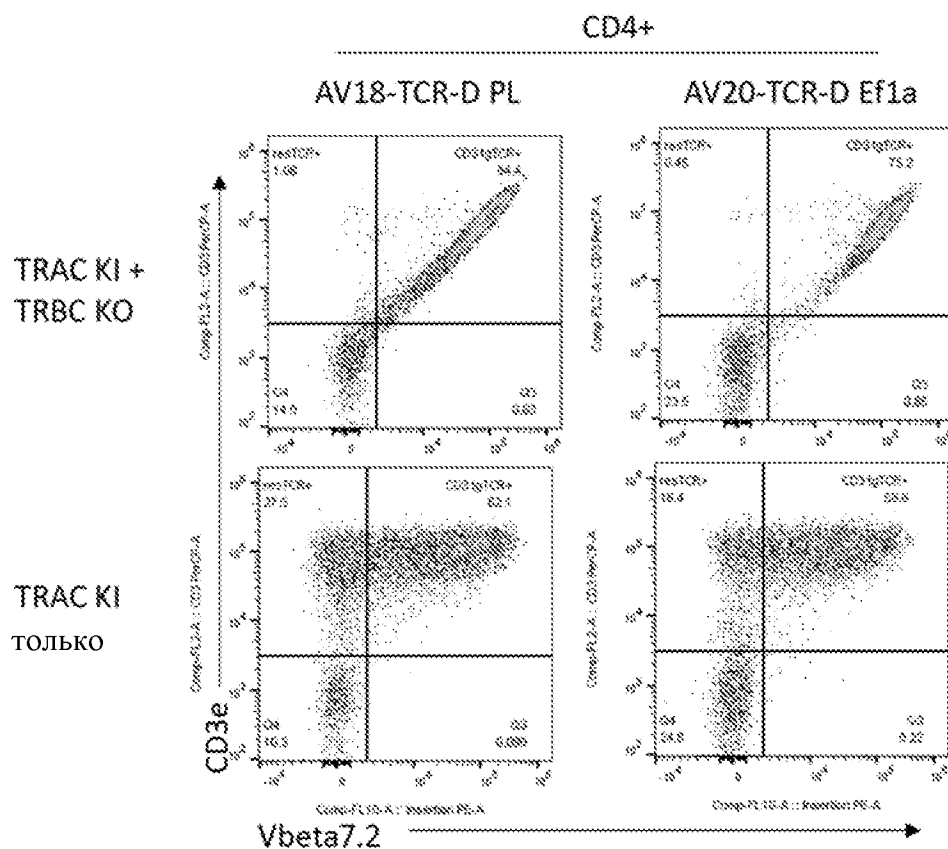
ФИГ. 20А



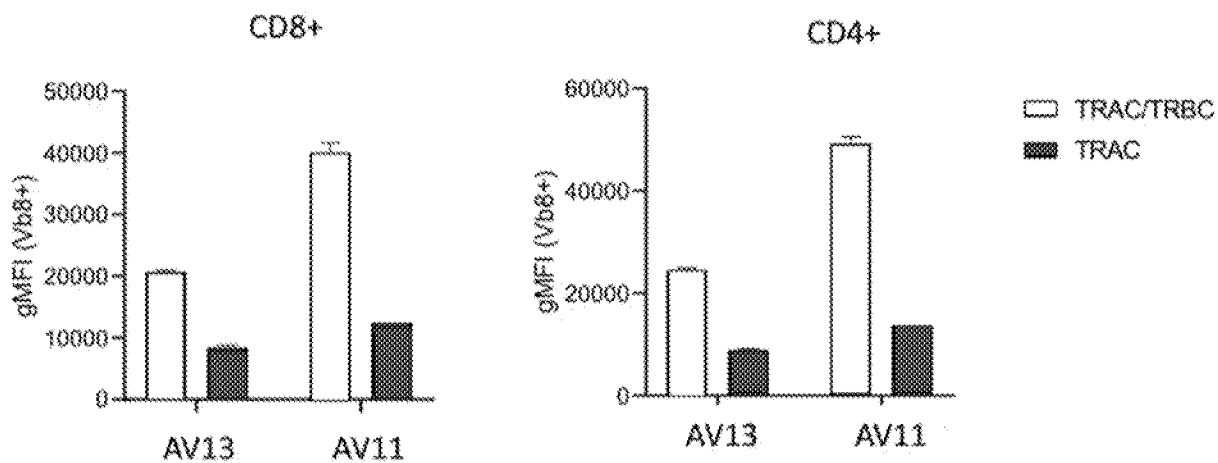
ФИГ. 20В



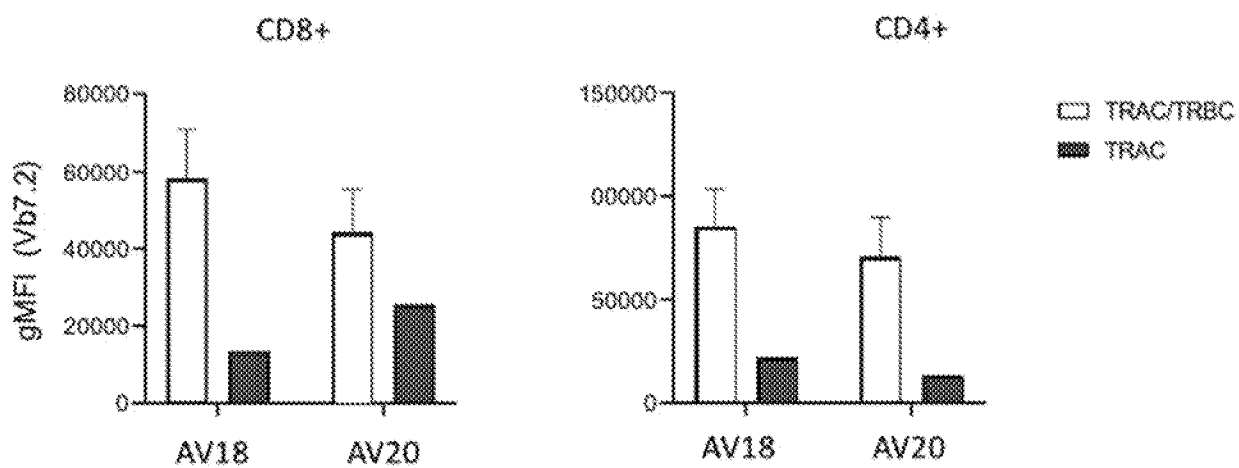
ФИГ. 21А



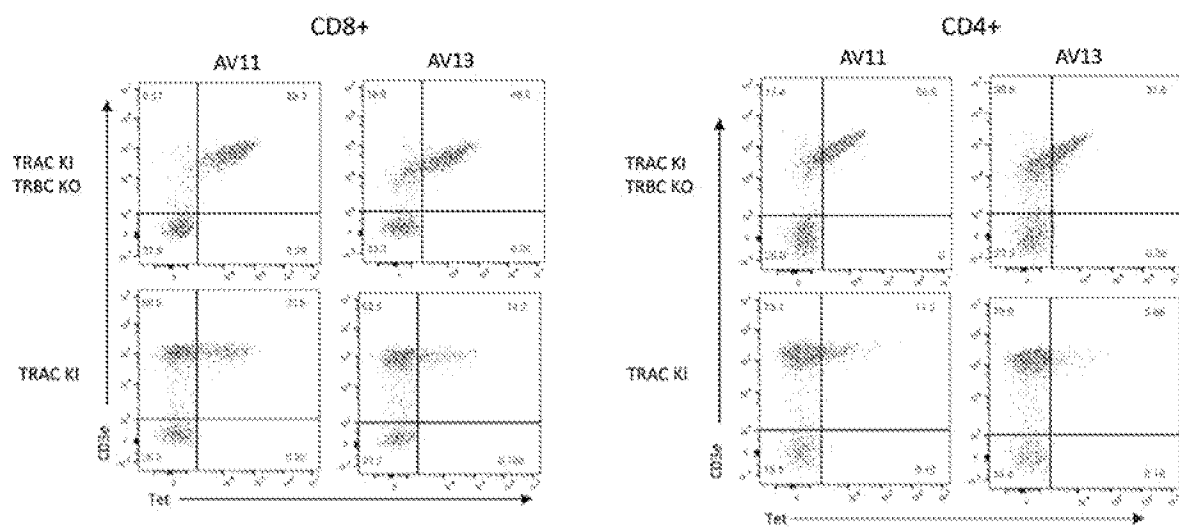
ФИГ. 21В



