(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192963 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.18

(22) Дата подачи заявки
2020.04.30

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(54) КЛЕТКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЙ РЕЦЕПТОР ИЗ МОДИФИЦИРОВАННОГО ЛОКУСА TGFBR2, РОДСТВЕННЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ И СПОСОБЫ

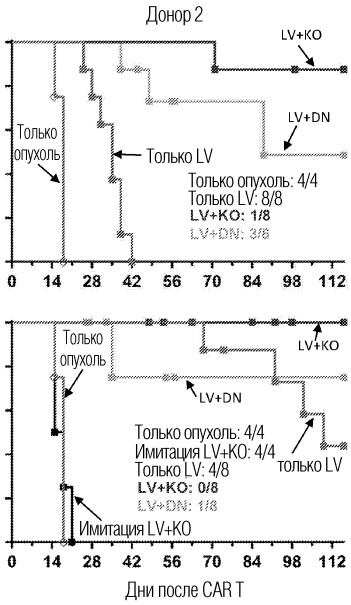
(31) **62/841,575**
(32) **2019.05.01**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/030815**
(87) **WO 2020/223535 2020.11.05**

(71) Заявитель:
ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.; ЭДИТАС МЕДИСИН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Берли Стефен Майкл, Клейра Седрик, Чин Мелисса, Харбински Фред, Най Кристофер Хит, Сейзер Блайт Д., Вонг Квини, Уэлстед Дж. Грант, Уилсон Кристофер (US)

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

(57) В изобретении представлены сконструированные иммунные клетки, например Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, которые содержат модифицированный локус рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (TGFBR2), кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых аспектах клетки сконструированы путем таргетной интеграции трансгенной последовательности, кодирующей рекомбинантный рецептор или его часть, в геномный локус TGFBR2. Также представлены клеточные композиции, содержащие сконструированные иммунные клетки, нуклеиновые кислоты для сконструированных клеток, а также способы, наборы и готовые изделия для получения сконструированных клеток, например, путем таргетирования трансгенной последовательности, кодирующей рекомбинантный рецептор или его часть, для интеграции в область геномного локуса TGFBR2. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, например Т-клетки, можно использовать в связи с клеточной терапией, в том числе в связи с иммунотерапией рака, включающей адоптивный перенос сконструированных клеток.



202192963 A1

202192963 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571363EA/019

КЛЕТКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЙ РЕЦЕПТОР ИЗ МОДИФИЦИРОВАННОГО ЛОКУСА *TGFBR2*, АРОДСТВЕННЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ И СПОСОБЫ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/841,575, поданной 1 мая 2019 г., озаглавленной «CELLS EXPRESSING A RECOMBINANT RECEPTOR FROM A MODIFIED *TGFBR2* LOCUS, RELATED POLYNUCLEOTIDES AND METHODS», содержание которой полностью включено посредством ссылки.

Включение списка последовательностей посредством ссылки

Настоящая заявка подается вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен в виде файла под названием 735042012840SeqList.txt, созданного 28 апреля 2020 г. и имеющего размер 200 килобайт. Информация в электронном формате Перечня последовательносттаблицаей полностью включена посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к сконструированным иммунным клеткам, например Т-клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор, которые содержат модифицированный локус рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2)*, кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых аспектах, клетки сконструированы путем таргетной интеграции последовательности трансгена, кодирующей рекомбинантный рецептор или его часть, в геномный локус *TGFBR2.* Также описаны клеточные композиции, содержащие сконструированные иммунные клетки, нуклеиновые кислоты для конструирования клеток, а также способы, наборы и готовые изделия для получения сконструированных клеток, например, путем таргетирования последовательности трансгена, кодирующей рекомбинантный рецептор или его часть, для интеграции в область геномного локуса *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, например Т-клетки, можно использовать в связи с клеточной терапией, в том числе в связи с иммунотерапией рака, включающей адоптивный перенос сконструированных клеток.

Уровень техники

Адоптивные клеточные терапии, в которых используют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), для распознавания антигенов, ассоциированных с заболеванием, представляют собой привлекательный терапевтический метод лечения рака и других заболеваний. Необходимы улучшенные стратегии для конструирования Т-клеток для экспрессии рекомбинантных рецепторов, например, для использования в адоптивной иммунотерапии, например, при лечении рака, инфекционных заболеваний и аутоиммунных заболеваний. Представлены способы, клетки,

композиции и наборы для использования в способах, отвечающие таким потребностям.

Сущность изобретения

В настоящем документе представлены генно-инженерные Т-клетки и композиции, способы, применения, наборы и готовые изделия, относящиеся к генетически сконструированным Т-клеткам. В некоторых из представленных вариантов осуществления, генетически сконструированная Т-клетка содержит модифицированный локус рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2)*. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* содержит трансгенная последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть.

В настоящем документе представлены генетически сконструированные Т-клетки, которые содержат модифицированный локус рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2)*, указанный модифицированный локус *TGFBR2* содержит трансгенная последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность интегрирована в эндогенный локус *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, интеграция осуществляется посредством репарации, направляемой гомологией (HDR).

В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует функциональный полипептид TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полипептид TGFBRII или экспрессия полипептида TGFBRII элиминирована. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полноразмерный полипептид TGFBRII или кодирует частичный полипептид TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* кодирует доминантно-негативный полипептид TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, кодируемый полипептид TGFBRII содержит аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60. В некоторых из любых вариантов осуществления, кодируемый полипептид TGFBRII содержит последовательность, которая имеет не менее 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60 или их фрагменту. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность находится внутри рамки с одним или несколькими экзонами открытой рамки считывания или ее частичной последовательностью эндогенного локуса *TGFBR2.*

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность расположена ниже экзона 1 и выше экзона 6 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность находится ниже экзона 4 и выше экзона 6 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2.*

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор является или содержит рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах

осуществления, рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, и трансгенная последовательность кодирует цепь TCR альфа (TCRα), цепь TCR бета (TCRβ) или обе. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является функциональный антигенный рецептор, не относящийся к Т-клеточному рецептору (не TCR). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор содержит функциональный антигенный рецептор, не относящийся к Т-клеточному рецептору (не TCR). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит внеклеточную область, трансмембранный домен и внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область содержит связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, связывающим доменом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован с, специфичен к или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном-мишенью является опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень выбран из αvβ6 интегрина (avb6 интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22Rα), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13Rα2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10,

мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана A (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемого антигена, или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область содержит спейсер. В некоторых вариантах осуществления, спейсер функционально связан между связывающим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит шарнирную область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит область C_H2 и область C_H3. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточной область содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточным сигнальным доменом является внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, такой как цепь CD3-дзета (CD3ζ), или его сигнальная часть. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, такой как цепь CD3-дзета (CD3ζ), или его сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточные сигнальные домены CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* кодирует рекомбинантный рецептор, который содержит, от своего N-конца к C-концу, в следующем порядке: внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область.

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих внеклеточный связывающий домен; спейсер; и трансмембранный домен; костимулирующий сигнальный домен; и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* содержит по порядку: последовательность

нуклеотидов, кодирующую внеклеточный связывающий домен; спейсер; и трансмембранный домен; костимулирующий сигнальный домен; и внутриклеточную сигнальную область.

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую внеклеточный связывающий домен, то есть scFv; спейсер, который содержит последовательность шарнира иммуноглобулина человека, который является IgG1, IgG2 или IgG4 или их модифицированным вариантом, который дополнительно содержит область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, происходящий из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, происходящий из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, которой является цепь CD3ζ или ее часть. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* содержит по порядку: последовательность нуклеотидов, кодирующую внеклеточный связывающий домен, то есть scFv; спейсер, который содержит последовательность из шарнира иммуноглобулина человека, то есть из IgG1, IgG2 или IgG4, или их модифицированной версии, которая дополнительно содержит C_H2 область и/или C_H3 область; и трансмембранный домен, происходящий из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, происходящий из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, которой является цепь CD3ζ или ее часть.

В некоторых вариантах осуществления, CAR является мультицепочечный CAR. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую, по меньшей мере, еще один белок.

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность содержит один или несколько мультицистронных элементов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько мультицистронных элементов расположены между последовательностью нуклеотидов, кодирующих CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей, по меньшей мере, один дополнительный белок. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один дополнительный белок является суррогатным маркером. В некоторых вариантах осуществления, суррогатным маркером является усеченный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, усеченный рецептор лишен внутриклеточного сигнального домена и не способен опосредовать внутриклеточную передачу сигналов при связывании своим лигандом. В некоторых вариантах осуществления, усеченный рецептор лишен внутриклеточного сигнального домена или не способен опосредовать внутриклеточную передачу сигналов при связывании своим лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, и мультицистронный элемент расположен между последовательностью нуклеотидов, кодирующей TCRα, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей TCRβ.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является мультицепочечный CAR, и мультицистронный элемент расположен между

последовательностью нуклеотидов, кодирующей одну цепь мультицепочечного CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей другую цепь мультицепочечного CAR.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько мультицистронных элементов расположены выше последовательности нуклеотидов, кодирующей рекомбинантный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько мультицистронных элементов являются или содержат последовательность проскока рибосомы. В некоторых вариантах осуществления, последовательностью проскока рибосомы является элемент T2A, P2A, E2A или F2A.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* содержит промотор и регуляторный или контрольный элемент эндогенного локуса *TGFBR2,* функционально связанный с контролем экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* содержит промотор, регуляторный или контрольный элемент эндогенного локуса *TGFBR2,* функционально связанный с контролем экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус содержит один или несколько гетерологичных регуляторных или контрольных элементов, функционально связанных с контролем экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько гетерологичных регуляторных или контрольных элементов содержат гетерологичный промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусную последовательность Козака, последовательность акцептора сплайсинга или последовательность донора сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный промотор является или содержит промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α), или промотор MND, или его вариант.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клеткой является первичная Т-клетка, полученная от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеткой является CD8+ Т-клетка или ее подтипы. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеткой является CD4+ Т-клетка или ее подтипы. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка получена из мультипотентной или плюрипотентной клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка получена из мультипотентной или плюрипотентной клетки, которой является iPSC.

В настоящем документе представлены полинуклеотиды, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть; и одно или несколько плеч гомологии, связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько плеч гомологии содержат последовательность, гомологичную одной или нескольким областям открытой рамки считывания локуса рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2)*. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор

или его часть кодирован модифицированным локусом *TGFBR2,* содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, когда рекомбинантный рецептор экспрессируется из клетки, введенной с полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, последовательностью нуклеиновой кислоты является последовательность, которая является экзогенной или гетерологичной по отношению к открытой рамке считывания эндогенного геномного локуса *TGFBR2* Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, последовательностью нуклеиновой кислоты является последовательность, которая является экзогенной или гетерологичной по отношению к открытой рамке считывания эндогенного геномного локуса *TGFBR2* Т-клетки, которая является Т-клеткой человека.

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько плеч гомологии содержат, по меньшей мере, один интрон или, по меньшей мере, один экзон открытой рамки считывания локуса *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует функциональный полипептид TGFBRII в клетке, введенной с полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полипептид TGFBRII, или экспрессия полипептида TGFBRII элиминирована в клетке, введенной с полинуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полноразмерный полипептид TGFBRII или кодирует частичный полипептид TGFBRII в клетке, введенной с полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* кодирует доминантно-негативный полипептид TGFBRII в клетке, введенной с полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, кодируемый полипептид TGFBRII в клетке, введенной с полинуклеотидом, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60, или последовательность, которая имеет идентичность последовательности, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с аминокислотной последовательностью, соответствующей остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60 или их фрагменту. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты находится внутри рамки с одним или несколькими экзонами открытой рамки считывания локуса *TGFBR2,* содержащегося в одном или нескольких плечах гомологии.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько областей открытой рамки считывания являются или содержат последовательности, расположенные ниже экзона 1 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько областей открытой рамки считывания являются или содержат последовательности, которые включают, по меньшей мере, часть экзона 4 или ниже экзона 4 открытой рамки считывания локуса *TGFBR2.*

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько плеч гомологии содержат 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит структуру [5' плечо гомологии]-[последовательность

нуклеиновой кислоты (a)]-[3' плечо гомологии]. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо содержат точно или от примерно 50 точно или до примерно 2000 нуклеотидов, точно или от примерно 100 точно или до примерно 1000 нуклеотидов, точно или от примерно 100 точно или до примерно 750 нуклеотидов, точно или от примерно 100 точно или до примерно 600 нуклеотидов, точно или от примерно 100 точно или до примерно 400 нуклеотидов, точно или от примерно 100 точно или до примерно 300 нуклеотидов, точно или от примерно 100 точно или до примерно 200 нуклеотидов, точно или от примерно 200 точно или до примерно 1000 нуклеотидов, точно или от примерно 200 точно или до примерно 750 нуклеотидов, точно или от примерно 200 точно или до примерно 600 нуклеотидов, точно или от примерно 200 точно или до примерно 400 нуклеотидов точно или от примерно 200 точно или до примерно 300 нуклеотидов, точно или от примерно 300 точно или до примерно 1000 нуклеотидов, точно или от примерно 300 точно или до примерно 750 нуклеотидов, точно или от примерно 300 точно или до примерно 600 нуклеотидов, точно или от примерно 300 точно или до примерно 400 нуклеотидов, точно или от примерно 400 точно или до примерно 1000 нуклеотидов, точно или от примерно 400 точно или до примерно 750 нуклеотидов, точно или от примерно 400 точно или до примерно 600 нуклеотидов, от точно или от примерно 600 точно или до примерно 1000 нуклеотидов, от точно или от примерно 600 точно или до примерно 750 нуклеотидов или от точно или от примерно 750 нуклеотидов до точно или до примерно 1000 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину точно или примерно 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 нуклеотидов или любое значение между любым из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии и 3' плечо независимо имеют длину точно или примерно 300 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину точно или примерно 400, 500 или 600 нуклеотидов или любое значение между любым из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 69-71, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 69-71 или ее частичной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, 3' плечо гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 72, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%., 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72 или ее частичной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор является или содержит рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, и последовательность нуклеиновой кислоты в (a) кодирует цепь TCR альфа (TCRα), цепь TCR бета (TCRβ) или обе цепи.

В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является функциональный антигенный рецептор, не относящийся к Т-клеточному рецептору (не-TCR). В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор содержит функциональный антигенный рецептор, не относящийся к Т-клеточному рецептору (не-TCR). В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит внеклеточную область, трансмембранный домен и внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область содержит связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, связывающим доменом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован с, специфичен к или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном-мишенью является опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень выбран из интегрина vβ6 (интегрин avb6), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C, группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22Rα), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13Rα2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепь каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10,

мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана A (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозинкиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфического или патоген-экспрессируемого антигена, или антигена, связанного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессируемых HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область содержит спейсер. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область содержит спейсер, который функционально связан между связывающим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит шарнирную область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит область C_H2 и область C_H3. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточным сигнальным доменом является внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточным сигнальным доменом является внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, которой является цепь CD3-дзета (CD3ζ) или ее сигнальная часть. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3, которой является цепь CD3-дзета (CD3ζ) или ее сигнальная часть. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточные сигнальные области CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* кодирует рекомбинантный рецептор, который содержит, от своего N-конца к C-концу, в следующем порядке: внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих

внеклеточный связывающий домен; спейсер; и трансмембранный домен; и внутриклеточную сигнальную область.

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность содержит по порядку последовательность нуклеотидов, кодирующую внеклеточный связывающий домен, то есть scFv; спейсер, который содержит последовательность из шарнира иммуноглобулина человека, то есть из IgG1, IgG2 или IgG4, или их модифицированной версии, которая дополнительно содержит область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, происходящий из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, происходящий из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, которой является цепь CD3ζ или ее часть.

В некоторых вариантах осуществления, CAR является мультицепочечный CAR. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих, по меньшей мере, один дополнительный белок.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты содержит один или несколько мультицистронных элементов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько мультицистронных элементов расположены между последовательностью нуклеотидов, кодирующих CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей, по меньшей мере, один дополнительный белок.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один дополнительный белок является суррогатным маркером. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один дополнительный белок является суррогатным маркером, которым является усеченный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один дополнительным белком является суррогатный маркер, которым является усеченный рецептор, в котором отсутствует внутриклеточный сигнальный домен и который не способен опосредовать внутриклеточную передачу сигналов при связывании своим лигандом. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одним дополнительным белком является суррогатный маркер, которым является усеченный рецептор, у которого отсутствует внутриклеточный сигнальный домен или который не способен опосредовать внутриклеточную передачу сигналов при связывании своим лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, и мультицистронный элемент расположен между последовательностью нуклеотидов, кодирующих TCRα, и последовательностью нуклеотидов, кодирующих TCRβ.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является мультицепочечный CAR, и мультицистронный элемент расположен между последовательностью нуклеотидов, кодирующих одну цепь мультицепочечного CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующих другую цепь мультицепочечного CAR..

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько мультицистронных

элементов расположены выше последовательности нуклеотидов, кодирующей рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько мультицистронных элементов являются или содержат последовательность проскока рибосомы. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько мультицистронных элементов являются или содержат последовательность проскока рибосомы, которой является элемент T2A, P2A, E2A или F2A.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты содержит один или несколько гетерологичных или регуляторных контрольных элементов, функционально связанных с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора при экспрессии из клетки, введенной с полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько гетерологичных регуляторных или контрольных элементов содержат гетерологичный промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусную последовательность Козака, последовательность акцептора сплайсинга и/или последовательность донора сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичным промотором является или содержит промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α) или промотор MND или его вариант.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусным вектором является вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV выбран из вектора AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 или AAV8. В некоторых вариантах осуществления, вектором AAV является вектор AAV2 или AAV6. В некоторых вариантах осуществления, вирусным вектором является ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусным вектором является ретровирусный вектор, которым является лентивирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидом является линейный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидом является линейный полинуклеотид, которым является двухцепочечный полинуклеотид или одноцепочечный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид имеет, по меньшей мере, точно или примерно 2500, 2750, 3000, 3250, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4760, 5000, 5250, 5500, 5750, 6000, 7000, 7500, 8000, 9000 или 10000 нуклеотидов в длину или любое значение между любым из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид имеет длину от точно или примерно 2500 до точно или примерно 5000 нуклеотидов или от точно или примерно 3500 до точно или примерно 4500 нуклеотидов или от точно или примерно 3750 нуклеотидов до точно или примерно 4250 нуклеотидов.

В настоящем документе представлены способы получения генетически сконструированной Т-клетки, где способ включает введение любого из представленных полинуклеотидов в Т-клетку, имеющую генетическое разрушение в локусе *TGFBR2*.

В настоящем документе представлены способы получения генетически сконструированной Т-клетки, где способ включает введение в Т-клетку одного или

нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в эндогенном локусе *TGFBR2* Т-клетки; и введение полинуклеотида в Т-клетку, содержащую генетическое разрушение в локусе *TGFBR2,* где способ дает модифицированный локус *TGFBR2,* указанный модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть, интегрирована в эндогенный локус *TGFBR2* посредством репарации, направляемой гомологией (HDR).

В настоящем документе представлены способы получения генетически сконструированной Т-клетки, где способ включает введение в Т-клетку полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, где указанная Т-клетка имеет генетическое разрушение в локусе *TGFBR2* Т-клетки, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть, интегрирована в эндогенный локус *TGFBR2* посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение проводят введением в Т-клетку одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в эндогенном локусе *TGFBR2* Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, способ дает модифицированный локус *TGFBR2,* где указанный модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид дополнительно содержит одно или несколько плеч гомологии, связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, где одно или несколько плеч гомологии содержат последовательность, гомологичную одной или нескольким областям открытой рамки считывания локуса рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2).*

В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует функциональный полипептид TGFBRII в клетке, созданной данным способом. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полипептид TGFBRII, или экспрессия полипептида TGFBRII элиминирована в клетке, созданной данным способом. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полноразмерный полипептид TGFBRII или кодирует частичный полипептид TGFBRII в клетке, созданной данным способом. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* кодирует доминантно-негативный полипептид TGFBRII в клетке, созданной данным способом.

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько плеч гомологии содержат 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит структуру [5' плечо гомологии]-[последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть]-[3' плечо гомологии]. В некоторых вариантах осуществления, 5’ плечо гомологии и 3' плечо

гомологии независимо имеют от точно или примерно 50 до точно или примерно 2000 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно или примерно 200 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 400 нуклеотидов от точно или примерно 200 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно или примерно 400 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 750 нуклеотидов, или от точно или примерно 750 до точно или примерно 1000 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления, 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину точно или примерно 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 нуклеотидов или любое значение между любым из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину точно или примерно 300 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину точно или примерно 400, 500 или 600 нуклеотидов или любое значение между любым из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 69-71, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 69-71 или ее частичной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, 3' плечо гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 72, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%., 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72 или ее частичной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор содержит рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор

(CAR).

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение, содержат ДНК-связывающий белок или ДНК-связывающую нуклеиновую кислоту, которая специфически связывается с сайтом-мишенью или гибридизуется с ним, слитый белок, содержащий ДНК-таргетный белок и нуклеазу, или нуклеазу, направляемую РНК. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов содержат цинк-пальцевую нуклеазу (ZFN), TAL-эффекторную нуклеазу (TALEN) или комбинацию CRISPR-Cas9, которая специфически связывается, распознает или гибридизируется с сайтом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, каждый из одного или нескольких агентов содержит направляющую РНК (нРНК), имеющую таргетирующий домен, комплементарный, по меньшей мере, одному сайту-мишени. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов вводят в виде комплекса рибонуклеопротеина (RNP), содержащего нРНК и белок Cas9. В некоторых вариантах осуществления, RNP вводят электропорацией, генной пушкой, трансфекцией фосфатом кальция, компрессией или сжатием клеток, например, электропорацией. В некоторых вариантах осуществления, концентрация RNP составляет от точно или примерно 1 мкМ до точно или примерно до 5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация RNP составляет точно или примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, нРНК имеет последовательность таргетирующего домена GUGGAUGACCUGGCUAACAG (SEQ ID NO: 73).

В некоторых вариантах осуществления, Т-клеткой является первичная Т-клетка, полученная от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеткой является CD8+ Т-клетка или ее подтипы. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеткой является CD4+ Т-клетка или ее подтипы. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетку получают из мультипотентной или плюрипотентной клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетку получают из мультипотентной или плюрипотентной клетки, которая является iPSC.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, вирусным вектором является вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV выбран из вектора AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 или AAV8. В некоторых вариантах осуществления, вектором AAV является вектор AAV2 или AAV6. В некоторых вариантах осуществления, вирусным вектором является ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусным вектором является ретровирусный вектор, которым является лентивирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидом является линейный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидом является линейный полинуклеотид, которым является двухцепочечный полинуклеотид или одноцепочечный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов и полинуклеотид вводят одновременно или последовательно в любом

порядке. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид вводят после введения одного или нескольких агентов. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид вводят сразу после или в течение примерно 30 секунд, 1 минуты, 2 минут, 3 минут, 4 минут, 5 минут, 6 минут, 6 минут, 8 минут, 9 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 30 минут, 40 минут, 50 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часов, 3 часов или 4 часов после введения агента.

В некоторых вариантах осуществления, перед введением одного или нескольких агентов способ включает инкубацию клеток *in vitro* со стимулирующим агентом в условиях для стимуляции или активации одной или нескольких иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент содержит и анти-CD3 и анти-CD28 антитела. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент содержит анти-CD3 или анти-CD28 антитела. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент содержит и анти-CD3 и анти-CD28 антитела, которыми являются анти-CD3/анти-CD28 гранулы. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент содержит анти-CD3 или анти-CD28 антитела, которыми являются анти-CD3/анти-CD28 гранулы. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент содержит и анти-CD3 и анти-CD28 антитела, которыми являются анти-CD3/анти-CD28 гранулы, где соотношение гранул к клеткам составляет точно или примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент содержит анти-CD3 или анти-CD28 антитела, которыми являются анти-CD3/анти-CD28 гранулы, где соотношение гранул к клеткам составляет или составляет примерно 1:1.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает удаление стимулирующих агента из одной или нескольких иммунных клеток до введения с одним или несколькими агентами.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает инкубацию клеток до, во время или после введения одного или нескольких агентов и/или введения матричного полинуклеотида с одним или несколькими рекомбинантными цитокинами. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает инкубацию клеток до, во время или после введения одного или нескольких агентов и/или введения матричного полинуклеотида с одним или несколькими рекомбинантными цитокинами, где один или несколько рекомбинантных цитокинов выбраны из группы, состоящей из IL-2, IL-7 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько рекомбинантных цитокинов добавляют в концентрации, выбранной из концентрации IL-2 от точно или примерно 10 Ед/мл до точно или примерно 200 Ед/мл. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько рекомбинантных цитокинов добавляют в концентрации, выбранной из концентрации IL-2 от точно или примерно 10 Ед/мл или примерно до 200 Ед/мл, что составляет от точно или примерно 50 МЕ/мл до точно или примерно 100 Ед/мл; IL-7 в концентрации от 0,5 нг/мл до 50 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько рекомбинантных цитокинов добавляют в концентрации, выбранной из концентрации IL-2 от точно или примерно 10 Ед/мл до точно или примерно 200 Ед/мл, что составляет точно или примерно 50 МЕ/мл до точно или примерно 100 Ед/мл; IL-7 в

концентрации от 0,5 нг/мл до 50 нг/мл, что составляет от точно или примерно 5 нг/мл до точно или примерно 10 нг/мл, и/или IL-15 в концентрации от 0,1 нг/мл до 20 нг/мл, например, от точно или примерно 0,5 нг/мл до точно или примерно 5 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят после введения одного или нескольких агентов и введения матричного полинуклеотида в течение вплоть до или примерно 24 часов, 36 часов, 48 часов, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 дня. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят после введения одного или нескольких агентов и введения матричного полинуклеотида в течение вплоть до или приблизительно 24 часов, 36 часов, 48 часов, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 дня, что может составлять вплоть до точно или примерно 7 дней.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или более 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 90% клеток во множестве сконструированных клеток, созданных этим способом, содержат генетическое разрушение, по меньшей мере, одного сайта-мишени в локусе *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или более 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 90% клеток во множестве сконструированных клеток, созданных данным способом, экспрессируют рекомбинантный рецептор или его антигенсвязывающий фрагмент.

В настоящем документе представлены сконструированные Т-клетки или множество сконструированных Т-клеток, созданные с использованием любого из описанных в настоящем документе способов.

В настоящем документе представлены композиции, содержащие сконструированные Т-клетки из любого из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе.

В настоящем документе представлены композиции, содержащие множество сконструированных Т-клеток из любого из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит CD4+ и/или CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит CD4+ и CD8+ Т-клетки, и соотношение CD4+ и CD8+ Т-клеток составляет от или от примерно 1:3 до 3:1. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит CD4+ и CD8+ Т-клетки, и соотношение CD4+ и CD8+ Т-клеток составляет от или от примерно 1:3 до 3:1, что может составлять 1:1. В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, составляют, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%. 96%, 97%, 98%, 99% или более от общего количества клеток в композиции или от общего количества клеток CD4+ или CD8+ в композиции.

В настоящем документе представлены способы лечения, включающие введение сконструированной клетки, множества сконструированных клеток или композиции по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, субъекту, страдающему заболеванием или нарушением.

В настоящем документе представлено применение сконструированной клетки,

множества сконструированных клеток или композиции по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, для лечения заболевания или нарушения.

В настоящем документе представлено применение сконструированной клетки, множества сконструированных клеток или композиции по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения.

В настоящем документе представлено применение сконструированной клетки, множества сконструированных клеток или композиции по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, для использования в лечении заболевания или нарушения.

В некоторых вариантах осуществления способа, применения или сконструированной клетки, множества сконструированных клеток или композиции для использования по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, заболеванием или нарушением является рак или опухоль.

В некоторых вариантах осуществления, раком или опухолью является гематологическое злокачественное новообразование, такое как лимфома, лейкоз или злокачественное новообразование плазматических клеток. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома, и лимфомой является лимфома Беркитта, неходжкинская лимфома (NHL), лимфома Ходжкина, макроглобулинемия Вальденстрема, фолликулярная лимфома, мелкоклеточная лимфома с нерасщепленными ядрами, лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфома маргинальной зоны, лимфома селезенки, узловая моноцитоидная В-клеточная лимфома, иммунобластная лимфома, крупноклеточная лимфома, диффузная смешанная клеточная лимфома, легочная В-клеточная ангиоцентрическая лимфома, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, лимфоплазмацитартная лимфома (LPL) или мантийноклеточная лимфома (MCL). В некоторых вариантах осуществления, раком является лейкоз, и лейкозом является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), плазмоклеточный лейкоз или острый лимфоцитарный лейкоз (ALL). В некоторых вариантах осуществления, раком является злокачественное новообразование плазматических клеток, и злокачественным новообразованием плазматических клеток является множественная миелома (MM).

В некоторых вариантах осуществления, опухолью является солидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления, солидной опухолью является немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или плоскоклеточная карцинома головы и шеи (HNSCC).

В настоящем документе представлены наборы, которые содержат один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в локусе *TGFBR2*; и полинуклеотид по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

В настоящем документе представлены наборы, которые содержат один или

несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в локусе *TGFBR2*; и полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, где трансген, кодирующий рекомбинантный рецептор или его фрагмент, такой как антигенсвязывающий фрагмент, домен и/или его цепь, направлен для интеграции в или рядом с сайтом-мишенью посредством репарации, направляемой гомологией (HDR); и инструкции для выполнения способа по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1A-1D показывают противоопухолевую активность адоптивно перенесенных анти-ROR1 CAR+ Т-клеток, по данным изменения объема опухоли в модели ксенотрансплантата мыши с опухолью NOD.Cg.Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), с введенными подкожно клетками немелкоклеточного рака легкого H1975. **Фиг. 1A** и **1C** (среднее значение по группе; донор 1 и 2, соответственно) и **фиг. 1B** и **1D** (отдельные мыши; донор 1 и 2, соответственно) показывают изменение объема опухоли для мышей, которым введены сконструированные первичные композиции Т-клеток человека, полученные от одного из двух независимых доноров (донор 1, донор 2), следующим образом: (1) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 посредством лентивирусной доставки (только LV), (2) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 посредством лентивирусной доставки и нокаута *TGFBR2* (LV+KO), или (3) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 и DN-TGFBRII путем лентивирусной доставки (LV+DN), введенные в дозе 1×10^6 клеток (низкая доза; верхние панели) или 3×10^6 клеток (высокая доза; нижние панели); и 3 x 10^6 ложно обработанных клеток (имитация КО) или не обработанных (только опухоль) в качестве контроля.

Фиг. 2A и **2B** (донор 1 и 2, соответственно) показывают кривую выживания без опухоли мышей NSG, несущих опухоли H1975, получивших адоптивный перенос сконструированных клеток, как описано в примере 1.B.

Фиг. 3A (для группы) и **3B** (для индивидуумов) показывают изменение объема опухоли в течение первых 14 дней после введения 1×10^6 сконструированных Т-клеток мышам NSG, несущим опухоли H1975, до сбора образцов опухоли, селезенки и крови, следующим образом: (1) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 посредством лентивирусной доставки (LV), (2) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 посредством лентивирусной доставки и нокаута *TGFBR2* (LV+KO), или (3) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 и DN-TGFBRII, посредством лентивирусной доставки (LV+DN) в дозе 1 x 10^6 клеток, со сконструированными клетками во всех группах, подвергнутых электропорации.

Фиг. 4A-4B показывают частоту CAR-экспрессирующих CD4+ (верхние панели) и CD8+ (нижние панели) Т-клеток в крови (**фиг. 4A)** или селезенке (**фиг. 4B)** мышей, которым введены клетки, сконструированные с помощью различных способов доставки, как описано в Пример 2.B. **Фиг. 4C-4D** показывают частоту CAR-экспрессирующих CD4+

(верхняя панель) и CD8+ (нижняя панель) Т-клеток в опухоли (**фиг. 4C**) и частоту CD103+ CAR-экспрессирующих CD4+ (верхняя панель) и CD8+ (нижняя панель) Т-клеток в опухоли (**фиг. 4D**).

Фиг. 5A-5B показывают изменения активности каспазы 3/7 (**фиг. 5A**; суммарная интегральная интенсивность зеленого объекта) и размера опухолевого сфероида H1975 (**фиг. 5B**; суммарная интегральная интенсивность красного объекта) на основе анализа киллинга сфероидов, в котором выделенные инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) из образцов опухоли или селезенки мышей, которым введены сконструированные Т-клетки, сконструированные с использованием различных способов доставки, инкубируют с опухолевыми сфероидами H1975 при соотношении эффектора к мишени 1:5 в присутствии низкого уровня TGFβ в среде, содержащей сыворотку. В качестве контроля клетки опухолевого сфероида H1975 инкубируют без сконструированных клеток (только опухоль).

Фиг. 6A-6B показывают изменения активности каспазы 3/7 (**фиг. 6A)** и размера опухолевого сфероида H1975 (**фиг. 6B)** на основе анализа киллинга сфероида после инкубации со сконструированными клетками, экспрессирующими анти-ROR1 CAR R12 или CAR, содержащий полностью человеческий анти-ROR1 scFv антигенсвязывающий домен, с (полностью человеческий KO) нокаутом *TGFBR2* или без (полностью человеческий WT), с опухолевыми сфероидами H1975 при соотношении эффектора к мишени 1:5. В качестве контроля опухолевые сфероидные клетки H1975 инкубируют без сконструированных клеток (только опухоль). Клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR с антигенсвязывающим доменом scFv, полученные из R12, с нокаутом *TGFBR2* (R12 KO) или без (R12 WT), описанные в Примере 1.A выше, и клетки, обработанные ложной трансдукцией и электропорацией без RNP (имитация) или ложной трансдукцией с RNP для нокаута *TGFBR2* (имитация KO) также оценивают как контроль.

Фиг. 7 изображает поверхностную экспрессию типового химерного антигенного рецептора (CAR) и бокового рассеяния (SSC) по данным проточной цитометрии, в CAR-экспрессирующих клетках, созданных путем таргетирования последовательностей трансгена, кодирующих типовой CAR для интеграции в эндогенный локус *TGFBR2.* Последовательности трансгена также включают a) промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α) для управления экспрессией последовательностей, кодирующих CAR, под контролем гетерологичного промотора (EF1α-CAR); или b) последовательности, кодирующие элемент проскока рибосомы P2A выше последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих типовой CAR (P2A-CAR) для управления экспрессией CAR из эндогенного промотора *TGFBR2* при таргетной интеграции внутри рамки в открытую рамку считывания *TGFBR2* (KO/KI). В качестве контроля, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CAR, включают в типовой лентивирусный вектор, полученный из HIV-1, для экспрессии CAR из последовательностей, введенных в Т-клетку путем случайной интеграции (Lenti). Для экспрессии доминантно-негативной (DN) формы рецептора II трансформирующего фактора роста бета (DN-TGFBRII) лентивирусная

трансдукционная конструкция дополнительно содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие DN-TGFBRII. Указана доля клеток, экспрессирующих CAR (CAR+).

Фиг. 8A-8C показывают экспрессию анти-ROR1 CAR R12 (среднее геометрическое значение флуоресценции по данным проточной цитометрии; **фиг. 8A)**, изменения активности каспазы 3/7 (**фиг. 8B)** и размер сфероида опухоли H1975 (**фиг. 8C)** на основе анализа киллинга сфероида после инкубации со сконструированными клетками, экспрессирующими анти-ROR1 CAR R12, сконструированными с использованием следующих различных способов доставки: (1) только лентивирусная доставка (LV), (2) лентивирусная доставка с нокаутом *TGFBR2* (LV+KO), (3) лентивирусная доставка и экспрессия доминантно-негативного TGFBRII (LV+DN); или (4) таргетный нокин на локусе *TGFBR2* посредством HDR (KO/KI).

Фиг. 9A-9C показывают изменения экспрессии анти-ROR1 CAR R12 (% CAR+ клеток; **фиг. 9A)** до (до-) или после (после-) анализа длительной стимуляции, изменения активности каспазы 3/7 (**фиг. 9B)** и размер сфероида опухоли H1975 (**фиг. 9C)** на основе анализа киллинга сфероидов после инкубации со сконструированными клетками, экспрессирующими анти-ROR1 CAR R12, сконструированными с использованием различных способов доставки и подвергнутых 7-дневной пролонгированной стимуляции гранулами, покрытыми рекомбинантным ROR1-Fc слитым белком, инкубированным при соотношении эффектор:мишень (E:T) 1:5 (верхняя панель) или 1:10 (нижняя панель).

Фиг. 10A-10B показывают изменения активности каспазы 3/7 (**фиг. 10A)** и размера сфероида опухоли H1975 (**фиг. 10B)** на основе анализа киллинга сфероидов после инкубации со сконструированными клетками, экспрессирующими типовой Т-клеточный рецептор (TCR) сконструированного вируса папилломы человека 16 (HPV16), сконструированный с использованием различных способов доставки, следующим образом: (1) только лентивирусная доставка (TCR), (2) лентивирусная доставка с нокаутом *TGFBR2* (TCR+KO) или (3) лентивирусная доставка и ложная электропорация без RNP (TCR EP), с (нижние панели) или без (верхние панели) 10 нг/мл TGFβ в среде. В качестве контроля также оценивают клетки, обработанные ложной трансдукцией (имитацией), ложной трансдукцией и электропорацией без RNP (фиктивный EP) или ложной трансдукцией и электропорацией с RNP для нокаута *TGFBR2* (фиктивный KO).

Фиг. 11A-11B изображают поверхностную экспрессию типового сконструированного анти-человеческого Т-клеточного рецептора (TCR) вируса папилломы 16 (HPV16), окрашенного с использованием анти-Vbeta2 антитела, и бокового рассеяния (SSC), оцененного с помощью проточной цитометрии, в TCR-экспрессирующих клетках, созданных путем таргетирования последовательностей трансгена, кодирующих типовой TCR для интеграции в эндогенный локус *TGFBR2,* под контролем либо a) промотора фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α) (EF1α KO/KI), либо b) промотора MND (МНД KO/KI). Также оценивают клетки, экспрессирующие рекомбинантный TCR посредством лентивирусной доставки с нокаутом *TGFBR2* (TCR LV *TGFBR2* KO) или без нокаута *TGFBR2* (TCR LV). Дополнительные контроли включают клетки, подвергнутые ложной

обработке (имитация), и клетки с нокаутом *TGFBR2,* которые не были сконструированы для экспрессии рекомбинантного TCR (*TGFBR2* KO).