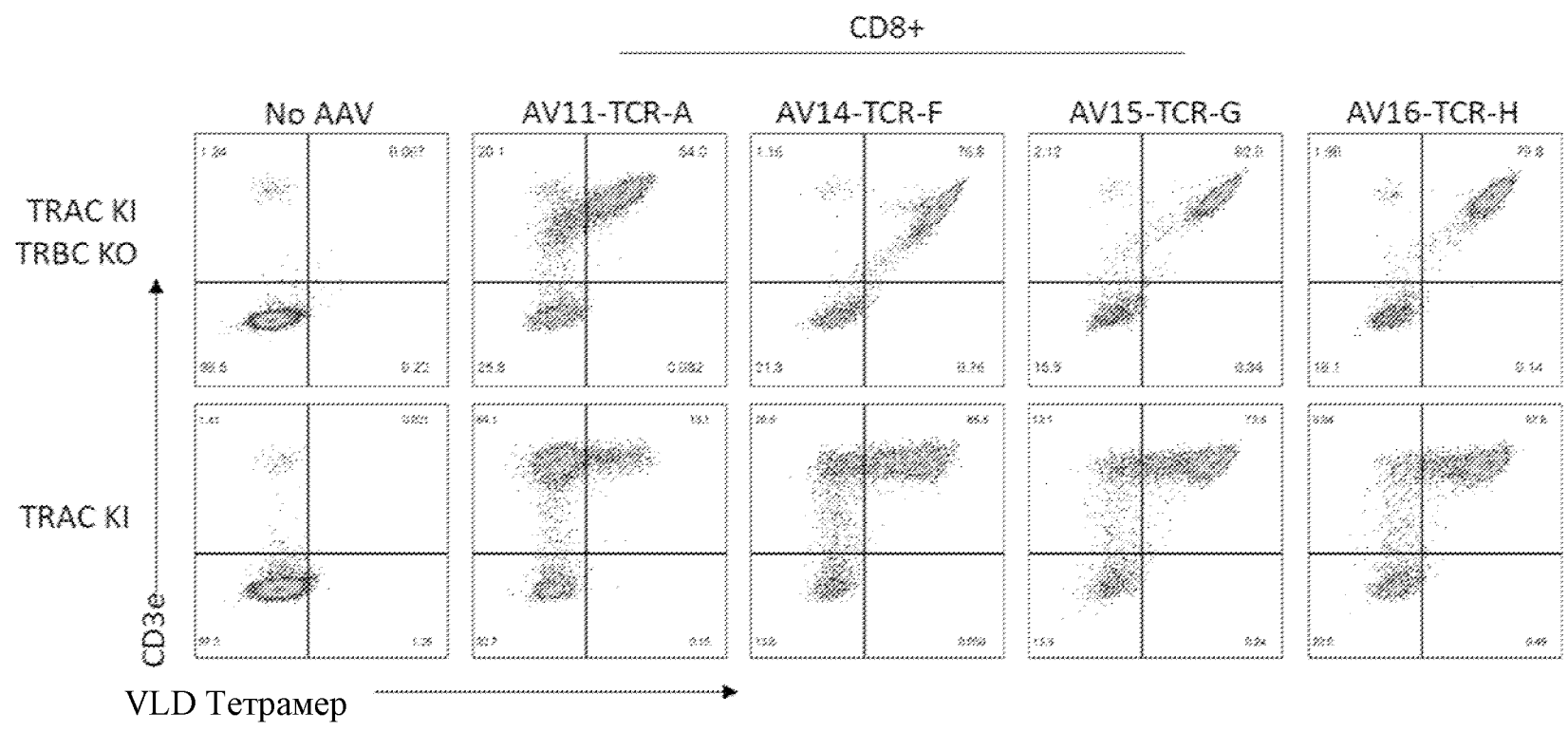
ФИГ. 21С



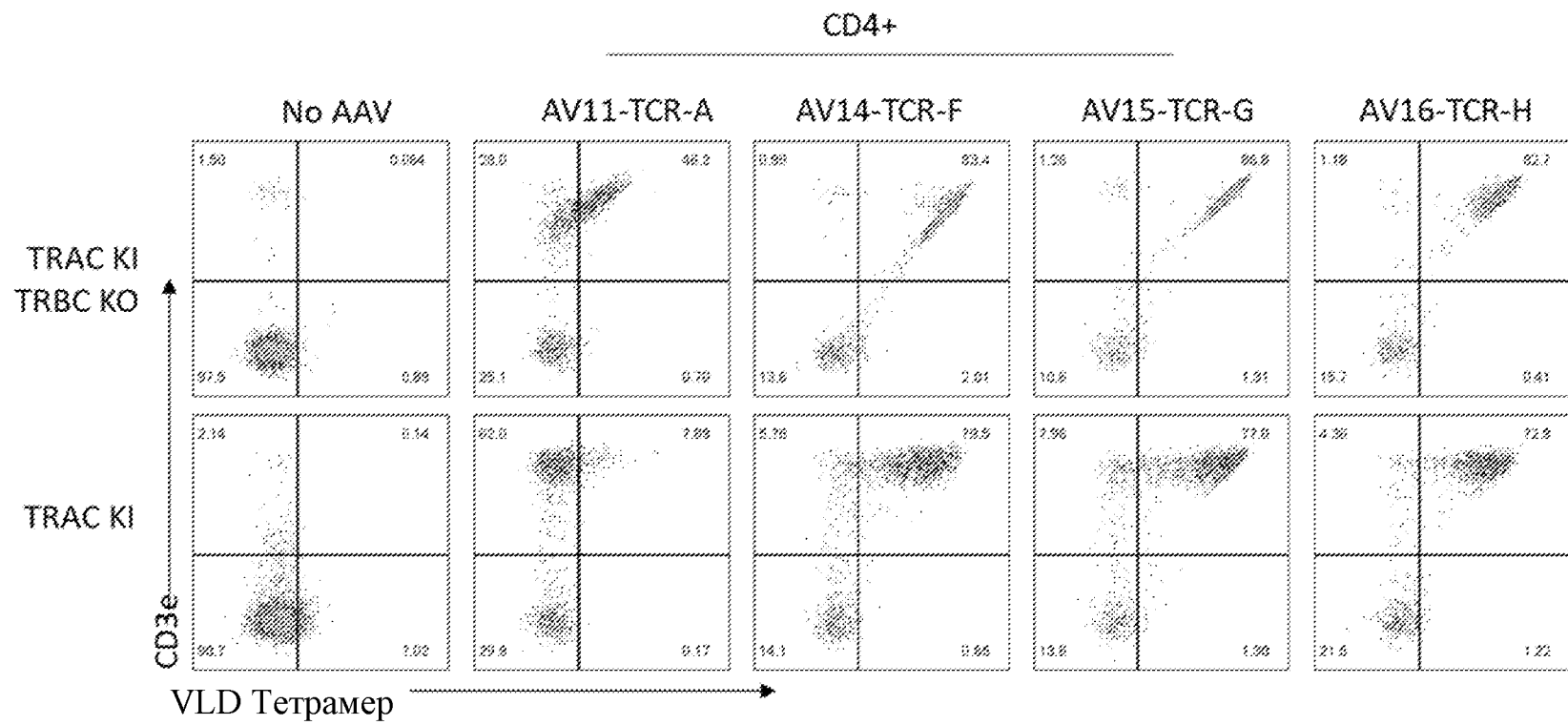
ФИГ. 21D



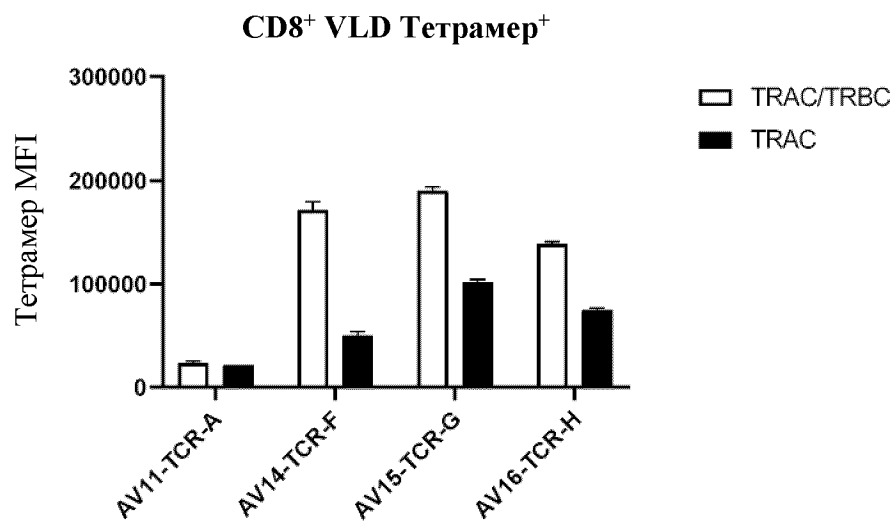
ФИГ. 22



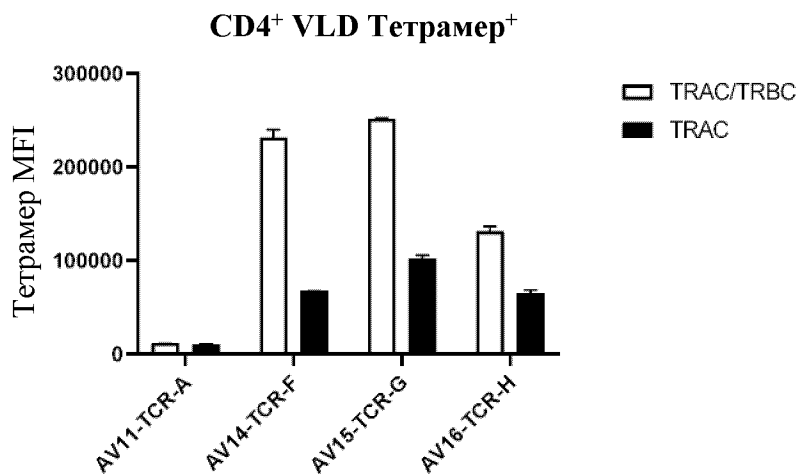
ФИГ. 23