Фиг. 12A-12B показывают изменения активности каспазы 3/7 (**фиг. 12A)** и размера сфероида опухоли H1975 (**фиг. 12B)** на основе анализа киллинга сфероида после инкубации со сконструированными клетками, экспрессирующими анти-HPV16 TCR, сконструированные с использованием различных способов доставки, описанных в примере 6.B, инкубированными при соотношении эффектор:мишень (E:T) 1:1 (верхние панели) или 1:5 (нижние панели).

Подробное описание

В настоящем документе представлены генетически сконструированные клетки, такие как Т-клетки, имеющие модифицированный локус рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2)*, который содержит одну или несколько трансгенных последовательностей (в дальнейшем также называемых взаимозаменяемо «донорскими» последовательностями, например, последовательностями, которые являются экзогенными или гетерологичными по отношению к Т-клетке), кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор или его часть, такая как химерный антигенный рецептор (CAR) или его часть, кодируется трансгенными последовательностями, которые интегрированы в локус *TGFBR2* в геноме клетки, что дает модифицированный локус *TGFBR2* в геноме. В некоторых вариантах осуществления, белок TGFBRII или его часть также кодирован модифицированным локусом *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, часть TGFBRII, кодируемая модифицированным *TGFBR2,* может действовать как доминантно-негативная форма TGFBRII, например, конкурируя с TGFBRII дикого типа или не модифицированным TGFBRII за связывание с лигандом трансформирующего ростового фактора бета (TGFβ). В некоторых вариантах осуществления, экспрессия эндогенного гена *TGFBR2* выключена, снижена или элиминирована из модифицированного локуса *TGFBR2* в сконструированной клетке.

Также представлены способы получения генетически сконструированных клеток, содержащих модифицированный локус *TGFBR2,* экспрессирующий рекомбинантный рецептор или его часть. Представленные варианты осуществления включают специфическое таргетирование трансгенных последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть, на эндогенный локус *TGFBR2.* В некоторых контекстах, представленные варианты осуществления, включают индуцирование таргетного разрушения гена, например, генерацию разрыва ДНК, например, с использованием методов редактирования генов, и репарацию, направляемую гомологией (HDR) для таргетного нокина трансгенных последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор, на эндогенном локусе *TGFBR2,* тем самым снижая или элиминируя экспрессию и/или функцию эндогенного гена *TGFBR2.* Также представлены родственные клеточные композиции, нуклеиновые кислоты и наборы для использования в создании сконструированных клеток, представленных в настоящем документе, и/или в

способах, предоставленных в настоящем документе.

Терапия на основе Т-клеток, такая как адоптивная Т-клеточная терапия (включая те, которые включают введение сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные, сконструированные или химерные рецепторы, специфичные для представляющего интерес заболевания или нарушения, такие как химерный антигенный рецептор (CAR), рекомбинантный Т клеточный рецептор (TCR) или другие рекомбинантные, сконструированные или химерные рецепторы) могут быть эффективными при лечении рака и других заболеваний и нарушений. В определенных контекстах, другие подходы к созданию сконструированных клеток для адоптивной клеточной терапии не всегда могут быть полностью удовлетворительными. В некоторых аспектах, эффективность или мощность сконструированных клеток может зависеть от различных факторов, включая истощение Т-клеток, иммунодепрессивную микросреду опухоли (TME), слабую инфильтрацию клеток в мишень, например опухоль, и отсутствие эндогенного противоопухолевого иммунного ответа. В некоторых контекстах, оптимальная активность или результат могут зависеть от способности введенных клеток распознавать и связываться с мишенью, *например,* с антигеном-мишенью, перемещаться, локализоваться и успешно проникать в соответствующие сайты внутри субъекта, опухолей и их среды. В некоторых контекстах, оптимальная активность или результат могут зависеть от способности введенных клеток становиться активированными, размножаться, проявлять различные эффекторные функции, включая цитотоксическое уничтожение и секрецию различных факторов, таких как цитокины, сохраняться, в том числе долгое время, дифференцировать, переходить или участвовать в перепрограммировании в определенные фенотипические состояния (такие как долгоживущая память, менее дифференцированные и эффекторные состояния), чтобы избежать или уменьшить иммунодепрессивные состояния в локальной микросреде заболевания, чтобы обеспечить эффективные и надежные вторичные иммунные ответы после клиренса и повторного воздействие на лиганд-мишень или антиген-мишень, а также избежать или уменьшить истощение, анергию, периферическую толерантность, терминальную дифференциацию и/или дифференциацию в депрессивное состояние.

В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления включают индуцирование таргетного генетического разрушения и интеграцию трансгенных последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть, посредством HDR в эндогенном локусе *TGFBR2,* тем самым изменяя, снижая или элиминируя экспрессию TGFBRII из эндогенного гена *TGFBR2*. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления, основаны на наблюдениях о том, что снижение и/или элиминация экспрессии TGFBRII, например, путем генетического разрушения (например, нокаута) и/или таргетной интеграции (например, нокина) трансгенных последовательностей, таких как последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор, приводят к улучшенной активности и/или функции, такой как противоопухолевая активность, продуцирование цитокинов, размножение и/или жизнестойкость сконструированных клеток. В некоторых

аспектах, сконструированные клетки могут содержать модифицированный локус *TGFBR2,* в котором экспрессия TGFBRII нокаутирована, снижена или элиминирована, или экспрессируется модифицированная форма полипептида TGFBRII. В некоторых аспектах, таргетная интеграция трансгенных последовательностей может приводить к экспрессии модифицированной формы полипептида TGFBRII, которая может конкурировать или ингибировать функцию или активность дикого типа или немодифицированного TGFBRII, экспрессированного в той же клетке. В некоторых вариантах осуществления, таргетное генетическое разрушение и интеграция трансгенных последовательностей с помощью HDR может привести к экспрессии доминантно-негативной (DN) формы полипептида TGFBRII, такой как DN форма, которая содержит внеклеточный домен и трансмембранный домен, но не содержит весь или часть цитоплазматического домена. В некоторых аспектах, модифицированный полипептид TGFBRII, такой как DN форма TGFBRII, может конкурировать с TGFBRII дикого типа или не модифицированным TGFBRII за связывание с лигандом трансформирующего ростового фактора бета (TGFβ).

В некоторых случаях связывание лиганда трансформирующего ростового фактора бета (TGFβ) с эндогенным TGFBRII, который является рецептором, обычно экспрессируемым на поверхности иммунных клеток, таких как Т-клетки, инициирует образование рецепторного комплекса для инициации клеточной передачи сигналов. Опосредованная TGFβ клеточная передача сигналов в иммунных клетках, таких как CD4+ и CD8+ Т-клетки, может приводить к подавлению CD8+ Т-клеток и индукции фенотипов регуляторных Т-клеток (Treg) в CD4+ клетках. В некоторых аспектах, TGFβ в TME может влиять на пролиферацию Т-клеток, ингибировать созревание Т-хелперных клеток и/или снижать эффекторную функцию Т-клеток. В некоторых аспектах, TGFβ может подавлять экспрессию генов, участвующих в цитотоксичности в Т-клетках, таких как перфорин, гранзим А, гранзим В, IFNγ и лиганд Fas. В некоторых аспектах, TGFβ может индуцировать развитие Treg клеток, что может приводить к иммунодепрессии. В некоторых аспектах, снижение или подавление клеточной передачи сигналов, опосредованной TGFβ, например, нокаутом экспрессии рецептора TGFβ, такого как TGFBRII, или экспрессии доминантно-негативной формы TGFBRII, может привести к преодолению депрессивного действия передачи сигналов TGFβ в клетках (см., например, Yang et al., Trends Immunol. (2010) 31(6): 220-227; Oh et al., J Immunol. (2013) 191(8): 3973-3979; Principe et al., Cancer Res. (2016) 76(9): 2525-2539).

В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления предлагают преимущество, которое позволяет сконструированным клеткам, введенным для адоптивной терапии, ослаблять или преодолевать иммунодепрессивные эффекты TGFβ в микросреде опухоли (TME). В некоторых случаях TME содержит или продуцирует факторы или условия, такие как TGFβ, которые могут опосредовать иммунодепрессивные сигналы для подавления активности, функции, пролиферации, выживания и/или жизнестойкости Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, снижение или устранение экспрессии *TGFBR2* в сконструированной клетке позволяет

сконструированным клеткам ослаблять или преодолевать иммунодепрессивные эффекты, такие как иммунодепрессивные эффекты TGFβ-опосредованной передачи сигналов, и способствовать функции, активности, пролиферации, выживания и/или жизнестойкости Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления, представленные клетки, композиции, нуклеиновые кислоты, наборы и способы могут обеспечить улучшенную клеточную терапию, особенно для клеточных терапий, которые таргетированы или специфичны для антигена в микросреде опухоли. В некоторых случаях предоставленные клетки, композиции и способы могут привести к снижению экспрессии рецептора TGFβ и/или привести к продукции доминантно-негативного TGFβR (DN TGFβR), который может противостоять ингибирующим эффектам TGFβ, в результате чего Т-клетки имеют более длительную выживаемость и/или улучшенную функцию.

В некоторых контекстах, представленные способы можно использовать в связи с мишенями солидных опухолей или другими болезненными микросредами, где иммунодепрессивная активность TGFβ может иным образом ухудшать или снижать функцию, выживаемость или активность Т-клеточной терапии. Более того, представленные клетки, композиции, нуклеиновые кислоты, наборы и способы также обладают преимуществами в контроле и регулировании экспрессии рекомбинантного рецептора, например CAR, на клетках клеточной терапии.

В некоторых контекстах, рекомбинантные рецепторы, кодированные из модифицированного локуса *TGFBR2* в сконструированных клетках, представленных в настоящем документе, могут быть кодированы под контролем эндогенных регуляторных элементов геномного локуса *TGFBR2* или экзогенных регуляторных элементов. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления позволяют экспрессировать рекомбинантный рецептор под контролем эндогенных регуляторных элементов *TGFBR2* или контрольных элементов, например цис-регуляторных элементов, таких как промотор, или 5' и/или 3' нетранслируемых областей (UTR) эндогенного локуса *TGFBR2*. В некоторых аспектах, такие варианты осуществления позволяют экспрессировать рекомбинантный рецептор, например, CAR или его часть, и/или экспрессия регулируется на уровне, аналогичном эндогенному TGFBRII, например, на уровне нуклеиновой кислоты и/или на уровне белка.

В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления позволяют экспрессировать рекомбинантный рецептор под контролем экзогенных или гетерологичных регуляторных или контрольных элементов, что, в некоторых аспектах, обеспечивает более контролируемый уровень экспрессии. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления позволяют таргетную и контролируемую экспрессию рекомбинантного рецептора в различных типах клеток, включая клетки, в которых эндогенный промотор на эндогенном локусе *TGFBR2* может не быть активным.

В некоторых контекстах оптимальная эффективность сконструированных клеток может зависеть от способности введенных клеток экспрессировать рекомбинантный

рецептор, в том числе с однородной, гомогенной и/или последовательной экспрессией рецепторов среди клеток, таких как популяция иммунных клеток и/или клетки в терапевтической клеточной композиции, и рекомбинантный рецептор для распознавания и связывания с мишенью, *например,* антигеном-мишенью, внутри субъекта, опухолей и их сред. В некоторых случаях доступные способы введения рекомбинантного рецептора, такого как CAR, в клетку, представляют собой рандомную интеграцию последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых случаях, такие способы не совсем удовлетворительны. В некоторых аспектах, рандомная интеграция может привести к возможному инсерционному мутагенезу и/или генетическому разрушению еще одного случайного генетического локуса в клетке, включая те, которые могут быть важны для функции и активности клетки. В некоторых случаях, полурандомная или рандомная интеграция трансгена, кодирующего рецептор, в геном клетки может, в некоторых случаях, привести к неблагоприятным и/или нежелательным эффектам из-за интеграции последовательности нуклеиновой кислоты в нежелательную локацию в геноме, например, в жизненно важном гене или гене, критически важном для регуляции активности клетки.

В некоторых случаях, рандомная интеграция может привести к вариабельной интеграции последовательностей, кодирующих рекомбинантный или химерный рецептор, что может привести к несогласованной экспрессии, вариабельному количеству копий нуклеиновых кислот и/или вариабельности экспрессии рецептора в клетках клеточной композиции, такой как терапевтическая клеточная композиция. В некоторых случаях, рандомная интеграция последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рецептор, может привести к мозаичной, гетерогенной, неоднородной и/или субоптимальной экспрессии или связыванию антигена, онкогенной трансформации и подавлению транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, в зависимости от сайта интеграции и/или количества копий последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах, гетерогенная и неоднородная экспрессия в клеточной популяции может приводить к несогласованности или нестабильности экспрессии и/или связывания антигена рекомбинантным или химерным рецептором, непредсказуемости функции или снижению функции сконструированных клеток и/или неоднородному лекарственному продукту, тем самым снижая эффективность сконструированных клеток. В некоторых аспектах, использование конкретных векторов рандомной интеграции, таких как определенные лентивирусные векторы, требует подтверждения того, что сконструированные клетки не содержат репликационно-компетентного вируса. Необходимы улучшенные стратегии для достижения согласованных уровней экспрессии и функции рекомбинантных или химерных рецепторов при минимизации рандомной интеграции нуклеиновых кислот и/или гетерогенной экспрессии в популяции.

В некоторых контекстах, представленные варианты осуществления относятся к конструированию клетки, имеющей нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, для интеграции в эндогенный локус *TGFBR2* клетки, например Т-клетки,

посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). В некоторых аспектах, HDR может опосредовать сайт-специфическую интеграцию трансгенных последовательностей (таких как трансгенные последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор или химерный рецептор, или его часть, цепь или фрагмент) в сайте-мишени или рядом с ним для генетического разрушения, таком как эндогенный локус *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, наличие генетического разрушения (например, в сайте-мишени в эндогенном локусе *TGFBR2)* и матричного полинуклеотида, содержащего одно или несколько плеч гомологии (например, содержащего последовательности нуклеиновой кислоты, гомологичные последовательностям, окружающим генетическое разрушение) может индуцировать или направлять HDR, при этом гомологичные последовательности действуют как матриица для репарации ДНК. Основываясь на гомологии между последовательностью эндогенного гена, окружающей генетическое разрушение, и плечами гомологии, включенными в матричный полинуклеотид, механизм репарации клеточной ДНК может использовать матричный полинуклеотид для репарации разрыва ДНК и повторного синтеза генетической информации в месте генетического разрушения, тем самым эффективно вставляя или интегрируя последовательности между плечами гомологии (такие, как трансгенные последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть) в или рядом с сайтом-мишенью генетического разрушения. Представленные варианты осуществления могут создавать клетки, содержащие модифицированный локус *TGFBR2,* кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть, где трансгенные последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть, интегрированы в эндогенный локус *TGFBR2* посредством HDR.

В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления предлагают преимущества в получении сконструированных клеток с улучшенным и/или более эффективным таргетированием нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор, в клетку, что, в то же время также приводит к снижению и/или элиминации экспрессии *TGFBR2* и может привести к повышению активности и/или функции сконструированной клетки, или, в некоторых случаях, экспрессии доминантно-негативной формы TGFBRII. В некоторых случаях, представленные варианты осуществления, минимизируют возможную полурандомную или рандомную интеграцию и/или гетерогенную или мозаичную экспрессию, и приводят к улучшенной, однородной, гомогенной, согласованной или стабильной экспрессии рекомбинантного рецептора, или уменьшенной, низкой или отсутствующей возможности инсерционного мутагенеза. В некоторых аспектах, по сравнению с другими способами получения генетически сконструированных иммунных клеток, экспрессирующих рекомбинантный или химерный рецептор, например, TCR или CAR, представленные варианты осуществления позволяют более стабильную, более физиологичную, более контролируемую или более однородную, согласованную или гомогенную экспрессию рекомбинантного или химерного рецептора. В некоторых случаях, способы позволяют создавать более согласованного и более предсказуемого лекарственного продукта, например, клеточной композиции, содержащей

сконструированные клетки, что может дать более безопасную терапию для леченных пациентов. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления также позволяют предсказуемую и последовательную интеграцию в локусе одного гена или локусах нескольких генов, представляющих интерес. В некоторых вариантах осуществления, представленные варианты могут также привести к созданию популяции клеток с постоянным числом копий (обычно 1 или 2) нуклеиновых кислот, которые интегрированы в клетки популяции, что в некоторых аспектах, обеспечивает согласованность экспрессии рекомбинантных рецепторов и экспрессии генов эндогенного рецептора в популяции клеток. В некоторых случаях, представленные варианты осуществления не включают использование вирусного вектора для интеграции и, таким образом, могут снизить потребность в подтверждении того, что сконструированные клетки не содержат репликационно-компетентного вируса, тем самым повышая безопасность клеточной композиции.

Также представлены способы конструирования, получения и производства сконструированных клеток, а также наборы и устройства для создания или производства сконструированных клеток. Также представлены клетки и клеточные композиции, полученные с помощью этих способов. Представлены полинуклеотиды, например вирусные векторы, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, и способы введения таких полинуклеотидов в клетки, такие как трансдукция или физическая доставка, например электропорация. Также представлены композиции, содержащие сконструированные клетки, и способы, наборы и устройства для введения клеток и композиций субъектам, например, для адоптивной клеточной терапии. В некоторых аспектах, клетки выделяют от субъекта, конструируют и вводят тому же субъекту. В других аспектах, их выделяют от одного субъекта, конструируют и вводят другому субъекту. В некоторых вариантах осуществления, представленные полинуклеотиды, нуклеотидные последовательности, последовательности нуклеиновых кислот, трансгены и/или векторы при доставке в иммунные клетки приводят к экспрессии рекомбинантных или химерных рецепторов, например, TCR или CAR, которые могут модулировать активность Т-клеток и, в некоторых случаях, может модулировать дифференциацию или гомеостаз Т-клеток. Полученные в результате генетически сконструированные клетки или клеточные композиции можно использовать в способах адоптивной клеточной терапии.

Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упомянутые в данной заявке, включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была индивидуально включена посредством ссылки. Если определение, изложенное в настоящем документе, противоречит или иным образом не согласуется с определением, изложенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящий документ посредством ссылки, определение, изложенное в настоящем документе, преобладает над определением, которое включено в данный документ посредством ссылки.

Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничение описываемого объекта изобретения.

I. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЙ РЕЦЕПТОР, РЕПАРАЦИЕЙ, НАПРАВЛЯЕМОЙ ГОМОЛОГИЕЙ

В настоящем документе представлены способы создания или производства генетически сконструированных клеток, содержащих модифицированный локус *TGFBR2,* в которых модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие рекомбинантный рецептор или химерный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых аспектах, модифицированный локус *TGFBR2* в генетически сконструированной клетке содержит трансгенная последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, интегрированную в эндогенный локус *TGFBR2* (например, так, чтобы локус был модифицирован). В некоторых вариантах осуществления, способы включают индуцирование таргетного генетического разрушения и репарации, направляемой гомологией (HDR) с использованием полинуклеотидов (например, также называемых «матричные полинуклеотиды»), содержащих трансген, кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть, тем самым таргетируя интеграцию трансгена в локус *TGFBR2.* Также предоставлены клетки и клеточные композиции, созданные способами, и полинуклеотиды, например матричные полинуклеотиды, и наборы для использования в способах.