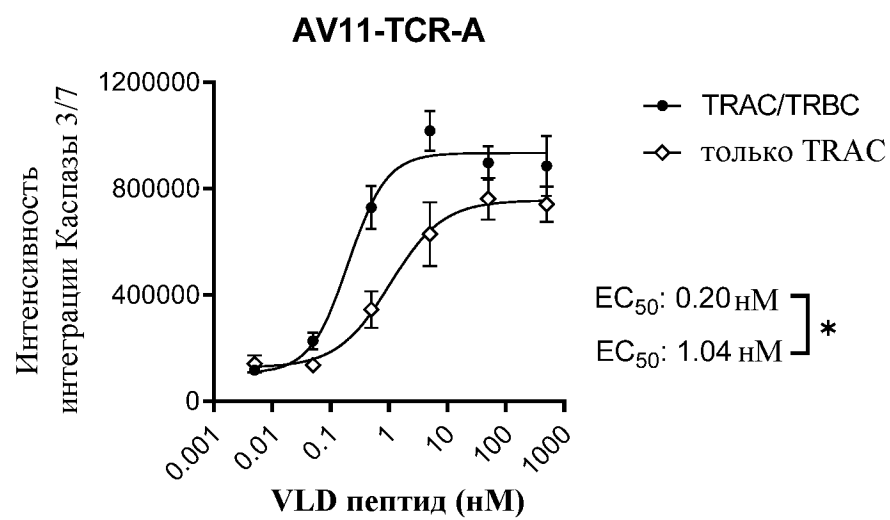
ФИГ. 24



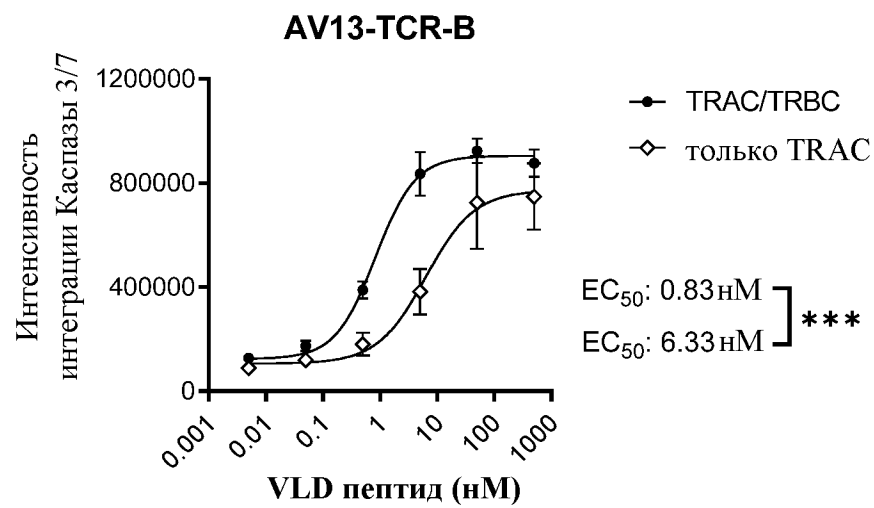
ФИГ. 25



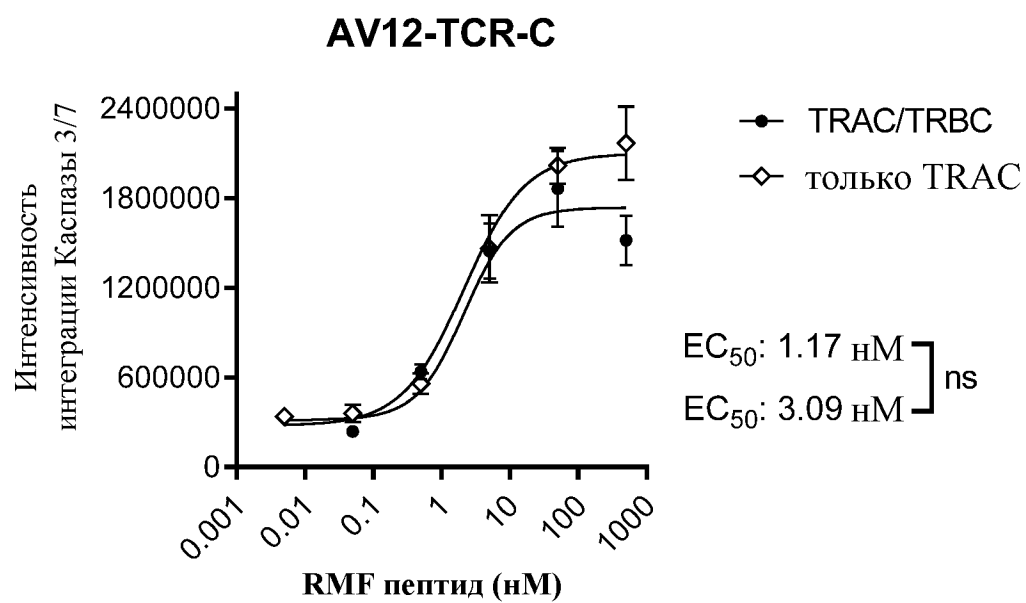
ФИГ. 26

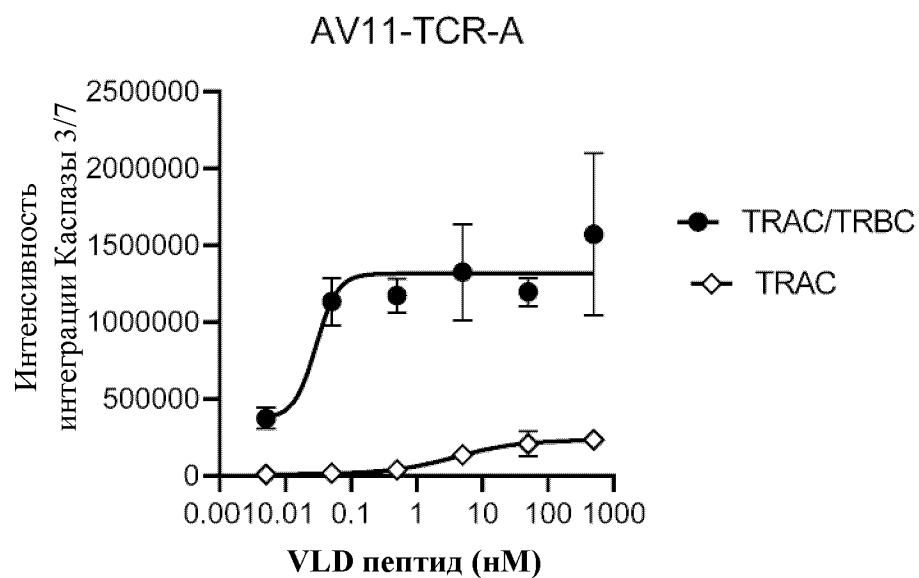


ФИГ. 27А

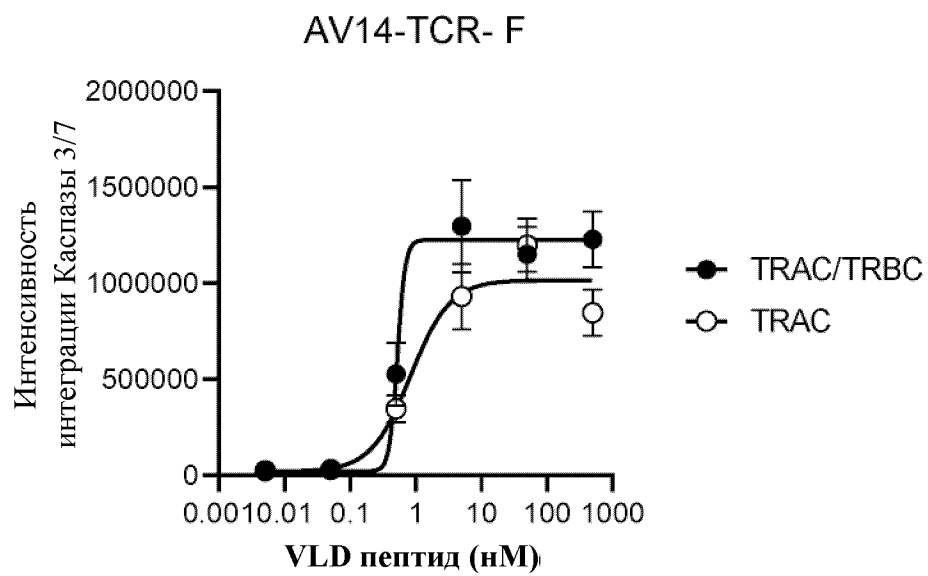