В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления, используют HDR для таргетной интеграции трансгенных последовательностей в локус *TGFBR2.* В некоторых случаях, способы включают введение одного или нескольких таргетных генетических разрушений, например, разрыва ДНК, в эндогенный локус *TGFBR2* с помощью способов редактирования генов в сочетании с таргетной интеграцией трансгенных последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть, с помощью HDR. В некоторых аспектах, одно или несколько таргетных генетических разрушений осуществляется путем введения одного или нескольких агентов, способных вызывать генетические разрушения. В некоторых вариантах осуществления, стадия HDR вызывает разрушение или разрыв, например двухцепочечный разрыв, в ДНК в таргетной геномной локации. В некоторых вариантах осуществления, разрыв ДНК индуцируется с использованием способов редактирования генов, например, таргетных нуклеаз. В некоторых вариантах осуществления, способы дают сконструированную клетку, в которой нокаутирована экспрессия *TGFBR2.*

В некоторых аспектах, представленные способы включают введение одного или нескольких агентов, способных индуцировать генетическое разрушение в сайте-мишени в локусе *TGFBR2,* в Т-клетку; и введение в Т-клетку полинуклеотида, например, матричного полинуклеотида, содержащего трансген и одно или несколько плеч гомологии. В

некоторых аспектах, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, такая как трансген, направлена для интеграции в локус *TGFBR2* посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). В некоторых аспектах, представленные способы включают введение полинуклеотида, содержащего трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, содержащуюся в Т-клетке, имеющую генетическое разрушение в локусе *TGFBR2,* где генетическое разрушение было вызвано одним или несколькими агентами, способными индуцировать генетическое разрушение одного или нескольких сайтов-мишеней в локусе *TGFBR2,* и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, такая как трансген, направлена для интеграции в локус *TGFBR2* посредством HDR. В некоторых вариантах осуществления, также представлены композиции, содержащие популяцию клеток, которые были сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, TCR или CAR, так что популяция клеток демонстрирует более улучшенную, однородную, гомогенную и/или стабильную экспрессию и/или связывание антигена рекомбинантным рецептором, включая генетически сконструированные иммунные клетки, полученные любым из представленных способов.

В некоторых аспектах, варианты осуществления включают создание таргетного геномного разрушения, такого как таргетный разрыв ДНК, с использованием способов редактирования генов и/или таргетных нуклеаз, с последующей HDR на основе одного или нескольких матричных полинуклеотидов, например матричного полинуклеотида, который содержит гомологические последовательности, которые гомологичны последовательностям в эндогенном локусе *TGFBR2,* связанным с трансгенными последовательностями, кодирующими рекомбинантный рецептор или его часть, и, необязательно, последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими другие молекулы, для специфического таргетирования и интеграции трансгенных последовательностей в месте разрыва ДНК или рядом с ним. Таким образом, в некоторых аспектах, способы включают стадию индуцирования таргетного генетического разрушения (например, через редактирование гена) и введения полинуклеотида, например матричного полинуклеотида, содержащего трансгенные последовательности, в клетку (например, посредством HDR).

В некоторых вариантах осуществления, таргетное генетическое разрушение и таргетная интеграция трансгенных последовательностей посредством HDR происходит в одном или нескольких сайтах-мишенях в эндогенном локусе *TGFBR2.* В некоторых аспектах, таргетная интеграция происходит в последовательности открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2.* В некоторых аспектах, таргетная интеграция трансгенных последовательностей приводит к нокауту эндогенного гена *TGFBR2,* например, так что экспрессия эндогенного гена *TGFBR2* элиминируется. В некоторых аспектах, таргетная интеграция трансгена приводит к экспрессии доминантно-негативной (DN) формы полипептида TGFBRII. В некоторых аспектах, доминантно-негативной (DN)

формой (также называемой антиморфной мутацией) является измененный генный продукт, который действует антагонистически по отношению к генному продукту дикого типа, экспрессируемому в той же клетке. В некоторых аспектах, форма DN вызывает изменение молекулярной функции, необязательно ингибируя, противодействуя, конкурируя с и/или инактивируя нормальную функцию генного продукта, и характеризуется доминантным или полудоминантным фенотипом. Например, в некоторых вариантах осуществления, форма DN может все еще взаимодействовать с теми же факторами или молекулами, что и генный продукт дикого типа, но может блокировать некоторые аспекты функции генного продукта дикого типа при экспрессии в той же клетке. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность интегрирована в локус *TGFBR2,* например, посредством репарации, направляемой гомологией (HDR) в экзоне открытой рамки считывания или ее частичной последовательности эндогенного локуса *TGFBR2,* так что последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть, находятся внутри рамки с последовательностью экзона. В некоторых аспектах, часть эндогенного локуса *TGFBR2,* такая как часть выше интегрированных трансгенных последовательностей, и рекомбинантный рецептор или его часть экспрессируются в модифицированном локусе *TGFBR2,* необязательно разделенном мультицистронным элементом. В некоторых аспектах, экспрессированная часть эндогенного локуса *TGFBR2* кодирует DN форму TGFBRII.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, например матричный полинуклеотид, вводят в сконструированную клетку до, одновременно или после введения одного или нескольких агентов, способных вызывать одно или несколько таргетных генетических разрушений. В присутствии одного или нескольких таргетных генетических разрушений, например, разрыва ДНК, матричный полинуклеотид можно использовать в качестве матрицы репарации ДНК, чтобы эффективно копировать и/или интегрировать трансген на или рядом с сайтом таргетного генетического нарушения посредством HDR, на основе гомологии между последовательностью эндогенного гена, окружающей генетическое разрушение, и одним или несколькими плечами гомологии, такими как 5' и/или 3' плечами гомологии, включенными в матричный полинуклеотид.

В некоторых аспектах, две стадии могут выполняться последовательно. В некоторых вариантах осуществления, стадии редактирования гена и HDR выполняют одновременно и/или в одной экспериментальной реакции. В некоторых вариантах осуществления, стадии редактирования гена и HDR выполняют последовательно или друг за другом в одной или последовательных экспериментальных реакциях. В некоторых вариантах осуществления, стадии редактирования гена и HDR выполняют в отдельных экспериментальных реакциях одновременно или в разное время.

Иммунные клетки могут включать популяцию клеток, содержащую Т-клетки. Такими клетками могут быть клетки, полученные от субъекта, например, полученные из образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образца не фракционированных Т-клеток, образца лимфоцитов, образца белых клеток крови, продукта

афереза или продукта лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки, такие как Т-клетки, являются первичными клетками, такими как первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки могут быть отделены или отобраны для обогащения Т-клеток в популяции с использованием способов положительной или отрицательной селекции и обогащения. В некоторых вариантах осуществления, популяция содержит CD4+, CD8+ или CD4+ и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, стадия введения полинуклеотида (например, матричного полинуклеотида) и стадия введения агента (например, Cas9/gRNA RNP) могут происходить одновременно или последовательно в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид вводят одновременно с введением одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение (например, Cas9/gRNA RNP). В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотидную матрицу вводят в иммунные клетки после индукции генетического разрушения на стадии введения агента (например, Cas9/gRNA RNP). В некоторых вариантах осуществления, до, во время и/или после введения полинуклеотидной матрицы и одного или нескольких агентов (например, Cas9/gRNA RNP) клетки культивируют или инкубируют в условиях, стимулирующих рост и/или пролиферацию клеток.

В конкретных вариантах осуществления представленных способов, введение матричного полинуклеотида осуществляют после введения одного или нескольких агентов, способных вызывать генетические разрушения. Можно использовать любой способ введения одного или нескольких агентов, как описано, в зависимости от конкретного агента, используемого для индуцирования генетического разрушения. В некоторых аспектах, разрушение осуществляют путем редактирования гена, например с использованием РНК-управляемой нуклеазы, такой как система кластеризованных регулярных промежуточных коротких палиндромных повторов (CRISPR)-Cas, такая как система CRISPR-Cas9, специфичная для разрушаемого локуса *TGFBR2*. В некоторых аспектах, разрушение осуществляется с помощью системы CRISPR-Cas9, специфичной для локуса *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, агент, содержащий Cas9 и направляющую РНК (нРНК), содержащую таргетирующий домен, который таргетирует область локуса *TGFBR2,* вводят в клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, агент является или содержит рибонуклеопротеиновый (RNP), комплекс cas9 и нРНК, содержащую *TGFBR2*-таргетирующий направляющий домен (cas9/нРНК RNP). В некоторых вариантах осуществления, введение включает контакт агента или его части с клетками in vitro, который может включать культивирование или инкубирование клетки и агента в течение вплоть до 24, 36 или 48 часов или 3, 4, 5, 6, 7 или 8 дней. В некоторых вариантах осуществления, введение дополнительно может включать осуществление доставки агента в клетки. В различных вариантах осуществления, в способах, композициях и клетках по настоящему описанию используют прямую доставку комплексов рибонуклеопротеина (RNP) Cas9 и нРНК в клетки, например, посредством электропорации. В некоторых вариантах осуществления, комплексы RNP содержат нРНК,

которая была модифицирована для включения кэпа 3' поли-А-хвоста и 5' анти-реверсного концевого аналога кэпа (ARCA). В некоторых случаях, электропорация клеток, подлежащих модификации, включает воздействие на них холодового шока, например, при 32°С после электропорации клеток и перед посевом.

В таких аспектах предоставленных способов, полинуклеотид, например матричный полинуклеотид, вводят в клетки после введения с одним или несколькими агентами, такими как Cas9/нРНК RNP, например, который был введен электропорацией. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, например матричный полинуклеотид, вводят сразу после введения одного или нескольких агентов, способных индуцировать генетическое разрушение. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, например матричный полинуклеотид, вводят в клетки в течение точно или примерно 30 секунд, в течение точно или примерно 1 минуты, в течение точно или примерно 2 минут, в течение точно или примерно 3 минут, в течение точно или примерно 4 минут, в течение точно или примерно 5 минут, в течение точно или примерно 6 минут, в течение точно или примерно 6 минут, в течение точно или примерно 8 минут, в течение точно или примерно 9 минут, в течение точно или примерно 10 минут, в течение точно или примерно 15 минут, в течение точно или примерно 20 минут, в течение точно или примерно 30 минут, в течение точно или примерно 40 минут, в течение точно или примерно 50 минут, в течение точно или примерно 60 минут, в течение точно или примерно 90 минут, в течение точно или примерно 2 часов или в течение точно или примерно 3 часов или в течение точно или примерно 4 часов после введения одного или нескольких агентов, способных вызвать генетическое разрушение. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, например, матричный полинуклеотид, вводят в клетки о течение от точно или примерно 15 минут до точно или примерно 4 часов после введения одного или нескольких агентов, например, от точно или примерно 15 минут до точно или примерно 3 часов, от точно или примерно 15 минут до точно или примерно 2 часов, от точно или примерно 15 минут до точно или примерно 1 часа, от точно или примерно 15 минут до точно или примерно 30 минут, от точно или примерно 30 минут до точно или примерно 4 часов, от точно или примерно 30 минут до точно или примерно 3 часов, от точно или примерно 30 минут до точно или примерно 2 часов, от точно или примерно 30 минут до точно или примерно 1 часа, от точно или примерно 1 часа до точно или примерно 4 часов, от точно или примерно 1 часа до точно или примерно 3 часов, от точно или примерно 1 часа до точно или примерно 2 часов, от точно или примерно 2 часов до точно или примерно 4 часов, от точно или примерно 2 часов до точно или примерно 3 часов или от точно или примерно 3 часов до точно или примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, например матричный полинуклеотид, вводят в клетки примерно через точно или примерно 2 часа после введения одного или нескольких агентов, таких как Cas9/нРНК RNP, например, которые были введены электропорацией.

Любой способ введения полинуклеотида, например матричного полинуклеотида, можно использовать, как описано, в зависимости от конкретных способов, используемых

для доставки полинуклеотида, например матричного полинуклеотида, в клетки. Типовые способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе через вирусы, например ретровирусы или лентивирусы, трансдукцию, транспозоны и электропорацию. В конкретных вариантах осуществления, используют способы вирусной трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды можно переносить или вводить в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносятся в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557. В конкретных вариантах осуществления, вирусным вектором является AAV, такой как AAV2 или AAV6.

В некоторых вариантах осуществления, до, во время или после контакта агента с клетками и/или до, во время или после осуществления доставки (например, электропорацией) представленные способы включают инкубацию клеток в присутствии цитокина, стимулирующего агента и/или агента, который способен вызывать пролиферацию, стимуляцию или активацию иммунных клеток (например, Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубации проходит в присутствии стимулирующего агента, который является или содержит антитело, специфичное для CD3, антитело, специфичное для CD28, и/или цитокин, такой как гранулы анти-CD3/анти-CD28. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубации проходит в присутствии цитокина, такого как один или несколько из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15. В некоторых вариантах осуществления, инкубация продолжается до 8 дней до или после введения с одним или несколькими агентами, такими как Cas9/нРНК RNP, например, электропорацией, и матричным полинуклеотидом, например, до 24 часов, 36 часов или 48 часов или 3, 4, 5, 6, 7 или 8 дней.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает активацию или стимуляцию клеток стимулирующим агентом (например, анти-CD3/анти-CD28-антителами) перед введением агента, например Cas9/нРНК RNP, и полинуклеотидной матрицы. В некоторых вариантах осуществления, инкубация в присутствии стимулирующего агента (например, анти-CD3/анти-CD28) составляет от 6 часов до 96 часов, например, от 24 до 48 часов или от 24 до 36 часов до введения с одним или несколькими агентами, такими как Cas9/нРНК RNP, например, электропорацией. В некоторых вариантах осуществления, инкубация со стимулирующими агентами может дополнительно включать присутствие цитокина, такого как один или несколько из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15. В некоторых

вариантах осуществления, инкубацию проводят в присутствии рекомбинантного цитокина, такого как IL-2 (например, от 1 ед/мл до 500 ед/мл, например, от 10 ед/мл до 200 ед/мл, например, по меньшей мере, или примерно 50 Ед/мл или 100 Ед/мл), IL-7 (например, от 0,5 нг/мл до 50 нг/мл, например, от 1 нг/мл до 20 нг/мл, например, по крайней мере, или примерно 5 нг/мл или 10 нг/мл) или IL-15 (например, от 0,1 нг/мл до 50 нг/мл, например от 0,5 до 25 нг/мл, например, по меньшей мере или примерно 1 нг/мл или 5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент (например, анти-CD3/анти-CD28-антитела) промывают или удаляют из клеток перед введением или доставкой в клетки агентов, способных вызывать генетическое разрушение Cas9/нРНК RNP и/или полинуклеотидной матрицы. В некоторых вариантах осуществления, перед введением агентов клеткам дают отдохнуть, например, удалением любого стимулирующего или активирующего агента. В некоторых вариантах осуществления, перед введением агентов стимулирующий или активирующий агент и/или цитокины не удаляют.

В некоторых вариантах осуществления, после введения агентов, например Cas9/нРНК и/или полинуклеотидной матрицы, клетки инкубируют, культивируют или культивируют в присутствии рекомбинантного цитокина, такого как один или несколько из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в присутствии рекомбинантного цитокина, такого как IL-2 (например, от 1 ед/мл до 500 ед/мл, например, от 10 ед/мл до 200 ед/мл, например, по меньшей мере, или примерно 50 ед/мл или 100 ед/мл), IL-7 (например, от 0,5 нг/мл до 50 нг/мл, например, от 1 нг/мл до 20 нг/мл, например, по меньшей мере или примерно 5 нг/мл или 10 нг/мл) или IL-15 (например, от 0,1 нг/мл до 50 нг/мл, например от 0,5 до 25 нг/мл, например, по меньшей мере или примерно 1 нг/мл или 5 нг/мл). Клетки могут быть инкубированы или культивированы в условиях, индуцирующих пролиферацию или размножение клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки могут быть инкубированы или культивированы до тех пор, пока не будет достигнуто пороговое количество клеток для сбора, например терапевтически эффективная доза.

В некоторых вариантах осуществления, инкубация во время любой части процесса или всего процесса может происходить при температуре от 30°C ± 2°C до 39°C ± 2°C, например, по меньшей мере или примерно, по меньшей мере, 30°C ± 2°C, 32°C ± 2°C, 34°C ± 2°C или 37°C ± 2°C. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубации проходит при 30°C ± 2°C и, по меньшей мере, часть инкубации проходит при 37°C ± 2°C.

В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления, позволяют экспрессировать рекомбинантный рецептор под контролем гетерологичных или экзогенных регуляторных или контрольных элементов, например гетерологичного промотора, такого как конститутивный промотор или регулируемый промотор. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления, позволяют экспрессировать рекомбинантный рецептор под контролем эндогенных регуляторных элементов *TGFBR2*. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления,

позволяют нуклеиновым кислотам, кодирующим рекомбинантный рецептор, быть функционально связанными с эндогенными регуляторными или контрольными элементами, например, цис-регуляторными элементами, такими как промотор, или 5' и/или 3' нетранслируемыми областями (UTR) эндогенного локуса *TGFBR2*. Таким образом, в некоторых аспектах, представленные варианты осуществления, позволяют экспрессировать рекомбинантный рецептор, например CAR, и/или регулировать экспрессию на уровне, аналогичном эндогенному *TGFBR2*.

Типовые способы осуществления генетического разрушения в эндогенном локусе *TGFBR2* и/или проведения HDR для таргетной интеграции трансгенных последовательностей, таких как часть рекомбинантного или химерного рецептора, в локус *TGFBR2,* описаны в следующих подразделах.

А. Генетическое разрушение

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько таргетных генетических нарушений индуцируются в эндогенном локусе *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько таргетных генетических нарушений индуцируются в одном или нескольких сайтах-мишенях в эндогенном локусе *TGFBR2* или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления, таргетное генетическое разрушение индуцируется в экзоне эндогенного локуса *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, таргетное генетическое разрушение индуцируется в интроне эндогенного локуса *TGFBR2*. В некоторых аспектах, присутствие одного или нескольких таргетных генетических нарушений и полинуклеотида, например, матричного полинуклеотида, который содержит трансгенные последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть, может привести к таргетной интеграции трансгенных последовательностей в или рядом с одним или несколькими генетическими разрушениями (например, сайтом-мишенью) в эндогенном локусе *TGFBR2*.

В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение приводит к разрыву ДНК, такому как двухцепочечный разрыв (DSB) или расщепление, или разрыву, например, одноцепочечному разрыву (SSB), в одном или нескольких сайтах-мишенях в геноме. В некоторых вариантах осуществления, в месте генетического нарушения, например, разрыва или одноцепочечного разрыва ДНК, действие механизмов репарации клеточной ДНК может приводить к нокауту, вставке, миссенс-мутации или мутации со сдвигом рамки считывания, такой как биаллельная мутация со сдвигом рамки считывания, делеция всего или части гена; или, в присутствии матрицы репарации, например, полинуклеотидной матрицы, может изменять последовательность ДНК на основе матрицы репарации, такой как интеграция или вставка последовательностей нуклеиновых кислот, таких как трансген, кодирующий весь рекомбинантный белок или его часть, содержащийся в матрице. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение может быть направлено на один или несколько экзонов гена или его части. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение может быть направлено рядом с желаемым сайтом таргетной интеграции экзогенных последовательностей, например, трансгенных

последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления, ДНК-связывающий белок или ДНК-связывающая нуклеиновая кислота, которая специфически связывается с или гибридизуется с последовательностями ними в области рядом с одним из, по меньшей мере, одного сайта-мишени, используется для таргетного разрушения. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды, например матричные полинуклеотиды, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, такие как трансген, кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть, и гомологические последовательности, могут быть введены для таргетной интеграции посредством HDR последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор, в или рядом с сайтом генетического разрушения, как описано в настоящем документе, например, в разделе I.B.