ФИГ. 27В

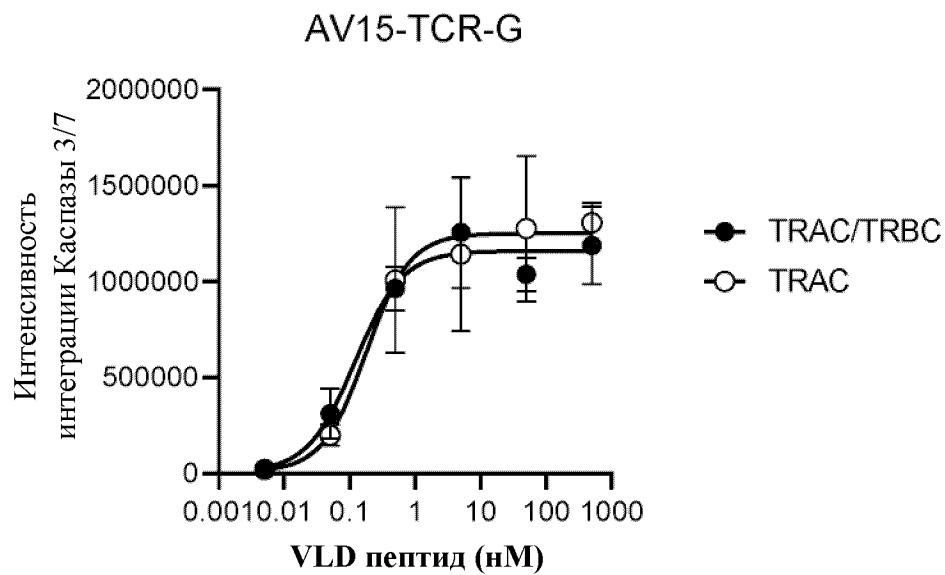
**ФИГ. 27С**



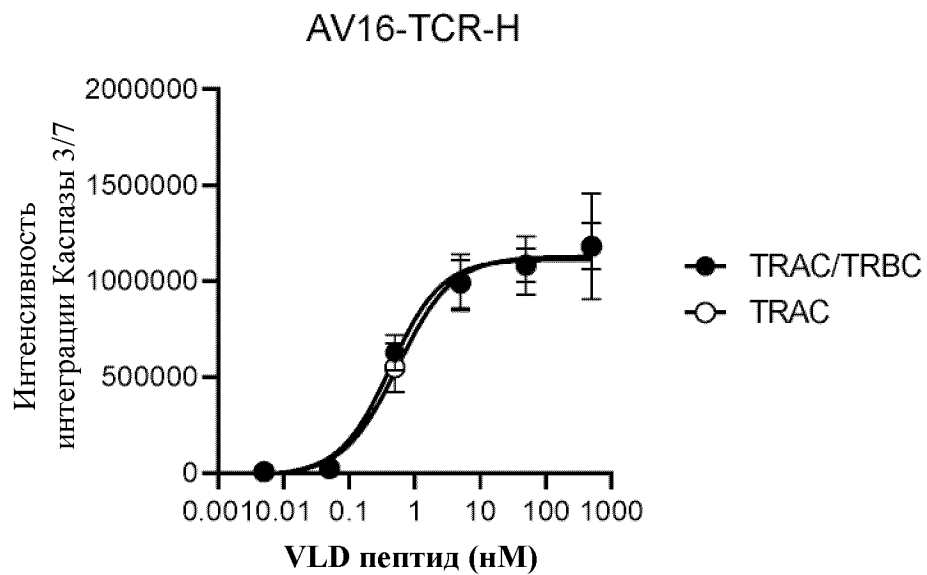
ФИГ. 28А



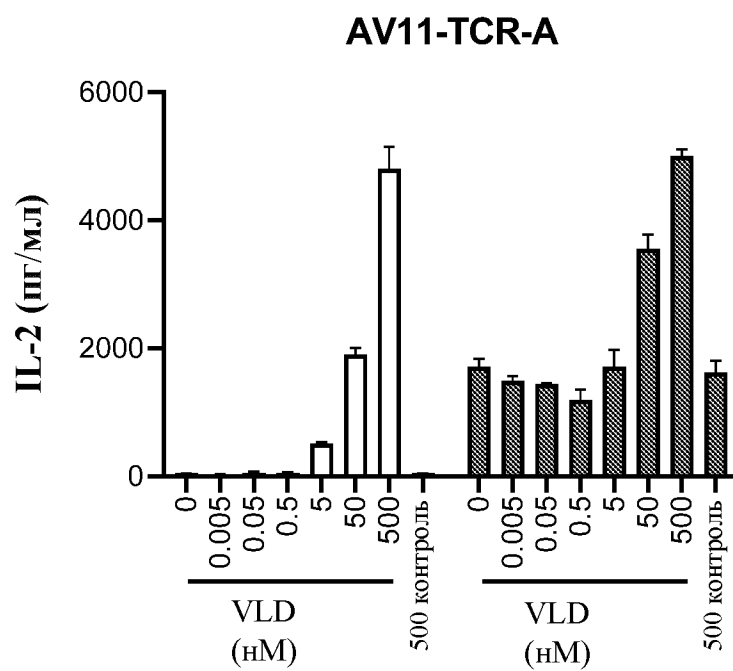
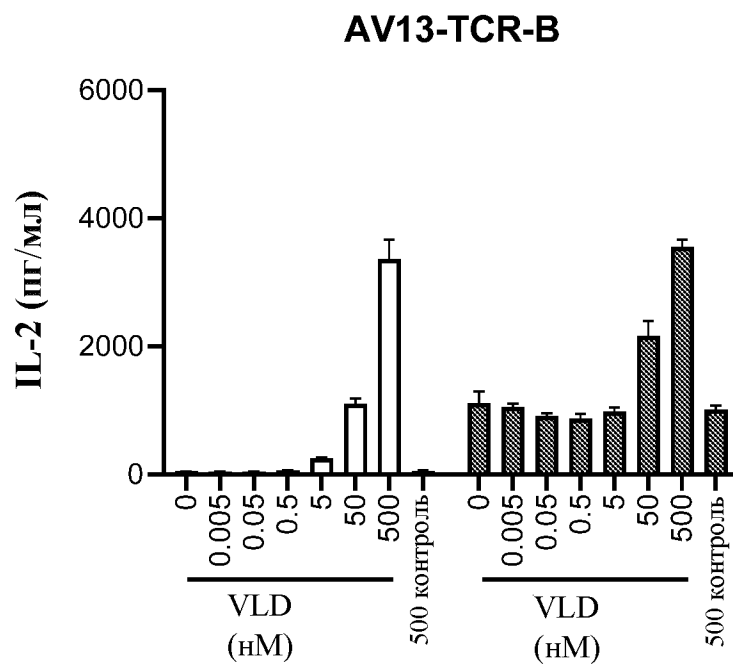
ФИГ. 28В

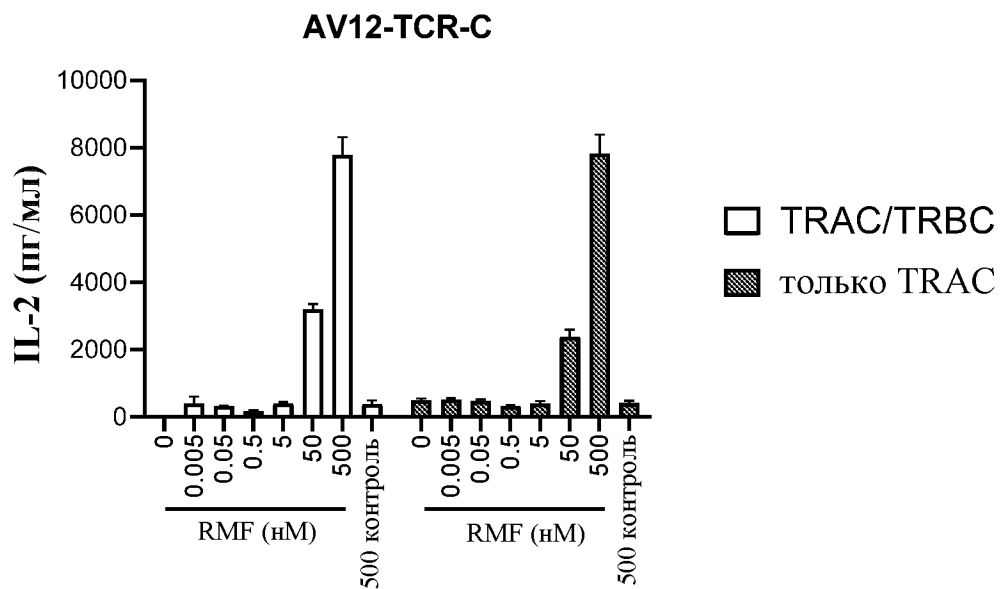


ФИГ. 28С

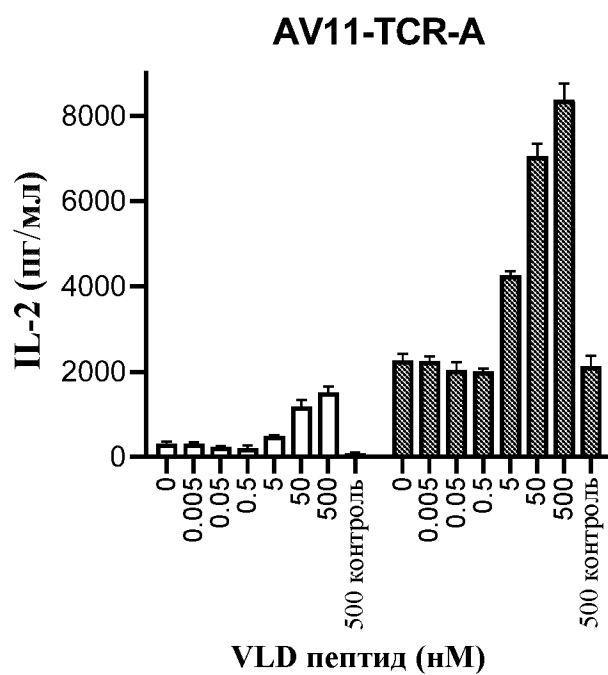


ФИГ. 28D

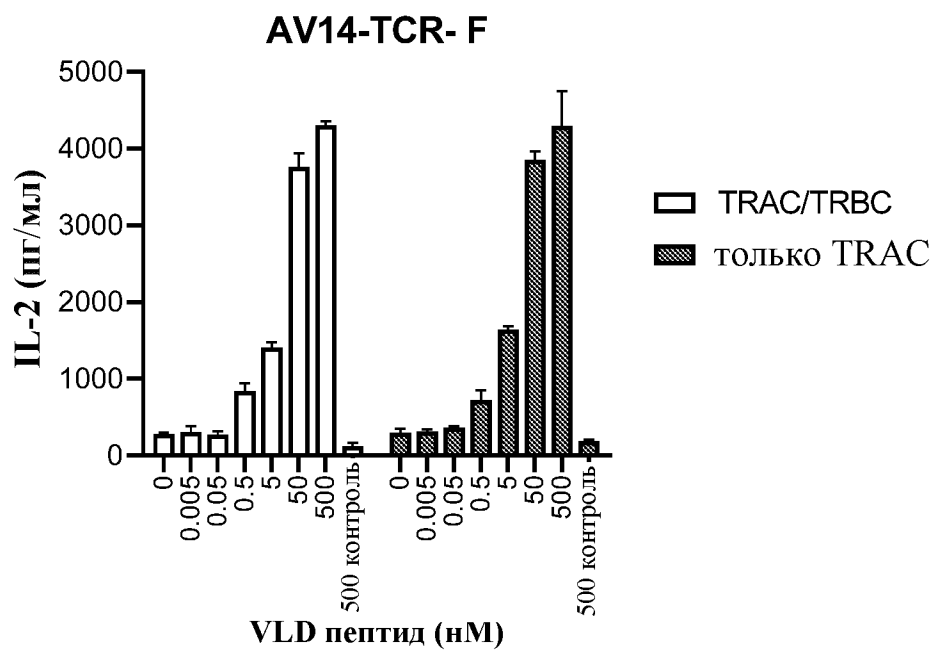
**ФИГ. 29А****ФИГ. 29В**



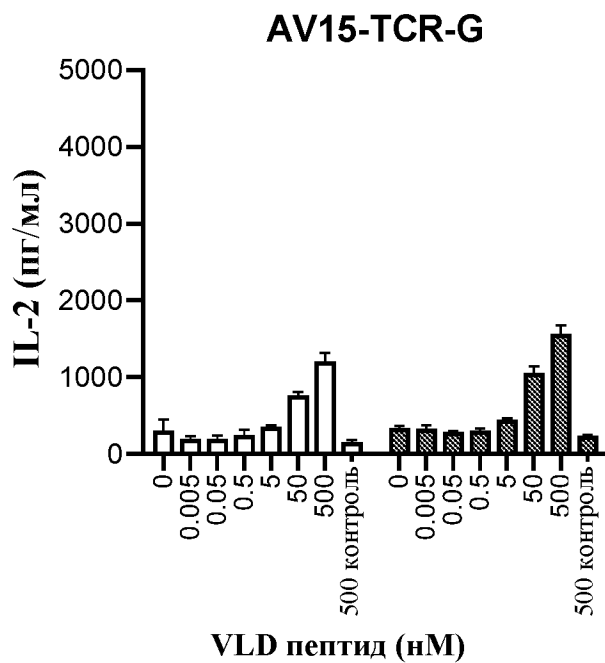
ФИГ. 29С