В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение осуществляется путем введения одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение. В некоторых вариантах осуществления, такие агенты содержат ДНК-связывающий белок или ДНК-связывающую нуклеиновую кислоту, которая специфически связывается с геном или гибридизуется с ним. В некоторых вариантах осуществления, агент содержит различные компоненты, такие как слитый белок, содержащий ДНК-таргетирующий белок и нуклеазу или нуклеазу, управляемую РНК. В некоторых вариантах осуществления, агенты могут таргетировать один или несколько сайтов-мишеней или локаций-мишеней. В некоторых аспектах, может быть создана пара однонитевых разрывов (например, ников) на каждой стороне сайта-мишени.

В представленных вариантах осуществления, термин «введение» охватывает множество способов введения нуклеиновой кислоты и/или белка, такого как ДНК, в клетку, либо in vitro, либо in vivo, где такие способы включают трансформацию, трансдукцию, трансфекцию (например, электропорацию) и инфекцию. Векторы используют для введения молекул, кодирующих ДНК, в клетки. Возможные векторы содержат плазмидные векторы и вирусные векторы. Вирусные векторы содержат ретровирусные векторы, лентивирусные векторы или другие векторы, такие как аденовирусные векторы или аденоассоциированные векторы. Способы, такие, как электропорация, также можно использовать для введения или доставки белков или рибонуклеопротеина (RNP), например, содержащих белок Cas9 в комплексе с нРНК-мишенью, в представляющие интерес клетки.

В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение происходит в сайте-мишени (также известном как «положение-мишень», «последовательность ДНК-мишень» или «локация-мишень»), например, в эндогенном локусе *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень содержит сайт на ДНК-мишени (например, геномной ДНК), который модифицирован одним или несколькими агентами, способными вызывать генетическое разрушение, например, молекулой Cas9 в комплексе с нРНК, которая определяет сайт-мишень. Например, сайт-мишень может включать локации в ДНК на эндогенном локусе *TGFBR2,* где происходит расщепление или разрывы ДНК. В некоторых аспектах, интеграция последовательностей нуклеиновых кислот, таких как

трансген, кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть, посредством HDR может происходить на или рядом с сайтом-мишенью или последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень может быть сайтом между двумя нуклеотидами, например соседними нуклеотидами, на ДНК, в которую добавлен один или несколько нуклеотидов. Сайт-мишень может содержать один или несколько нуклеотидов, которые изменяются матричным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень находится внутри последовательности-мишени (например, последовательности, с которой связывается нРНК). В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень находится выше или ниже последовательности-мишени.

1. Сайт-мишень на эндогенном локусе TGFBR2

В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение и/или интеграция трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор, или его части посредством репарации, направляемой гомологией (HDR), таргетированы на эндогенном или геномном локусе, который кодирует тип рецептора трансформирующего ростового фактора бета. II (также известный как TGFBRII, *TGFBR2,* TGFR-2, TGFβ-RII, TGFбета-RII, TBR-ii, TBRII, AAT3, FAA3, LDS1B, LDS2, LDS2B, MFS2, RIIC или TAAD2).

У человека TGFBRII кодирован геном рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2).* В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение и интеграция трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор, таргетированы на локусе *TGFBR2* человека посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). В некоторых аспектах, генетическое разрушение таргетировано на сайте-мишени в локусе *TGFBR2,* содержащем открытую рамку считывания, кодирующую TGFBRII, так что таргетная интеграция или вставка трансгенных последовательностей происходит на или рядом с сайтом генетического разрушения в локусе *TGFBR2.* В некоторых аспектах, генетическое разрушение таргетировано на или рядом с экзоном открытой рамки считывания, кодирующей TGFBRII. В некоторых аспектах, генетическое разрушение таргетировано на или рядом с интроном открытой рамки считывания, кодирующей TGFBRII.

TGFBRII является трансмембранным белком, который является членом семейства серин/треониновых протеинкиназ и подсемейства рецепторов TGFB. TGFBRII образует гетеродимерный комплекс с серин/треонинкиназным рецептором TGF-бета типа I (TGFBRI), не неизбирательным рецептором для цитокинов трансформирующего ростового фактора бета (TGFβ) TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3 для передачи сигналов от различных цитокинов и регулирования различных физиологических и патологических процессов, включая остановку клеточного цикла в эпителиальных и гемопоэтических клетках, контроль пролиферации и дифференциации мезенхимальных клеток, заживление ран, образование внеклеточного матрикса, иммунодепрессию и канцерогенез (см., например, Yang et al., Trends Immunol. (2010) 31(6): 220-227; Oh et al., J Immunol. (2013) 191(8): 3973-3979; Principe et al., Cancer Res. (2016) 76(9): 2525-2539).

В некоторых аспектах, TGFβ синтезирован в латентной форме и активируется, чтобы

позволить образование тетрамерного рецепторного комплекса с TGFβ рецепторами TGFBRI и TGFBRII. В некоторых аспектах, образование рецепторного комплекса, состоящего из двух молекул TGFBRI и двух молекул TGFBRII, симметрично связанных с димером цитокина, вызывает фосфорилирование и активацию TGFBRI через конститутивно активный TGFBRII. В некоторых случаях, таких как канонические SMAD-зависимые пути передачи сигналов TGFβ, активированный TGFBRI фосфорилирует матерей против декапентаплегического гомолога 2 (SMAD2), который диссоциирует от рецептора и взаимодействует со SMAD4. Комплекс SMAD2-SMAD4 затем перемещается в ядро, где он модулирует транскрипцию генов, регулируемых TGFβ. В некоторых аспектах, TGFBRII также может быть вовлечен в не канонические, SMAD-независимые сигнальные пути TGFβ.

В контексте опухоли или рака, TGFβ может способствовать развитию опухолей, например, за счет нарушения регуляции ингибиторов циклин-зависимых киназ, изменения архитектуры цитоскелета, увеличения протеаз и образования внеклеточного матрикса, снижения иммунного надзора и повышенного ангиогенеза.

В некоторых аспектах, TGFβ может контролировать иммунные ответы и поддерживать иммунный гомеостаз за счет своего воздействия на пролиферацию, дифференциацию и выживание множественных линий иммунных клеток. В некоторых аспектах, TGFβ1 является первичной изоформой, экспрессируемой в иммунной системе, и обладает широкой регуляторной активностью, влияющей на несколько типов иммунных клеток. В некоторых случаях, например, в Т-клетках, связывание TGFβ с TGFBRII может подавлять, ингибировать или препятствовать активации, пролиферации и дифференциации Т-клеток. TGFβ также может контролировать иммунную толерантность благодаря своему влиянию на Т-клетки. Для иммунных клеток, которые могут присутствовать в микросреде опухоли (TME), TGFβ может оказывать неблагоприятное воздействие на противоопухолевый иммунитет и значительно ингибировать иммунный надзор за опухолью. Например, у трансгенных мышей, которые экспрессируют доминантно-негативный TGFBRII под Т-клеточно-специфическим промотором, наблюдали спонтанная дифференциацию Т-клеток и аутоиммунное заболевание (см., например, Gorelik et al., Nat. Rev. Immunol. (2002) 2(1):46-53). В некоторых аспектах, TGFβ может напрямую подавлять цитотоксическую активность цитотоксических Т-лимфоцитов, в некоторых случаях посредством транскрипционной репрессии генов, кодирующих несколько ключевых молекул, таких как перфорин, гранзимы и цитотоксины. В некоторых аспектах, TGFβ регулирует размножением клонов и цитотоксическую активность CD8+ Т-клеток, что затем может приводить к прогрессированию опухоли или ее продвижению. В некоторых аспектах, TGFβ также оказывает значительное влияние на дифференциацию и функцию CD4+ Т-клеток и способствует образованию регуляторных Т-клеток (Treg) и клеток Th17 (см., например, Principe et al., Cancer Res. (2016) 76(9): 2525-2539). В некоторых аспектах, поскольку TGFβ в контексте опухоли способствует прогрессированию опухоли и может обладать иммунодепрессивной активностью, снижение, ингибирование или удаление

компонентов передачи сигнала TGFβ, например рецепторов TGFβ, может улучшать дифференциацию, функцию и жизнеспособность Т-клеток.

В некоторых аспектах, TGFβ вовлечен в различные аспекты канцерогенеза. В некоторых случаях, нарушение передачи сигналов TGFβ часто связано с прогрессированием рака в плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC). В некоторых случаях, уменьшение или полная потеря TGFBRII наблюдается примерно в 30-87% HNSCC человека. В некоторых аспектах, сообщалось о потере экспрессии Smad4 (22% - 51%) и Smad2 (14% - 38%) при HNSCC человека. В некоторых аспектах, передача сигналов TGFβ также может быть вовлечена в прогрессирование опухоли через потерю адгезии эпителиальных клеток, ремоделирование внеклеточного матрикса и усиленный ангиогенез, например, что приводит к стимулированию эпителиально-мезенхимального перехода. В некоторых случаях, уровень TGFβ повышен в образцах HNSCC, например, в 1,5-7,5 раз по сравнению с нормальными тканями; и уровни TGFβ увеличиваются в 1,5-5,3 раза в 44% образцов тканей с соседней HNSCC.

Типовая полипептидная последовательность предшественника TGFBRII человека представлена в SEQ ID NO: 59 (изоформа 1; зрелый полипептид содержит остатки 23-567 SEQ ID NO: 59; см. номер доступа Uniprot P37173-1; эталонная последовательность NCBI: NP_003233.4; последовательность иРНК, указана в SEQ ID NO: 61, эталонная последовательность NCBI: NM_003242.5) или SEQ ID NO: 60 (изоформа 2; зрелый полипептид содержит остатки 23-592 SEQ ID NO: 60; см. номер доступа Uniprot P37173-2; эталонная последовательность NCBI: NP_001020018.1; последовательность иРНК, указана в SEQ ID NO: 62, эталонная последовательность NCBI: NM_001024847.2). Две изоформы получают путем альтернативного сплайсинга.

Типовой зрелый TGFBRII содержит внеклеточную область (включая аминокислотные остатки 22-166 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 1), указанной в SEQ ID NO: 59, или аминокислотные остатки 22-191 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 2), указанной в SEQ ID NO: 60), трансмембранную область (включая аминокислотные остатки 167-187 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 1), указанной в SEQ ID NO: 59, или аминокислотные остатки 192-212 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 2), указанной в SEQ ID NO: 60), и внутриклеточную область (включая аминокислотные остатки 188-567 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 1), указанной в SEQ ID NO: 59, или аминокислотные остатки 213-592 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 2), указанной в SEQ ID NO: 60). TGFBRII содержит каталитический домен серинтреонин/тирозинпротеинкиназы на аминокислотных остатках 244-544 последовательности-предшественника TGFBRII человека (изоформа 1), указанной в SEQ ID NO: 59, или в аминокислотных остатках 269-569 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 2), указанной в SEQ ID NO: 60. У людей типовой геномный локус, кодирующий TGFBRII, *TGFBR2,* содержит открытую рамку считывания, которая

содержит 7 экзонов и 6 интронов для варианта транскрипта, кодирующего изоформу 1, или 8 экзонов и 7 интронов для варианта транскрипта, кодирующего изоформу 2.

Типовой транскрипт иРНК, кодирующий изоформу 1 *TGFBR2*, может охватывать последовательность, соответствующую хромосоме 3: 30606502-30694134 на прямой цепи, со ссылкой на версию генома человека GRCh38 (UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly). В **таблице 1** представлены координаты экзонов и интронов открытых рамок считывания и нетранслируемых областей транскрипта, кодирующего изоформу 1 типового локуса *TGFBR2* человека.

Таблица 1. Координаты экзонов и интронов типового локуса *TGFBR2* человека, изоформа 1 (GRCh38, хромосома 3, прямая цепь).

	Начало (GrCh38)	**Конец (GrCh38)**	**Длина**
5 'UTR и экзон 1	30606502	30606977	476
Интрон 1-2	30606978	30644746	37769
Экзон 2	30644747	30644915	169
Интрон 2-3	30644916	30650269	5354
Экзон 3	30650270	30650460	191
Интрон 3-4	30650461	30671637	21177
Экзон 4	30671638	30672437	800
Интрон 4-5	30672438	30674104	1667
Экзон 5	30674105	30674246	142
Интрон 5-6	30674247	30688383	14137
Экзон 6	30688384	30688511	128
Интрон 6-7	30688512	30691419	2908
Экзон 7 и 3 'UTR	30691420	30694134	2715

Типовой транскрипт иРНК, кодирующей изоформу 2 *TGFBR2*, может охватывать последовательность, соответствующую хромосоме 3: 30606601-30694142 на прямой цепи, со ссылкой на версию генома человека GRCh38 (UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly). **В таблице 2** представлены координаты экзонов и интронов открытых рамок считывания и нетранслируемых областей транскрипта, кодирующего изоформу 2 типового локуса *TGFBR2* человека.

Таблица 2. Координаты экзонов и интронов типового локуса *TGFBR2* человека, изоформа 2 (GRCh38, хромосома 3, прямая цепь).

	Начало (GrCh38)	**Конец (GrCh38)**	**Длина**
5 'UTR и экзон 1	30606601	30606977	377
Интрон 1-2	30606978	30623198	16221
Экзон 2	30623199	30623273	75

	Начало (GrCh38)	**Конец (GrCh38)**	**Длина**
Интрон 2-3	30623274	30644746	21,473
Экзон 3	30644747	30644915	169
Интрон 3-4	30644916	30650269	5354
Экзон 4	30650270	30650460	191
Интрон 4-5	30650461	30671637	21177
Экзон 5	30671638	30672437	800
Интрон 5-6	30672438	30674104	1667
Экзон 6	30674105	30674246	142
Интрон 6-7	30674247	30688383	14137
Экзон 7	30688384	30688511	128
Интрон 7-8	30688512	30691419	2908
Экзон 8 и 3 'UTR	30691420	30694142	2723

В некоторых аспектах, трансген (например, последовательности экзогенной нуклеиновой кислоты) в матричном полинуклеотиде могут применяться для определения местоположения сайтов-мишеней и/или плеч гомологии. В некоторых аспектах, сайт-мишень генетического разрушения может использоваться в качестве направляющей для создания матричных полинуклеотидов и/или плеч гомологии, используемых для HDR. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение может быть таргетировано рядом с желаемым сайтом таргетной интеграции трансгенных последовательностей (например, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть). В некоторых аспектах, генетическое разрушение таргетировано так, что при интеграции трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор, экспрессия эндогенного гена *TGFBR2* снижается или элиминируется. В некоторых аспектах, генетическое разрушение таргетировано так, что при интеграции трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор, экспрессируемая часть эндогенного гена *TGFBR2* кодирует доминантно-негативную форму TGFBRII и/или не функциональную форму TGFBRII.

В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение таргетировано на, рядом с или внутри локуса *TGFBR2*. В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение таргетировано на, рядом с или внутри открытой рамки считывания локуса *TGFBR2* (как описано в **таблицах 1** и **2** в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение таргетировано на, рядом с или внутри открытой рамки считывания, которая кодирует константный домен TCRα. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение таргетировано на, рядом с или внутри локуса *TGFBR2* (например, как описано в **таблицах 1** и **2** в настоящем документе) или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичность последовательности ко всей или части, например,

не менее 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 или 4000 непрерывных нуклеотидов локуса *TGFBR2* (так, как описано в **таблицах 1** и **2** в настоящем документе).

В некоторых аспектах, сайт-мишень находится в экзоне открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2.* В некоторых аспектах, сайт-мишень находится внутри интрона открытой рамки считывания локуса *TGFBR2.* В некоторых аспектах, сайт-мишень находится внутри регуляторного или контрольного элемента, например промотора, 5' нетранслируемой области (UTR) или 3' UTR локуса *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень находится в последовательности геномной области *TGFBR2,* описанного в **таблицах 1** и **2** в настоящем документе, или в любом экзоне или интроне последовательности геномной области *TGFBR2,* содержащейся в нем.

В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень для генетического разрушения выбран таким образом, что после интеграции трансгенных последовательностей в клетке нокаутируется, снижается и/или элиминируется экспрессия из эндогенного локуса *TGFBR2.*

В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение, например разрыв ДНК, таргетировано в экзоне локуса *TGFBR2* или его открытой рамке считывания. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение находится в первом экзоне, втором экзоне, третьем экзоне или четвертом экзоне локуса *TGFBR2* или его открытой рамки считывания. В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение находится в первом экзоне локуса *TGFBR2* или его открытой рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение находится в пределах 500 пар оснований (по) ниже 5' конца первого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания. В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение находится между 5' нуклеотидом экзона 1 и выше 3' нуклеотида экзона 1. В некоторых вариантах генетическое разрушение находится в пределах 400 по, 350 по, 300 по, 250 по, 200 по, 150 по, 100 по или 50 по ниже 5' конца первого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания. В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение находится между 1 по и 400 по, между 50 по и 300 по, между 100 п и 200 по или между 100 по до 150 по ниже 5' конца первого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение находится между 100 по и 150 по ниже 5' конца первого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания, включительно.

В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение таргетировано в четвертом экзоне локуса *TGFBR2* или открытой рамке считывания транскрипта, кодирующего изоформу 1 типового локуса *TGFBR2* человека (например, описанного в **Таблице 1** или **2** в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение находится в пределах 500 пар оснований (по) ниже 5' конца четвертого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания. В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение находится между 5' нуклеотидом экзона 4 и перед 3' нуклеотидом экзона 4. В некоторых вариантах генетическое разрушение находится в пределах 400 по, 350 по, 300 по, 250 по, 200 по, 150 по, 100 по или 50 по ниже

5' конца четвертого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания. В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение составляет от 1 по до 400 по, от 50 по до 300 по, от 100 по до 200 по или от 100 по до 150 по ниже 5' конца четвертого экзона в локусе *TGFBR2* или открытой рамки считывания, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение находится между 100 по и 150 по ниже 5' конца четвертого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания, включительно.

В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение таргетировано в пятом экзоне локуса *TGFBR2* или открытой рамке считывания транскрипта, кодирующего изоформу 2 типового локуса *TGFBR2* человека (как описано в **Таблице 2** в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение находится в пределах 500 пар оснований (по) ниже 5' конца пятого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания. В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение находится между 5' нуклеотидом экзона 5 и перед 3' нуклеотидом экзона 5. В некоторых вариантах генетическое разрушение находится в пределах 400 по, 350 по, 300 по, 250 по, 200 по, 150 по, 100 по или 50 по ниже 5' конца пятого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания. В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение составляет от 1 по до 400 по, от 50 по до 300 по, от 100 по до 200 по или от 100 по до 150 по ниже 5' конца пятого экзона в локусе *TGFBR2* или открытой рамки считывания, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение находится между 100 по и 150 по ниже 5' конца пятого экзона в локусе *TGFBR2* или его открытой рамке считывания, включительно.