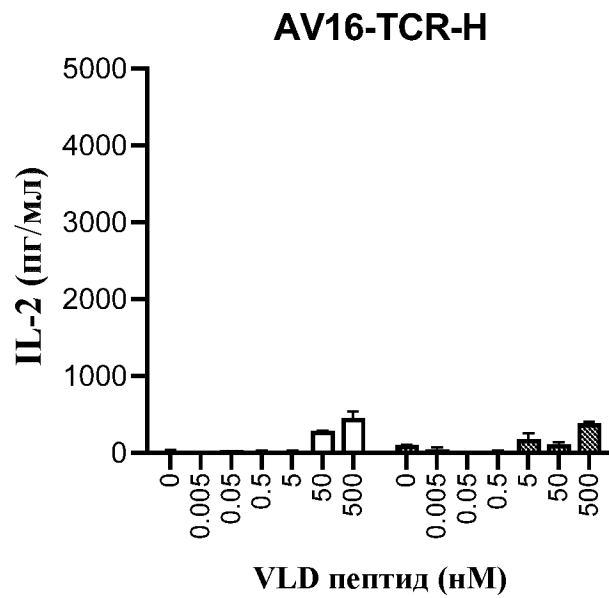
ФИГ. 29D

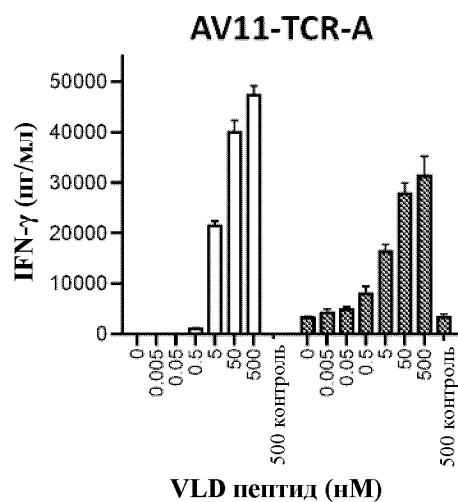


ФИГ. 29Е

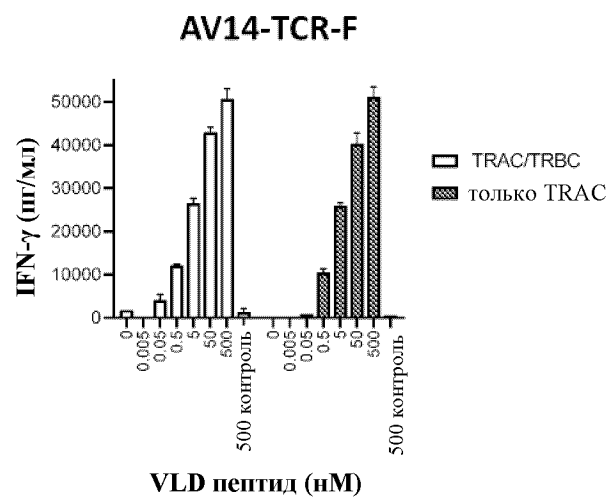


ФИГ. 29F

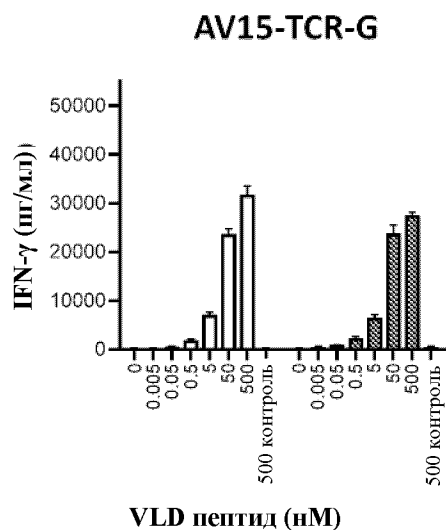
**ФИГ. 29G**



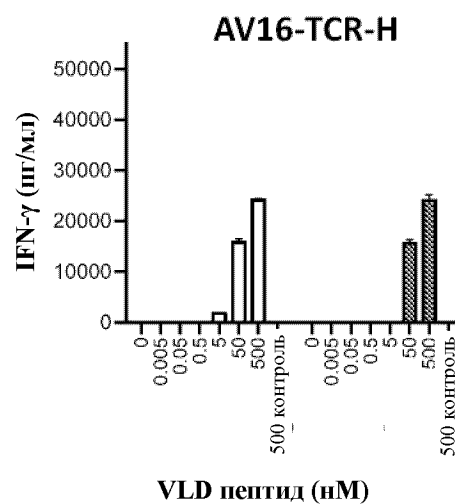
ФИГ. 30А



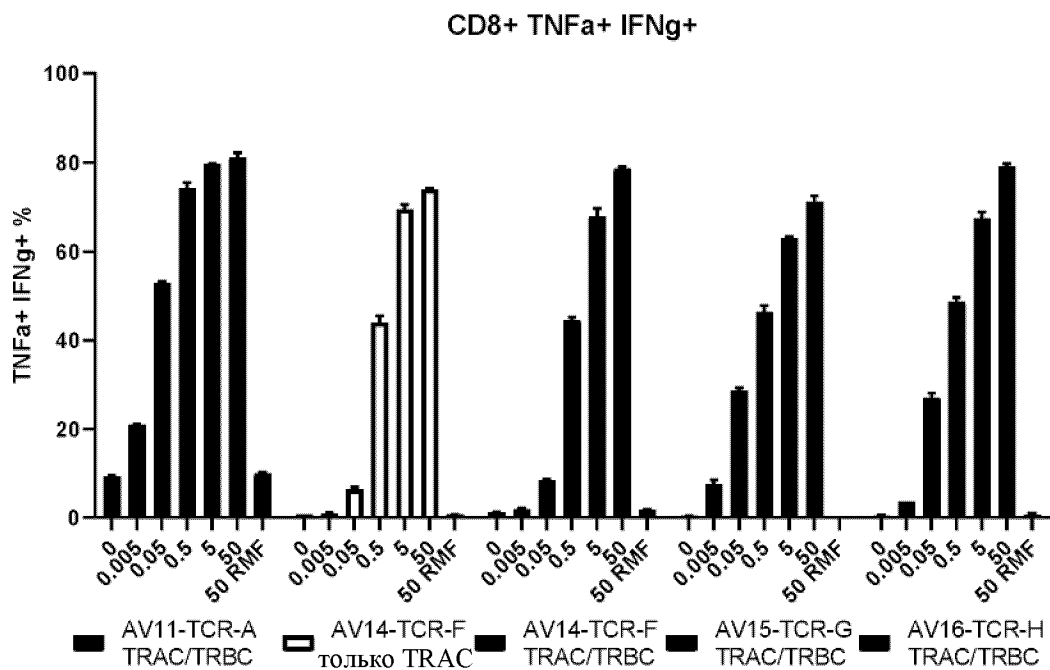
ФИГ. 30В



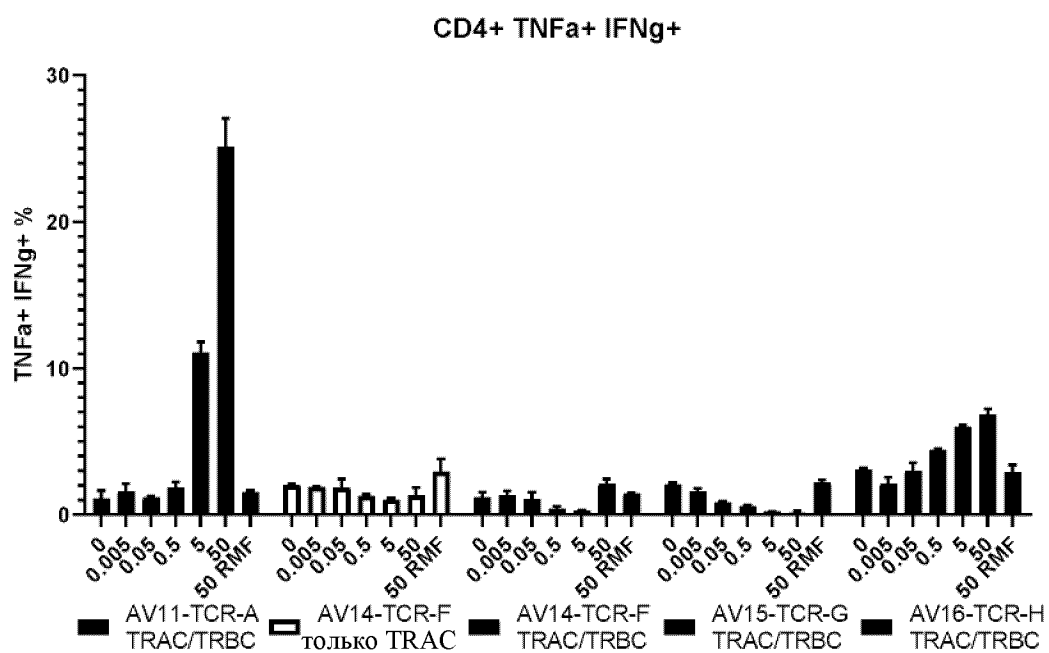
ФИГ. 30С



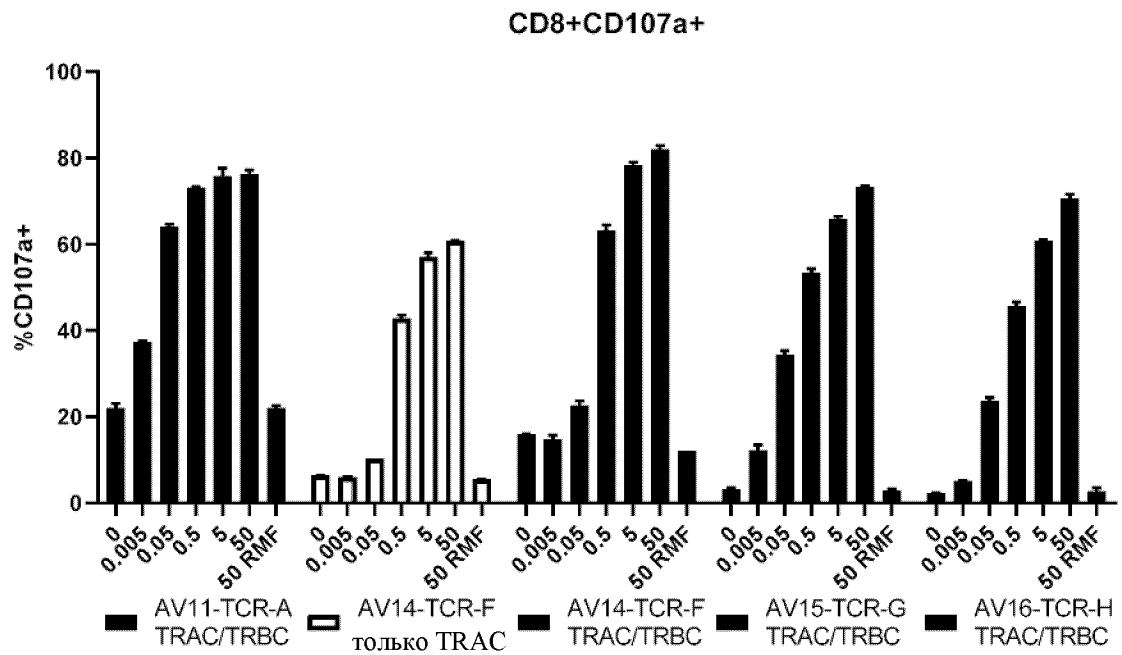
ФИГ. 30D



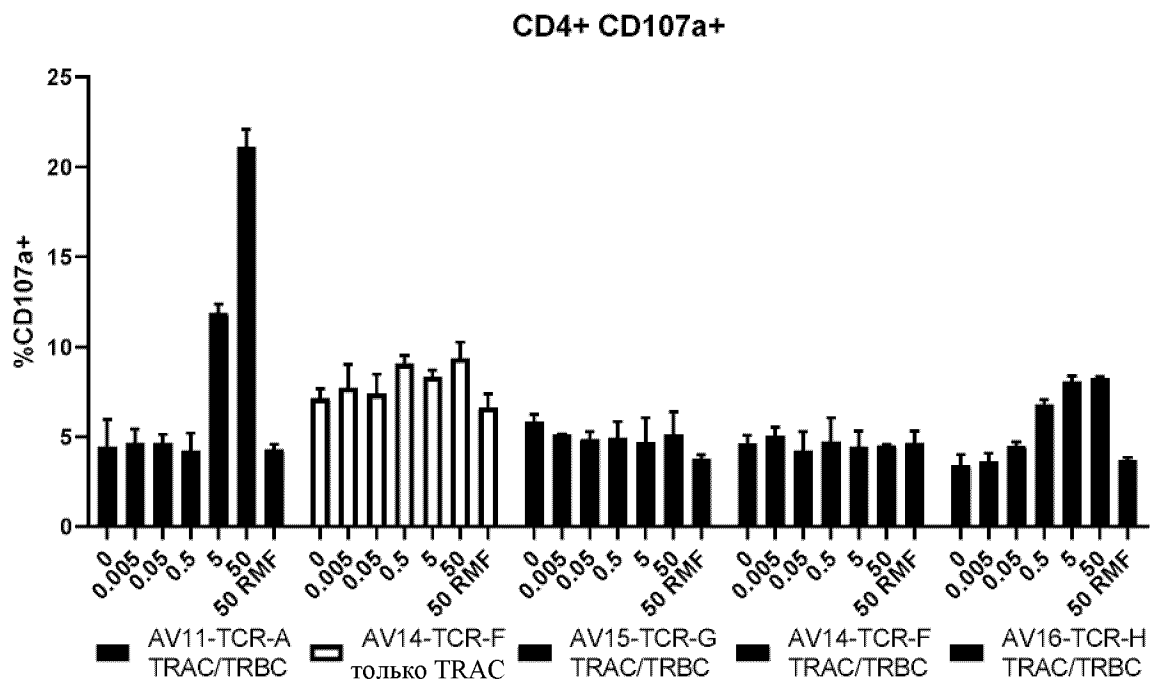