В некоторых аспектах, сайт-мишень находится внутри экзона, такого как экзоны, соответствующие ранним кодирующим областям. В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень находится в пределах или в непосредственной близости от экзонов, соответствующих ранней кодирующей области, например экзона 1, 2, 3, 4 или 5 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2* (такого, как описан в **таблицах 1** и **2** в настоящем документе), или включая последовательность, следующую сразу за сайтом начала транскрипции, в экзоне 1, 2, 3, 4 или 5, или в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по экзона 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых аспектах, сайт-мишень находится на или рядом с экзоном 1 эндогенного локуса *TGFBR2,* например, в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по экзона 1. В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень находится на или рядом с экзоном 2 эндогенного локуса *TGFBR2* или в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по экзона 2. В некоторых аспектах, сайт-мишень находится на или рядом с экзоном 3 эндогенного локуса *TGFBR2,* например, в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по экзона 3. В некоторых аспектах, сайт-мишень находится на или рядом с экзоном 4 эндогенного локуса *TGFBR2,* например, в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по экзона 4. В некоторых аспектах, сайт-мишень находится на или рядом с экзоном 5 эндогенного локуса *TGFBR2,* например, в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300,

250, 200, 150, 100 или 50 по экзона 5. В некоторых аспектах, сайт-мишень находится внутри регуляторного или контрольного элемента, например, промотора локуса *TGFBR2.*

В некоторых аспектах, сайт-мишень выбран таким образом, что таргетная интеграция трансгена создает эндогенный локус *TGFBR2,* который кодирует доминантно-негативную (DN) форму *TGFBR2.* В некоторых аспектах, доминантно-негативная форма TGFBRII содержит вариант TGFBRII, который при экспрессии в клетке может ингибировать, снижать или препятствовать передаче сигнала рецепторным комплексом TGFβ. В некоторых аспектах, типовая доминантно-негативная форма TGFBRII содержит усеченный TGFBRII, такой как TGFBRII, в котором отсутствует весь или часть цитоплазматического домена. В некоторых вариантах осуществления, доминантно-негативный TGFBRII включает такие, которые описаны, например, в Wieser et al., (1993) Mol. Cell Biol. 13(12): 7239-7247; Brand et al., (1995) JBC 270: 8274-8284; Bottinger et al., (1997) EMBO J 16(10): 2621-2633; Shah et al., (2002) Cancer Res 62:7135-7138; Bollard et al. (2002) Gene Therapy 99(9): 3179-87; и Zhang et al., (2013) *Gene Therapy* 20: 575-580; и Pang et al. (2013) Cancer Discov. 3(8): 936-951.

В некоторых аспектах, типовая доминантно-негативная форма TGFBRII содержит TGFBRII, содержащий делецию одного или нескольких аминокислотных остатков, необязательно одного или нескольких непрерывных аминокислотных остатков во внутриклеточной области TGFBRII, например, включая аминокислотные остатки 188-567 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 1), представленной в SEQ ID NO: 59, или аминокислотных остатков 213-592 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 2), представленной в SEQ ID NO: 60. В некоторых аспектах, типовая доминантно-негативная форма TGFBRII содержит аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-191 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 59, или аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-216 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 60, или последовательности, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с ним или его фрагментом.

В некоторых аспектах, сайт-мишень размещен в или рядом с началом последовательностей эндогенной открытой рамки считывания, кодирующих внутриклеточные области TGFBRII, например, аминокислотные остатки 188-567 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 1), указанного в SEQ ID NO: 59, или аминокислотные остатки 213-592 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 2), указанного в SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень расположен в экзоне 4 открытой рамки считывания транскрипта, кодирующего изоформу 1 типового локуса *TGFBR2* человека (как описано в **Таблице 1** в настоящем документе), или после, ниже или через 3 'экзона 4 открытой рамки считывания транскрипта, кодирующего изоформу 1 типового локуса *TGFBR2* человека (как описано в **Таблице 1** в настоящем документе), или на или рядом с экзоном 5 открытой

рамки считывания изоформы 2, кодирующей транскрипт типового локуса *TGFBR2* человека (как описано в **Таблице 2** в настоящем документе) или после, ниже или через 3' экзона 5 открытой рамки считывания транскрипта, кодирующего изоформу 2 типового локуса *TGFBR2* человека (как описано в **Таблице 2** в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, при введении генетического нарушения в сайт-мишень и таргетной интеграции трансгенных последовательностей, например, трансгенных последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть, кодированный полипептид будет включать часть полипептида TGFBRII, который является доминантно-негативной формой TGFBRII, и рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, при введении генетического нарушения в сайт-мишень и таргетной интеграции трансгенных последовательностей, например, трансгенных последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть и содержащих элемент проскока рибосомы, такой как элемент 2A, кодированный полипептид будет включать часть полипептида TGFBRII, которая является доминантно-негативной формой TGFBRII, последовательность проскока рибосомы и рекомбинантный рецептор. Таким образом, при проскоке рибосомы и/или саморасщеплении кодированный полипептид будет создавать доминантно-негативную форму TGFBRII и рекомбинантный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение таргетировано на, рядом с или внутри локуса *TGFBR2*. В конкретных вариантах осуществления, генетическое разрушение таргетировано на, рядом с или внутри открытой рамки считывания локуса *TGFBR2* (например, как описано в **Таблицах 1** или **2** в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение таргетировано на, рядом с или внутри открытой рамки считывания, которая кодирует *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, генетическое таргетировано на, рядом с или внутри локуса *TGFBR2* (например, как описано в **Таблице 1** или **2** в настоящем документе) или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичность последовательности ко всей или части, например, не менее 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 или 4000 непрерывных нуклеотидов локуса *TGFBR2* (так, как описано в **таблицах 1** или **2** в настоящем документе).

2. Способы генетического разрушения

В некоторых аспектах, способы создания генетически сконструированных клеток включает введение генетического разрушения в один или несколько сайтов-мишеней, например, один или несколько сайтов-мишеней в локусе *TGFBR2*. Способы создания генетического разрушения, включая описанные в настоящем документе, могут включать использование одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение, таких как инженерные системы, вызывающие генетическое разрушение, расщепление и/или двухцепочечный разрыв. (DSB) или ник (например, одноцепочечный разрыв (SSB)) в сайте-мишени или положении-мишени в эндогенной или геномной ДНК, так что репарация разрыва процессом, вызванным ошибкой, таким как негомологичное соединение концов (NHEJ) или репарация с помощью HDR с использованием матрицы

репарации может привести к вставке вызывающей интерес последовательности (например, экзогенных последовательностей нуклеиновых кислот или трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор или его часть) на или рядом с сайтом-мишенью или положением-мишенью. Также предоставлены один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение, для использования в способах, представленных в настоящем документе. В некоторых аспектах, один или несколько агентов могут использоваться в комбинации с матричными нуклеотидами, представленными в настоящем документе, для таргетной интеграции трансгенных последовательностей, опосредованной репарацией, направляемой гомологией (HDR).

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение, содержат ДНК-связывающий белок или ДНК-связывающую нуклеиновую кислоту, которая специфически связывается или гибридизуется с конкретным сайтом или положением в геноме, например, с сайтом-мишенью или положением-мишенью. В некоторых аспектах, таргетное генетическое разрушение, например разрыв или расщепление ДНК, в эндогенном локусе *TGFBR2* достигается с использованием белка или нуклеиновой кислоты, сопряженной с или образующей комплекс с нуклеазой, редактирующей ген, например, в химерном или слитом белке. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение, содержит нуклеазу, управляемую РНК, или слитый белок, содержащий ДНК-таргетный белок и нуклеазу.

В некоторых вариантах осуществления, агент содержит различные компоненты, такие как нуклеаза, управляемая РНК, или слитый белок, содержащий ДНК-таргетный белок и нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления, таргетное генетическое разрушение осуществляют с использованием ДНК-таргетной молекулы, которая содержит ДНК-связывающий белок, такой как один или несколько белков «цинковые пальцы» (ZFP) или эффекторов, подобных активатору транскрипции (TALE), слитых с нуклеазой, такой как эндонуклеаза. В некоторых вариантах осуществления, таргетное генетическое разрушение осуществляется с использованием нуклеаз, управляемых РНК, таких как система ассоциированной с кластеризованными регулярными промежуточными короткими палиндромными повторами (CRISPR) нуклеазы (Cas), (включая Cas и/или Cfp1). В некоторых вариантах осуществления, таргетное генетическое разрушение осуществляют с использованием агентов, способных вызывать генетическое разрушение, таких как сиквенс-специфичные или таргетные нуклеазы, включая ДНК-связывающие таргетные нуклеазы и нуклеазы редактирования генов, такие как цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) и нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), и нуклеазы, управляемые РНК, такие как система CRISPR-ассоциированных нуклеаз (Cas), специально разработанная для таргетирования, по меньшей мере, на один сайт-мишень, последовательность гена или ее часть. Примеры ZFN, TALE и TALEN описаны, например, в Lloyd *et al.,* Frontiers in Immunology, 4(221): 1-7 (2013).

Белки «цинковые пальцы» (ZFP), эффекторы, подобные активаторам транскрипции

(TALE), и связывающие домены CRISPR системы могут быть «сконструированы» для связывания с заранее определенной нуклеотидной последовательностью, например, посредством конструирования (изменения одной или нескольких аминокислот) области распознающей встречающегося в природе белка ZFP или TALE. Сконструированные ДНК-связывающие белки (ZFP или TALE) являются белками, не встречающимися в природе. Рациональные критерии для дизайна включают применение правил замещения и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих дизайнах ZFP и/или TALE и данные связывания. См., *например,* патенты США №№ 6,140,081; 6,453,242; и 6,534,261; см. также WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496 и публикация США № 20110301073.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов специфически нацелены на, по меньшей мере, один сайт-мишень на или рядом с локусом *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, агент содержит ZFN, TALEN или комбинацию CRISPR/Cas9, которая специфически связывается, распознает или гибридизуется с сайтом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, система CRISPR/Cas9 содержит сконструированную крРНК/tracrРНК («единую направляющую РНК») для управления специфическим расщеплением. В некоторых вариантах осуществления, агент содержит нуклеазы на основе системы Argonaute (например, из *T. thermophilus,* известного как «TtAgo» (Swarts et al., (2014) Nature 507(7491): 258-261). Таргетное расщепление с использованием любой описанных в настоящем документе нуклеазных систем можно использовать для вставки последовательностей нуклеиновых кислот, например, трансгенных последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть, в конкретную локацию-мишень на эндогенном локусе *TGFBR2* с использованием процессов, опосредованных HDR или NHEJ.

В некоторых вариантах осуществления, «ДНК-связывающим белком «цинковый палец» (или связывающим доменом) является белок или домен в более крупном белке, который связывает ДНК сиквенс-специфическим образом через один или несколько цинковых пальцев, которые являются областями аминокислотной последовательности в связывающем домене, структура которого стабилизируется за счет координации иона цинка. Термин связывающий ДНК белок «цинковый палец» часто сокращается как белок «цинковый палец» или ZFP. Среди ZFP есть искусственные домены ZFP, таргетирующие специфические последовательности ДНК, обычно длиной 9-18 нуклеотидов, созданные сборкой отдельных пальцев. ZFP включают такие, в которых домен с одним пальцем имеет длину приблизительно 30 аминокислот и содержит альфа-спираль, содержащую два инвариантных гистидиновых остатка, координированных через цинк с двумя цистеинами одного бета изгиба, и имеющих два, три, четыре, пять или шесть пальцев. Как правило, сиквенс-специфичность ZFP может быть изменена путем выполнения аминокислотных замен в четырех положениях спирали (-1, 2, 3 и 6) на распознающей спирали цинкового пальца. Таким образом, например, ZFP или молекула, содержащая ZFP, не существует в

природе, *например,* сконструирована так, чтобы связываться с выбранным сайтом-мишенью.

В некоторых случаях ДНК-таргетная молекула является или содержит цинк-пальцевый ДНК-связывающий домен, слитый с доменом расщепления ДНК с образованием цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN). Например, слитые белки содержат домен расщепления (или полудомен расщепления), по меньшей мере, из одного рестрикционного фермента типа IIS и одного или нескольких цинк-пальцевых связывающих доменов, которые могут или не могут быть сконструированы. В некоторых случаях, домен расщепления происходит от рестрикционной эндонуклеазы типа IIS FokI, которая обычно катализирует двухцепочечное расщепление ДНК, на 9 нуклеотидах от ее сайта распознавания на одной цепи и 13 нуклеотидах от ее сайта распознавания на другой. См., *например,* патенты США №№ 5,356,802; 5,436,150 и 5,487,994; Li *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim *et al.* (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim *et al.* (1994b) J. Biol. Chem. 269: 978-982. Некоторые ген-специфические сконструированные цинковые пальцы доступны коммерчески. Например, доступна платформа под названием CompoZr для конструирования цинковых пальцев, которая обеспечивает специфически таргетированные цинковые пальцы для тысяч целей. См., *например,* Gaj *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7), 397-405. В некоторых случаях используют коммерчески доступные цинковые пальцы или изготовленные по индивидуальному заказу.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько сайтов-мишеней, например, в локусе *TGFBR2,* могут быть таргетированы для генетического разрушения сконструированными ZFN. Типовые ZFN, которые таргетируют эндогенный локус *TGFBR2,* включают такие, которые кодированы плазмидами, описанными, например, в NCBI № доступа NM_029575.3 или NM_031132.

Эффектором, подобным активатору транскрипции (TALE), являются белками из видов бактерий. *Xanthomonas,* содержащими множество повторяющихся последовательностей, каждый из которых содержит ди-остатки в положениях 12 и 13 (RVD), которые специфичны для каждого нуклеотидного основания нуклеиновой кислоты последовательности-мишени. Связывающие домены со сходными модульными свойствами связывания нуклеиновых кислот основание к основанию (MBBBD) также могут быть получены из разных видов бактерий. Новые модульные белки обладают тем преимуществом, что демонстрируют большую вариабельность последовательностей, чем повторы TAL. В некоторых вариантах осуществления, RVD, связанные с распознаванием различных нуклеотидов, являются HD для распознавания C, NG для распознавания T, NI для распознавания A, NN для распознавания G или A, NS для распознавания A, C, G или T, HG для распознавания T, IG для распознавания T, NK для распознавания G, HA для распознавания C, ND для распознавания C, HI для распознавания C, HN для распознавания G, NA для распознавания G, SN для распознавания G или A и YG для распознавания T, TL для распознавания A, VT для распознавания A или G и SW для распознавания A. В

некоторых вариантах осуществления, критические аминокислоты 12 и 13 могут быть мутированы в направлении других аминокислотных остатков, чтобы модулировать их специфичность в отношении нуклеотидов A, T, C и G и, в частности, чтобы усилить эту специфичность.

В некоторых вариантах осуществления, «ДНК-связывающий домен TALE» или «TALE» является полипептидом, содержащим один или несколько повторяющихся доменов/единиц TALE. Повторяющиеся домены, каждый из которых содержит повторяющийся переменный ди-остаток (RVD), вовлечены в связывание TALE с его родственной последовательностью ДНК-мишенью. Одна «повторяющаяся единица» (также называемая «повтором») обычно имеет длину 33-35 аминокислот и демонстрирует, по меньшей мере, некоторую гомологию последовательности с другими повторяющимися последовательностями TALE в пределах встречающегося в природе белка TALE. Белки TALE могут быть созданы для связывания с сайтом-мишенью с использованием канонических или не канонических RVD в повторяющихся единицах. См., например, патенты США №№ 8,586,526 и 9,458,205.

В некоторых вариантах осуществления, «TALE-нуклеаза» (TALEN) является слитым белком, содержащим домен связывания нуклеиновой кислоты, обычно полученный из эффектора, подобного активатору транскрипции (TALE), и каталитический домен нуклеазы, который расщепляет последовательность нуклеиновой кислоты-мишень. Каталитический домен содержит нуклеазный домен или домен, обладающий эндонуклеазной активностью, такой как, например, I-TevI, ColE7, NucA и Fok-I. В конкретном варианте осуществления, домен TALE может быть слит с мегануклеазой, такой как, например, I-CreI и I-OnuI или их функциональным вариантом. В некоторых вариантах осуществления, TALEN является мономерная TALEN. Мономерной TALEN является TALEN, который не требует димеризации для специфического распознавания и расщепления, такая как слияние сконструированных повторов TAL с каталитическим доменом I-TevI, описанная в WO2012138927. TALEN были описаны и используются для таргетирования генов и модификаций генов (см., например, Boch et al. (2009) Science 326(5959): 1509-12; Moscou and Bogdanove (2009) Science 326(5959): 1501; Christian et al. (2010) Genetics 186(2): 757-61; Li et al. (2011) Nucleic Acids Res 39(1): 359-72). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько сайтов в локусе *TGFBR2* могут быть таргетированы для генетического разрушения сконструированными TALEN.

В некоторых вариантах осуществления, «TtAgo» является прокариотическим белком Argonaute, который, как считается, вовлечен в выключение гена. TtAgo получают из бактерии *Thermus thermophilus*. См., например, Swarts et al., (2014) Nature 507(7491): 258-261, G. Sheng et al., (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 652). «Система TtAgo» представляет собой все необходимые компоненты, включая, например, направляющие ДНК для расщепления ферментом TtAgo.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированный белок «цинковый палец», белок TALE или система CRISPR/Cas не найдены в природе, и их продуцирование

является результатом, в первую очередь, эмпирического процесса, такого как фаговый дисплей, ловушка взаимодействия или гибридной селекции. См., например, патент США № 5,789,538; патент США № 5,925,523; патент США № 6,007,988; патент США № 6,013,453; патент США № 6,200,759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197 и WO 02/099084.

Цинк-пальцевые и TALE ДНК-связывающие домены могут быть сконструированы для связывания с заранее определенной нуклеотидной последовательностью, например, путем конструирования (изменения одной или нескольких аминокислот) области спирали распознавания природного белка «цинковый палец» или конструированием аминокислот, вовлеченных в связывание ДНК (повторяющийся переменный ди-остаток или область RVD). Следовательно, сконструированные белки «цинковый палец» или белки TALE являются белками, которые не встречаются в природе. Не ограничивающими примерами способов конструирования белков «цинковый палец» и TALE являются дизайн и селекция. Сконструированным белком является белок, не встречающийся в природе, дизайн/композиция которого является результатом главным образом рациональных критериев. Рациональные критерии для дизайна включают применение правил замены и компьютеризированных алгоритмов обработки информации в базе данных, в которой хранится информация о существующих дизайнах ZFP или TALE (канонических и не канонических RVD) и данных связывания. См., например, патенты США №№ 9,458,205; 8,586,526; 6,140,081; 6,453,242; и 6 534 261; см. также WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496.