ФИГ. 31А



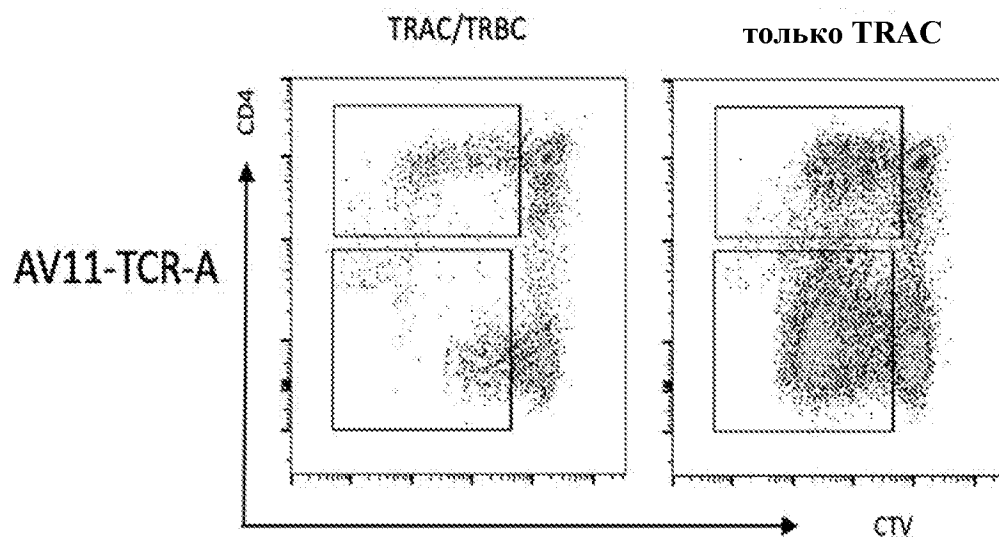
ФИГ. 31В



ФИГ. 32А

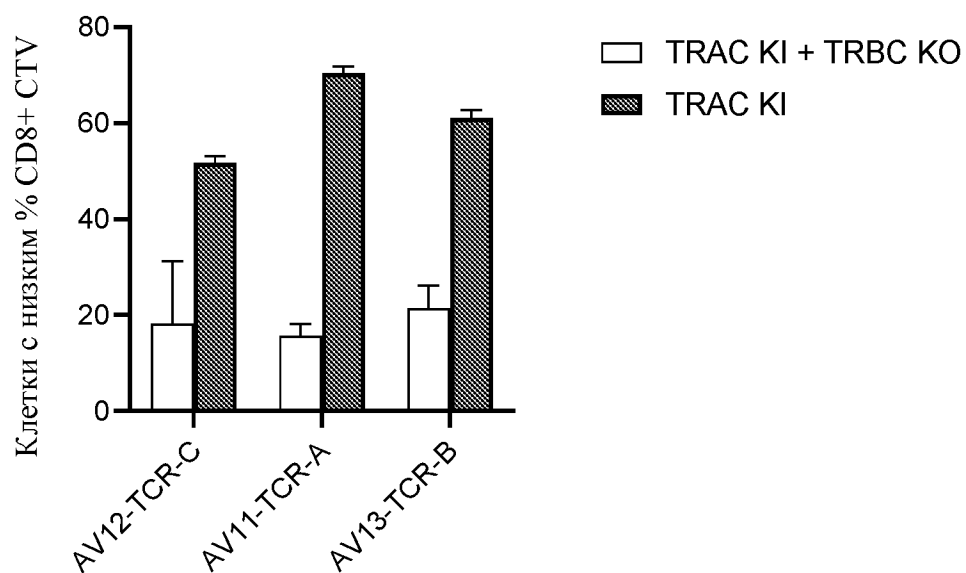


ФИГ. 32В

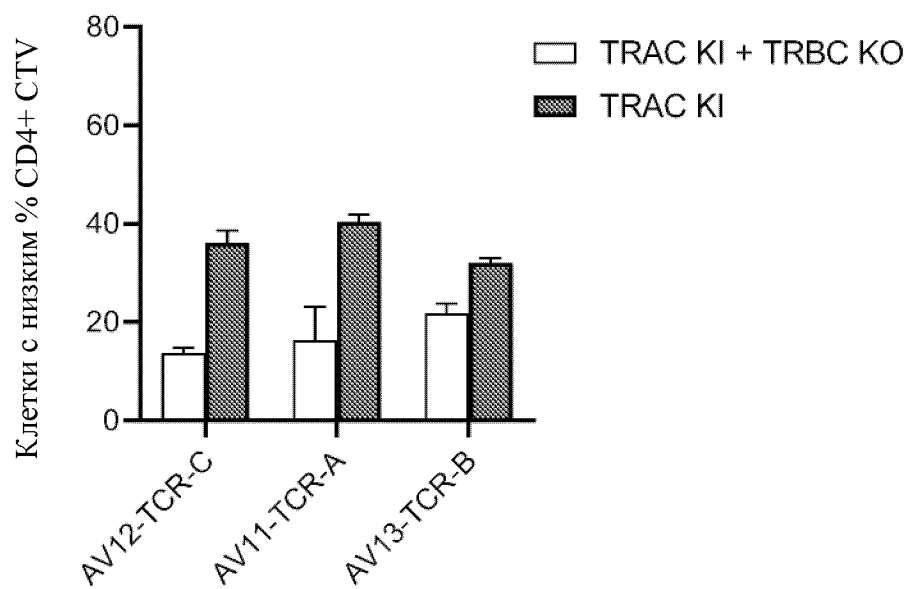


ФИГ. 33А

ФИГ. 33В



ФИГ. 33С



ФИГ. 33D