Описаны различные способы и композиции для таргетного расщепления геномной ДНК. Такие события таргетного расщепления можно использовать, например, для индукции таргетного мутагенеза, индукции таргетных делеций последовательностей клеточной ДНК и облегчения таргетной рекомбинации в заранее определенном хромосомном локусе. См., например, патенты США №№ 9,255,250; 9,200,266; 9,045,763; 9,005,973; 9,150,847; 8,956,828; 8,945,868; 8,703,489; 8,586,526; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,067,317; 7,262,054; 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; патентные публикации США 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983; 20130196373; 20140120622; 20150056705; 20150335708; 20160030477 и 20160024474, описания которых полностью включены посредством ссылки.

a. CRISPR/Cas9

В некоторых вариантах осуществления, таргетное генетическое разрушение, например разрыв ДНК, в эндогенных генах *TGFBR2* у человека осуществляют с использованием кластеризованных регулярных промежуточных коротких палиндромных повторов (CRISPR) и CRISPR-ассоциированных (Cas) белков. *См.* Sander and Joung (2014) *Nature Biotechnology*, 32(4): 347-355.

В общем, «система CRISPR» в совокупности относится к транскриптам и другим

элементам, участвующим в экспрессии или направляющим активность CRISPR-ассоциированных («Cas») генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas, последовательность tracr (транс-активирующую CRISPR) (*например,* tracr-РНК или активную частичную tracr-РНК), последовательность tracr-mate (включающую «прямой повтор» и обработанный tracr-РНК частичный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющую последовательность (также называемую «спейсер» в контексте эндогенной системы CRISPR) и/или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR.

В некоторых аспектах, CRISPR/Cas нуклеаза или система CRISPR/Cas нуклеаза содержит не кодирующую направляющую РНК (нРНК), которая специфично связывается с ДНК, и белок Cas (*например,* Cas9) с функциональностью нуклеазы.

Также представлены один или несколько агентов, способных вводить генетическое разрушение. Также представлены полинуклеотиды (например, молекулы нуклеиновой кислоты), кодирующие один или несколько компонентов одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение.

(i) *Направляющая РНК (нРНК)*

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение, содержат, по меньшей мере, одну из следующих: направляющую РНК (нРНК), имеющую таргетирующий домен, комплементарный сайту-мишени в локусе *TGFBR2* или, по меньшей мере, одну нуклеиновую кислоту, кодирующую нРНК.

В некоторых аспектах, «молекулой нРНК» является нуклеиновая кислота, которая способствует специфическому таргетированию или хомингу комплекса молекула нРНК/молекула Cas9 к нуклеиновой кислоте-мишени, такой как локус на геномной ДНК клетки. Молекулы нРНК могут быть мономолекулярными (имеющими одну молекулу РНК), иногда называемыми в настоящем документе «химерными» нРНК, или модульными (содержащими более одной, и обычно две отдельные молекулы РНК). В общем, направляющей последовательностью, например, направляющей РНК, является любая полинуклеотидная последовательность, содержащая, по меньшей мере, часть последовательности, которая имеет достаточную комплементарность с полинуклеотидной последовательностью-мишенью, такой как локус *TGFBR2* у людей, для гибридизации с последовательностью-мишенью в сайте-мишени и прямого сиквенс-специфичного связывания комплекса CRISPR с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, в контексте формирования комплекса CRISPR «последовательностью-мишенью» является последовательность, для которой сконструирована направляющая последовательность так, чтобы иметь комплементарность, где гибридизация между последовательностью-мишенью и доменом, например, таргетирующим доменом, направляющей РНК способствует образованию комплекса CRISPR. Полная комплементарность не обязательно требуется при условии, что комплементарность достаточна, чтобы вызвать гибридизацию и способствовать образованию комплекса

CRISPR. Обычно направляющую последовательность выбирают для уменьшения степени вторичной структуры внутри направляющей последовательности. Вторичная структура может быть определена любым подходящим алгоритмом сворачивания полинуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, направляющую РНК (нРНК), специфичную к локусу-мишени, представляющему интерес (*например,* в локусе *TGFBR2* у людей), используют для РНК-управляемых нуклеаз, например Cas, для индукции разрыва ДНК в сайте-мишени или положении-мишени. Способы конструирования нРНК и типовые таргетирующие домены могут включать те, которые описаны, например, в международных публикациях РСТ №№ WO2015/161276, WO2017/193107 и WO2017/093969.

Несколько типовых структур нРНК с указанными на них доменами описаны в WO2015/161276, например, на фиг. 1A-1G. Не желая быть связанными теорией, в отношении трехмерной формы или внутри- или межцепочечных взаимодействий активной формы нРНК, области высокой комплементарности иногда показаны как дуплексы в WO2015/161276, например, на фиг. 1A-1G и других изображениях, представленных в настоящем документе.

В некоторых случаях, нРНК является мономолекулярной или химерной нРНК, содержащей от 5' до 3': таргетирующий домен, который комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени, такой как последовательность из гена *TGFBR2* (кодирующая последовательность, указанная в SEQ ID NO: 74); первый домен комплементарности; связывающий домен; второй домен комплементарности (который комплементарен первому домену комплементарности); проксимальный домен; и, необязательно, хвостовой домен.

В других случаях, нРНК является модульной нРНК, содержащей первую и вторую цепи. В этих случаях, первая цепь предпочтительно содержит, от 5' до 3': таргетирующий домен (который комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени, такой как последовательность из гена *TGFBR2,* кодирующая последовательность, указанную в SEQ ID NO:74 или 76) и первую область комплементарности. Вторая цепь обычно содержит от 5' до 3': необязательно 5' удлиняющий домен; вторую область комплементарности; проксимальный домен; и, необязательно, хвостовой домен.

(a) *Таргетирующий домен*

Таргетирующий домен содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна, например, по меньшей мере, на 80, 85, 90, 95, 98 или 99% комплементарна, например, полностью комплементарна, последовательности-мишени на нуклеиновой кислоте-мишени. Цепь нуклеиновой кислоты-мишени, содержащая последовательность-мишень, называется в настоящем документе «комплементарной цепью» нуклеиновой кислоты-мишени. Руководство по выбору таргетирующих доменов можно найти, например, в Y *et al.*, Nat Biotechnol 2014 (doi: 10.1038/nbt.2808) и Sternberg SH *et al.*, Nature 2014 (doi: 10.1038/nature13011). Примеры размещения таргетирующих доменов содержат те, которые описаны в WO2015/161276, например, на фиг. 1A-1G.

Таргетирующий домен является частью молекулы РНК и, следовательно, будет включать основание урацил (U), в то время как любая ДНК, кодирующая молекулу нРНК,

будет содержать основание тимин (Т). Не желая быть связанными теорией, в некоторых вариантах осуществления, полагают, что комплементарность таргетирующего домена с последовательностью-мишенью вносит вклад в специфичность взаимодействия комплекса молекула нРНК/молекула Cas9 с нуклеиновой кислотой-мишенью. Понятно, что в паре таргетирующий домен и последовательность-мишень, основания урацила в таргетирующем домене будут спариваться с основаниями аденина в последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления, сам таргетирующий домен содержит в направлении от 5' до 3' необязательный вторичный домен и основной домен. В некоторых вариантах осуществления, основной домен полностью комплементарен последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен имеет длину от 5 до 50 нуклеотидов. Цепь нуклеиновой кислоты-мишени, к которой комплементарен таргетирующий домен, называется в настоящем документе комплементарной цепью. Некоторые или все нуклеотиды домена могут иметь модификацию, например, чтобы сделать его менее восприимчивым к деградации, улучшить биосовместимость и т. д. В качестве неограничивающего примера, каркас таргетирующего домена может быть модифицирован с помощью фосфоротиоата или других модификаций. В некоторых случаях, нуклеотид таргетирующего домена может содержать 2'-модификацию, например 2-ацетилирование, например 2'-метилирование, или другую модификацию.

В различных вариантах осуществления, таргетирующий домен имеет длину 16-26 нуклеотидов (т. е. длину 16 нуклеотидов, или длину 17 нуклеотидов, или длину 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов).

(b) *Типовые таргетирующие домены*

В некоторых вариантах осуществления, последовательности нРНК, которые являются или содержат последовательность таргетирующего домена, таргетирующую сайт-мишень в конкретном гене, таком как локус *TGFBR2,* сконструированы или идентифицированы. Общегеномная база данных нРНК для редактирования генома CRISPR является общедоступной, и содержит типовые последовательности единой направляющей РНК (енРНК), таргетирующие конститутивные экзоны генов в геноме человека или геноме мыши (см., *например,* genescript.com/нРНК-database.html; см. также: Sanjana *et al.* (2014) Nat. Methods, 11:783-4). В некоторых аспектах, последовательность нРНК является или содержит последовательность с минимальным связыванием с сайтом вне мишени или положением, не являющимся мишенью.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность-мишень (домен-мишень) находится на или рядом с локусом *TGFBR2,* например, в любой части кодирующей последовательности *TGFBR2,* указанной в SEQ ID NO: 74 или 76. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота-мишень, комплементарная таргетирующему домену, расположена в ранней кодирующей области представляющего интерес гена, такого как *TGFBR2.* Таргетирование ранней кодирующей области можно использовать для генетического разрушения (т.е. элиминации экспрессии) представляющего интерес гена. В некоторых вариантах осуществления, ранняя кодирующая область представляющего

интерес гена содержит последовательность, следующую сразу за инициирующим кодоном (например, ATG) или в пределах 500 по от инициирующего кодона (например, менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 по, 40 по, 30 по, 20 по или 10 по). В конкретных примерах, нуклеиновая кислота-мишень находится в пределах 200 по, 150 по, 100 по, 50 по, 40 по, 30 по, 20 по или 10 по от инициирущего кодона. В некоторых примерах, таргетирующий домен нРНК комплементарен, например, по меньшей мере, на 80, 85, 90, 95, 98 или 99% комплементарен, например, полностью комплементарен, последовательности-мишени на нуклеиновой кислоте-мишени, такой как нуклеиновая кислота-мишень в локусе *TGFBR2.*

В некоторых вариантах осуществления, нРНК может таргетировать сайт в локусе *TGFBR2* рядом с желаемым сайтом таргетной интеграции трансгенных последовательностей, например, кодирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, нРНК может таргетировать сайт на основе количества последовательностей, кодирующих *TGFBR2,* которое желательно для экспрессии в клетке, экспрессирующей рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, нРНК может таргетировать сайт так, чтобы при интеграции трансгенных последовательностей, например, кодирующих рекомбинантный рецептор, полученный локус *TGFBR2* кодировал доминантно-негативную форму TGFBRII. В некоторых аспектах, нРНК может таргетировать сайт внутри экзона открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2.* В некоторых аспектах, нРНК может таргетировать сайт в интроне открытой рамки считывания локуса *TGFBR2.* В некоторых аспектах, нРНК может таргетировать сайт внутри регуляторного или контрольного элемента, например промотора, локуса *TGFBR2.* В некоторых аспектах, сайт-мишень в локусе *TGFBR2,* который таргетирует нРНК, может быть любым сайтом-мишенью, описанным в настоящем документе, например, в разделе I.A.1. В некоторых вариантах осуществления, нРНК может таргетировать сайт в пределах или в непосредственной близости от экзонов, соответствующих ранней кодирующей области, например экзона 1, 2, 3, 4 или 5 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2,* или включая последовательность непосредственно после сайта начала транскрипции, в пределах экзона 1, 2, 3, 4 или 5, или в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по экзона 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления, нРНК может таргетировать сайт на или рядом с экзоном 2 эндогенного локуса *TGFBR2* или в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по экзон 2.

Типовые последовательности сайта-мишени для разрушения локуса *TGFBR2* человека с использованием Cas9 могут включать любые, указанные в SEQ ID NO: 63-68 и 73. Типовые нРНК могут включать последовательность рибонуклеиновых кислот, которые могут связываться с или таргетировать или быть комплементарными или может связываться с последовательностью комплементарной цепи последовательностей сайта-мишени, указанных в любой из SEQ ID NO: 74-76, 80, 81, 87-96 и 127-182. Любой из известных способов можно использовать для таргетирования и создания генетического разрушения эндогенного локуса *TGFBR2,* можно использовать в вариантах осуществления,

представленных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, таргетирующие домены содержат те, которые вводят генетическое разрушение в ген *TGFBR2,* используя *S. pyogenes* Cas9 или используя *N. meningitidis* Cas9. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующие домены содержат те, которые вводят генетическое разрушение в ген *TGFBR2,* используя *S. pyogenes* Cas9. Любой из таргетирующих доменов можно использовать с молекулой *S. pyogenes* Cas9, которая генерирует двухцепочечный разрыв (нуклеаза Cas9) или одноцепочечный разрыв (Cas9 никаза).

В некоторых вариантах осуществления, двойное таргетирование используют для создания двух ников на противоположных цепях ДНК с использованием *S. pyogenes* Cas9 никаз с двумя таргетирующими доменами, которые комплементарны противоположным цепям ДНК, например, иРНК, содержащая любой таргетирующий домен с минус-цепью, может быть спарена с любой нРНК, содержащей таргетирующий домен с плюс-цепью. В некоторых вариантах осуществления, две нРНК ориентированы на ДНК так, что PAM обращены наружу, и расстояние между 5' концами нРНК составляет 0-50 по. В некоторых вариантах осуществления, две нРНК используют для таргетирования двух Cas9 нуклеаз или двух Cas9 никаз, например, с использованием пары молекула Cas9/ комплекс молекулы нРНК, управляемой двумя разными молекулами нРНК, для расщепления домена-мишени с двумя одноцепочечными разрывами на противоположных цепях домена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, две Cas9 никазы могут включать молекулу, обладающую активностью HNH, например, молекулу Cas9, имеющую инактивированную активность RuvC, например, молекулу Cas9, имеющую мутацию на D10, например, мутацию D10A, молекулу, обладающую активностью RuvC, например, молекулу Cas9, имеющую инактивированную активность HNH, например, молекулу Cas9, имеющую мутацию на H840, например, H840A, или молекулу, обладающую активностью RuvC, например, молекулу Cas9, имеющую инактивированную активность HNH, например, молекулу Cas9 имеющий мутацию на N863, например, N863A. В некоторых вариантах осуществления, каждая из двух нРНК образует комплекс с D10A Cas9 никазой.

(c) *Первый домен комплементарности*

Первый домен комплементарности комплементарен второму домену комплементарности, описанному в настоящем документе, и обычно имеет достаточную комплементарность ко второму домену комплементарности для образования дуплексной области, по меньшей мере, при некоторых физиологических условиях. Первый домен комплементарности обычно имеет длину от 5 до 30 нуклеотидов и может иметь длину от 5 до 25 нуклеотидов, длину от 7 до 25 нуклеотидов, длину от 7 до 22 нуклеотидов, длину от 7 до 18 нуклеотидов или длину от 7 до 15 нуклеотидов. В различных вариантах осуществления, первый дополнительный домен имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Примеры первых доменов комплементарности включают те, которые описаны в WO2015/161276, например, на фиг. 1A-1G.

Обычно первый домен комплементарности не имеет точной комплементарности со вторым целевым доменом комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, первый домен комплементарности может иметь 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов, которые не комплементарны соответствующему нуклеотиду второго домена комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, сегмент из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 (например, 3) нуклеотидов первого домена комплементарности может не образовывать пары в дуплексе и может образовывать не дуплексную или петлевую область. В некоторых случаях, неспаренная или петлевая область, например петля из 3 нуклеотидов, присутствует на втором домене комплементарности. Эта неспаренная область необязательно начинается с 1, 2, 3, 4, 5 или 6, например, 4 нуклеотидов с 5' конца второго домена комплементарности.

Первый домен комплементарности может включать 3 субдомена, которые, в направлении от 5' к 3' являются: 5' субдоменом, центральным субдоменом и 3' субдоменом. В некоторых вариантах осуществления, 5' субдомен имеет длину 4-9, например, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, центральный субдомен имеет длину 1, 2 или 3, например, 1 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, 3' субдомен имеет длину от 3 до 25, например, 4-22, 4-18, или 4-10, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, первый и второй домены комплементарности, если они образуют дуплекс, содержат 11 спаренных нуклеотидов, например, в последовательности нРНК (одна спаренная цепь подчеркнута, одна выделена жирным шрифтом):
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAA**UAGC**AAG**UUAAAAU**AAG GCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 97).

В некоторых вариантах осуществления, первый и второй домены комплементарности, если они образуют дуплекс, содержат 15 парных нуклеотидов, например, в последовательности нРНК (одна спаренная цепь подчеркнута, одна выделена жирным шрифтом):
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGAAA**AGCAUAGC**AAG**UU AAAAU**AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 98).

В некоторых вариантах осуществления, первый и второй домены комплементарности, если они образуют дуплекс, содержат 16 парных нуклеотидов, например, в последовательности нРНК (одна спаренная цепь подчеркнута, одна выделена жирным шрифтом):
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGGAAA**CAGCAUAGC**AAG **UUAAAAU**AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 99).

В некоторых вариантах осуществления, первый и второй домены комплементарности, если они образуют дуплекс, содержат 21 парный нуклеотид, например, в последовательности нРНК (одна спаренная цепь подчеркнута, одна выделена жирным

шрифтом):
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUGGAAA**CAAAACAG**
CAUAGCAAG**UUAAAAU**AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGC (SEQ ID NO: 100).

В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидов меняют для удаления поли-U трактов, например, в последовательностях нРНК (замененные нуклеотиды подчеркнуты):
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUAUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAUAUAAGG
CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO:101);
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUUAAAUAAGG
CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO:102); и
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUAUUAGAGCUAUGCUGUAUUGGAAACAAUACAG
CAUAGCAAGUUAAUAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGC (SEQ ID NO:103).

Первый домен комплементарности может иметь общую гомологию с, или происходить из существующего в природе первого домена комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, он имеет, по меньшей мере, 50% гомологию с первым доменом комплементарности, описанным в настоящем документе, например, с первым доменом комплементарности *S. pyogenes, S. aureus, N. meningtidis* или *S. thermophilus.*

Следует отметить, что один или несколько или даже все нуклеотиды первого домена комплементарности могут иметь модификацию в соответствии с описанными в настоящем документе направлениями для таргетирующего домена.

(d) *Связывающий домен*

В мономолекулярной или химерной нРНК связывающий домен служит для связывания первого домена комплементарности со вторым доменом комплементарности мономолекулярной нРНК. Связывающий домен может ковалентно или не ковалентно связывать первый и второй домены комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, связь является ковалентной. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен ковалентно связывает первый и второй домены комплементарности, см., например, WO2015/161276, например, на фиг. 1B-1E. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен является или содержит ковалентную связь, расположенную между первым доменом комплементарности и вторым доменом комплементарности. Обычно связывающий домен содержит один или несколько, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, но в различных вариантах осуществления, линкер может иметь длину 20, 30, 40, 50 или даже 100 нуклеотидов. Примеры связывающих доменов включают те, которые описаны в WO2015/161276, например, на фиг. 1A-1G.

В модульных молекулах нРНК две молекулы связаны благодаря гибридизации доменов комплементарности, и связывающий домен может не присутствовать. См., например, WO2015/161276, например, на фиг. 1A.

Широкий спектр связывающих доменов подходит для использования в мономолекулярных молекулах нРНК. Связывающие домены могут состоять из ковалентной

связи или иметь длину, равную одному или нескольким нуклеотидам, например, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен имеет длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен имеет длину от 2 до 50, от 2 до 40, от 2 до 30, от 2 до 20, от 2 до 10 или от 2 до 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен имеет гомологию или получен из природной последовательности, например, последовательности tracrRNA, которая расположена 5' от второго домена комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен имеет, по меньшей мере, 50% гомологии со связывающим доменом, описанным в настоящем документе.

Как обсуждается в настоящем документе в связи с первым доменом комплементарности, некоторые или все нуклеотиды связывающего домена могут включать модификацию.

(e) *5' удлиняющий домен*

В некоторых случаях модульная нРНК может содержать дополнительную последовательность, 5 по отношению ко второму домену комплементарности, называемую в настоящем документе 5' удлиняющим доменом. В некоторых вариантах осуществления, 5' удлиняющий домен имеет длину 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5 или 2-4 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, 5' удлиняющий домен имеет длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, примеры 5' удлиняющего домена содержат те, которые описаны в WO2015/161276, например, на фиг. 1A.

(f) *Второй домен комплементарности*

Второй домен комплементарности комплементарен первому домену комплементарности и обычно имеет достаточную комплементарность по отношению ко второму домену комплементарности для образования дуплексной области, по меньшей мере, при некоторых физиологических условиях. В некоторых случаях, например, как показано в WO2015/161276, например, на фиг. 1A-1B, второй домен комплементарности может включать последовательность, которая не имеет комплементарности с первым доменом комплементарности, например последовательность, которая выходит из дуплексной области. Примеры вторых доменов комплементарности содержат те, которые описаны в WO2015/161276, например, на фиг. 1A-1G.

Второй домен комплементарности может иметь длину от 5 до 27 нуклеотидов, а в некоторых случаях может быть длиннее, чем первая область комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, второй домен комплементарности может иметь длину от 7 до 27 нуклеотидов, длину от 7 до 25 нуклеотидов, длину от 7 до 20 нуклеотидов или длину от 7 до 17 нуклеотидов. В более общем смысле, дополнительный домен может быть длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, второй домен комплементарности содержит

3 субдомена, которые в направлении от 5 'до 3' являются: 5' субдомен, центральный субдомен и 3' субдомен. В некоторых вариантах осуществления, 5' субдомен имеет длину от 3 до 25, например, от 4 до 22, от 4 до 18, или от 4 до 10, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, центральный субдомен имеет длину 1, 2, 3, 4 или 5, например, 3 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 3' субдомен имеет длину от 4 до 9, например, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, 5 'субдомен и 3' субдомен первого домена комплементарности, соответственно, комплементарны, например, полностью комплементарны, с 3 'субдоменом и 5' субдоменом второго домена комплементарности.

Второй домен комплементарности может иметь общую гомологию или быть получен из встречающегося в природе второго домена комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, он имеет, по меньшей мере, 50% гомологию со вторым доменом комплементарности, описанным в настоящем документе, например, с первым доменом комплементарности *S. pyogenes, S. aureus, N. meningtidis* или *S. thermophilus.*

Некоторые или все нуклеотиды второго домена комплементарности могут иметь модификацию, например модификацию, описанную в настоящем документе.

(g) *Проксимальный домен*

Примеры проксимальных доменов включают те, которые описаны в WO2015/161276, например, на фиг. 1A-1G. В некоторых вариантах осуществления, проксимальный домен имеет длину от 5 до 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, проксимальный домен может иметь общую гомологию с или происходить из природного проксимального домена. В некоторых вариантах осуществления, он имеет, по меньшей мере, 50% гомологию с проксимальным доменом, описанным в настоящем документе, например проксимальным доменом *S. pyogenes, S. aureus, N. meningtidis* или *S. thermophilus.*

Некоторые или все нуклеотиды проксимального домена могут иметь модификацию в соответствии с описанными в настоящем документе направлениями.

(h) *Хвостовой домен*

Как можно увидеть при рассмотрении хвостовых доменов в WO2015/161276, например, на фиг. 1A и фиг. 1B-1F, широкий спектр хвостовых доменов подходит для использования в молекулах нРНК. В различных вариантах осуществления, хвостовой домен имеет длину 0 (отсутствует), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, нуклеотиды хвостового домена расположены или имеют общую гомологию с последовательностью с 5' конца встречающегося в природе хвостового домена, см., например, WO2015/161276, например, на фиг. 1D или 1E. Хвостовой домен также необязательно содержит последовательности, которые комплементарны друг другу и которые, по меньшей мере, при некоторых физиологических условиях образуют дуплексную область. Примеры хвостовых доменов содержат те, которые описаны в WO2015/161276, например, на фиг. 1A-1G.

Хвостовые домены могут иметь общую гомологию или могут быть получены из природных проксимальных хвостовых доменов. В качестве неограничивающего примера, данный хвостовой домен в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего раскрытия может иметь, по меньшей мере, 50% гомологию с встречающимся в природе хвостовым доменом, описанным в настоящем документе, например, хвостовым доменом *S. pyogenes, S. aureus, N. meningtidis* или *S. thermophilus*.

В некоторых случаях, хвостовой домен содержит нуклеотиды на 3' конце, которые относятся к способу транскрипции in vitro или in vivo. Когда T7 промотор используют для транскрипции нРНК in vitro, эти нуклеотиды могут быть любыми нуклеотидами, присутствующими перед 3' концом ДНК-матрицы. Когда промотор U6 используют для транскрипции in vivo, эти нуклеотиды могут быть последовательностью UUUUUU. Когда используются чередующиеся промоторы pol-III, эти нуклеотиды могут иметь различное количество оснований урацила или могут включать чередующиеся основания.

В качестве неограничивающего примера в различных вариантах осуществления, проксимальный и хвостовой домен, вместе взятые, содержат следующие последовательности:

AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU (SEQ ID NO:104), AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGGUGC (SEQ ID NO:105), AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGGAUC (SEQ ID NO:106), AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG (SEQ ID NO:107), AAGGCUAGUCCGUUAUCA (SEQ ID NO:108), или AAGGCUAGUCCG (SEQ ID NO:109).

В некоторых вариантах осуществления, хвостовой домен содержит 3' последовательность UUUUUU, например, если для транскрипции используют промотор U6. В некоторых вариантах осуществления, хвостовой домен содержит 3' последовательность UUUU, например, если для транскрипции используют промотор H1. В некоторых вариантах осуществления, хвостовой домен содержит разное количество 3' U, в зависимости, например, от сигнала терминации используемого промотора pol-III. В некоторых вариантах осуществления, хвостовой домен содержит вариабельную 3' последовательность, полученную из матрицы ДНК, если используют промотор T7. В некоторых вариантах осуществления, хвостовой домен содержит вариабельную 3' последовательность, полученную из матрицы ДНК, например, если для создания молекулы РНК используется транскрипция in vitro. В некоторых вариантах осуществления, хвостовой домен содержит вариабельную 3' последовательность, полученную из матрицы ДНК, например, если для управления транскрипцией используют промотор pol-II.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК имеет следующую структуру: 5' [таргетирующий домен]-[первый домен комплементарности]-[связывающий домен]-[второй домен комплементарности]-[проксимальный домен]-[хвостовой домен]-3', где таргетирующий домен содержит основной домен и, необязательно, вторичный домен и

имеет длину от 10 до 50 нуклеотидов; первый домен комплементарности имеет длину от 5 до 25 нуклеотидов и, в некоторых вариантах осуществления, имеет, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% гомологию с описанным в настоящем документе эталонным первым доменом комплементарности; связывающий домен имеет длину от 1 до 5 нуклеотидов; проксимальный домен имеет длину от 5 до 20 нуклеотидов и, в некоторых вариантах осуществления, имеет, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% гомологию с эталонным проксимальным доменом, описанным в настоящем документе; и хвостовой домен отсутствует или нуклеотидная последовательность имеет длину от 1 до 50 нуклеотидов и, в некоторых вариантах осуществления, имеет, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% гомологию с описанным эталонным хвостовым доменом в настоящем документе.

(i) *Типовые химерные нРНК*

В некоторых вариантах осуществления, мономолекулярная или химерная нРНК содержит, предпочтительно, от 5' до 3': таргетирующий домен, например, содержащий 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов (который комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени); первая область комплементарности; связывающий домен; второй домен комплементарности (который комплементарен первому домену комплементарности); проксимальный домен; и хвостовой домен, где (a) проксимальный и хвостовой домены, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида; (b) имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности; или (c) имеется, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен его соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность из (a), (b) или (c) имеет, по меньшей мере, 60, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологию с соответствующей последовательностью существующей в природе нРНК, или с нРНК, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, проксимальный и хвостовой домен, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, имеется, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен его соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен содержит, имеет или состоит из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов (например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 последовательных нуклеотидов), имеющих комплементарность с доменом-мишенью, например, таргетирующий домен имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25

или 26 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, мономолекулярная или химерная молекула нРНК (включающая таргетирующий домен, первый домен комплементарности, связывающий домен, второй домен комплементарности, проксимальный домен и, необязательно, хвостовой домен) содержит следующую последовательность, в которой таргетирующий домен обозначен как 20 N, но может быть любой последовательностью и иметь длину от 16 до 26 нуклеотидов, и где после последовательности нРНК расположены 6 U, которые служат сигналом терминации для промотора U6, но которые могут отсутствовать. или быть в меньшем количестве: NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU (SEQ ID NO:110). В некоторых вариантах осуществления, мономолекулярной или химерной молекулой нРНК является молекула нРНК *S. pyogenes*.

В некоторых вариантах осуществления, мономолекулярная или химерная молекула нРНК (содержащая таргетирующий домен, первый домен комплементарности, связывающий домен, второй домен комплементарности, проксимальный домен и, необязательно, хвостовой домен) содержит следующую последовательность, в которой таргетирующий домен обозначен как 20 N, но может быть любой последовательностью и иметь длину от 16 до 26 нуклеотидов, и в котором последовательность нРНК сопровождается 6 U, которые служат сигналом терминации для промотора U6, но которые могут отсутствовать. или быть в меньшем количестве: NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUUUU (SEQ ID NO:111). В некоторых вариантах осуществления, мономолекулярной или химерной молекулой нРНК является молекула нРНК *S. aureus*. Последовательности и структуры типовых химерных нРНК также показаны в WO2015/161276, например, на фиг. 10A-10B.

Любая из описанных в настоящем документе молекул нРНК может использоваться с любыми молекулами Cas9, которые генерируют двухцепочечный разрыв или одноцепочечный разрыв, чтобы изменить последовательность нуклеиновой кислоты-мишени, например, положение-мишень или генетическую сигнатуру-мишень. В некоторых примерах, нуклеиновая кислота-мишень находится на или рядом с локусом *TGFBR2*, например в любом из описанных. В некоторых вариантах осуществления, молекула рибонуклеиновой кислоты, такая как молекула нРНК, и белок, такой как белок Cas9 или его варианты, вводят в любую из сконструированных клеток, представленных в настоящем документе. Молекулы нРНК, используемые в этих способах, описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК, например химерная нРНК, сконфигурирована так, что она имеет одно или несколько из следующих свойств;

а) она может располагать, например, при таргетировании молекулы Cas9, которая делает двухцепочечные разрывы, двухцепочечный разрыв (i) в пределах 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 нуклеотидов от положения-мишени, или (ii) достаточно

близко для того, чтобы положение-мишень находилось в области резекции конца;

b) она имеет таргетирующий домен из, по меньшей мере, 16 нуклеотидов, например, таргетирующий домен из (i) 16, (ii), 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25 или (xi) 26 нуклеотидов; и

c) (i) проксимальный и хвостовой домен, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из встречающихся в природе хвостового и проксимального домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis*, или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(ii) имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающейся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iii) имеется, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен своему соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности, например, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающей в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iv) хвостовой домен имеет длину, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов, например, он содержит, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов из встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов; или

(v) хвостовой домен содержит 15, 20, 25, 30, 35, 40 нуклеотидов или все соответствующие части встречающегося в природе хвостового домена, например, встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis.*

В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(iii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(iv). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(v). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(vi). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она

имеет свойства: a и b(vii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(viii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(ix). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(x). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(xi). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и c. В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a, b и c. В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(i) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(i) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(iv) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iv) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(v) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(v) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(vi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vi) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(viii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(viii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(ix) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ix) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(x) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(x) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(xi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(xi) и c(ii).

В некоторых вариантах осуществления, нРНК, например химерная нРНК, сконфигурирована так, что она имеет одно или несколько из следующих свойств;

a) одна или обе нРНК могут располагать, например, при таргетировании молекулы Cas9, которая делает разрывы одной цепи, разрыв одной цепи в пределах (i) 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 нуклеотидов таргетного положения, или (ii) достаточно

близко, чтобы таргетное положение находилось в области резекции конца;

b) один или оба имеют таргетирующий домен из, по меньшей мере, 16 нуклеотидов, например, таргетирующий домен из (i) 16, (ii), 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25 или (xi) 26 нуклеотидов; и

c) (i) проксимальный и хвостовой домен, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из встречающихся в природе хвостового и проксимального домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(ii) имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающейся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iii) имеется по меньшей мере 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен своему соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности, например, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающихся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iv) хвостовой домен имеет длину, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов, например, он содержит, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов из встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов; или

(v) хвостовой домен содержит 15, 20, 25, 30, 35, 40 нуклеотидов или все соответствующие части встречающегося в природе хвостового домена, например, встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis.*

В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(iii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(iv). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(v). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(vi). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она

имеет свойства: a и b(vii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(viii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(ix). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(x). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(xi). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и c. В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a, b и c. В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(i) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(i) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(iv) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iv) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(v) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(v) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(vi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vi) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(viii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(viii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(ix) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ix) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(x) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(x) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(xi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(xi) и c(ii).

В некоторых вариантах осуществления, нРНК используется с молекулой Cas9 никазы, имеющей активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в D10, например, мутацию D10A.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК используется с молекулой Cas9

никазы, имеющей активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в H840, например, H840A.

В некоторых вариантах осуществления, пара нРНК, например пара химерных нРНК, включающая первую и вторую нРНК, сконфигурирована так, что они обладают одним или несколькими из следующих свойств;

a) одна или обе нРНК могут позиционировать, например, при таргетировании молекулы Cas9, которая делает разрывы одной цепи, разрыв одной цепи в пределах (i) 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 нуклеотидов от положения-мишени, или (ii) достаточно близко, чтобы положение-мишень находилось в области резекции конца;

b) одна или обе имеют таргетирующий домен из, по меньшей мере, 16 нуклеотидов, например, таргетирующий домен из (i) 16, (ii), 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25 или (xi) 26 нуклеотидов;

c) для одной или обеих:

(i) проксимальный и хвостовой домен, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из встречающихся в природе хвостового и проксимального домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(ii) имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающейся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iii) имеется по меньшей мере 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен своему соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности, например, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающихся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iv) хвостовой домен имеет длину, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов, например, он содержит, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов из встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis*; или, или последовательность, отличающуюся на не более чем на 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов; или

(v) хвостовой домен содержит 15, 20, 25, 30, 35, 40 нуклеотидов или все соответствующие части встречающегося в природе хвостового домена, например,

встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis*;

d) нРНК сконфигурированы таким образом, что при гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью они разделяются 0-50, 0-100, 0-200, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 30 или, по меньшей мере, 50 нуклеотидами;

e) разрывы, сделанные первой и второй нРНК находятся на разных цепях; и

f) PAM обращены наружу.

В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(iii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(iv). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(v). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(vi). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(vii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(viii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы таким образом, что они обладают свойствами: a и b(ix). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(x). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(xi). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и c. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a, b и c. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii), c, d и e. В некоторых

вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iv) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iv) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iv), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iv), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы таким образом, что они обладают свойствами: a(i), b(iv), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(viii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают

свойствами: a(i), b(viii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(viii), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(viii), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(viii), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi), c, d и e.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК используют с молекулой Cas9 никазы, имеющей активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в D10, например, с мутацией D10A.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК используют с молекулой Cas9 никазы, имеющей активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в H840, например, H840A. В некоторых вариантах осуществления, изобретения нРНК используют с молекулой Cas9 никазы, имеющей активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в N863, например, N863A.

(j) *Типовые модульные нРНК*

В некоторых вариантах осуществления, модульная нРНК содержит первую и вторую цепи. Первая цепь содержит, предпочтительно, от 5’ до 3’; таргетирующий домен, например, содержащий 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов; первый домен комплементарности. Вторая цепь содержит, предпочтительно, от 5' до 3': необязательно, 5' удлиняющий домен; второй домен комплементарности; проксимальный домен; и хвостовой домен, где: (a) проксимальный и хвостовой домены, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида; (b) имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности; или (c) имеется, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность из (a), (b) или (c) имеет, по меньшей мере, 60, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологии с соответствующей последовательностью природной нРНК, или с нРНК, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, проксимальный и хвостовой домен, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности.

В некоторых вариантах осуществления, имеется, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности.

В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен имеет или состоит из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов (например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 последовательных нуклеотидов), имеющих комплементарность с доменом-мишенью, например, таргетирующий домен имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов.

(k) *Способы конструирования нРНК*

В настоящем документе описаны способы конструирования нРНК, включая способы выбора, конструирования и проверки таргетирующих доменов. В настоящем документе также представлены типовые таргетирующие домены. Обсуждаемые в настоящем документе таргетирующие домены могут быть включены в описанные в настоящем документе нРНК.

Способы селекции и проверки последовательностей-мишеней, а также не целевые анализы, например, в Mali et al., 2013 Science 339(6121): 823-826; Hsu et al. Nat Biotechnol, 31(9): 827-32; Fu et al., 2014 Nat Biotechnol, doi: 10.1038/nbt.2808. PubMed PMID: 24463574; Heigwer et al., 2014 Nat Methods 11(2):122-3. doi: 10.1038/nmeth.2812. PubMed PMID: 24481216; Bae et al., 2014 Bioinformatics PubMed PMID: 24463181; Xiao A et al., 2014

Bioinformatics PubMed PMID: 24389662.

В некоторых вариантах осуществления, программный инструмент может использоваться для оптимизации выбора нРНК в последовательности-мишени пользователя, например, для минимизации общей активности вне мишени по всему геному. Нецелевая активность может отличаться от расщепления. Например, для каждого возможного выбора нРНК с использованием *S. pyogenes* Cas9, программные инструменты могут идентифицировать все потенциальные последовательности вне мишени (предшествующие NAG или NGG PAM) в геноме, которые содержат вплоть до определенного количества (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) ошибочно спаренных пар оснований. Эффективность расщепления для каждой последовательности вне мишени может быть предсказана, например, с использованием экспериментально полученной схемы взвешивания. Каждую возможную нРНК можно затем ранжировать в соответствии с ее общим прогнозируемым расщеплением вне мишени; верхние ранжированные нРНК представляют те, которые, вероятно, будут иметь наибольшее расщепление на мишени и наименьшее расщепление вне мишени. Другие функции, например, автоматизированный дизайн реагентов для конструирования вектора нРНК, дизайн праймера для анализа Surveyor на мишени и дизайн праймера для высокопроизводительного обнаружения и количественной оценки расщепления вне мишени с помощью секвенирования следующего поколения, также могут быть включены в инструменты. Кандидатные нРНК молекулы можно оценивать известными в данной области техники способами или как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК для использования с *S. pyogenes, S. aureus* и *N. meningitidis* Cas9 идентифицируют с использованием алгоритма поиска последовательности ДНК, например, с использованием специального программного обеспечения для конструирования нРНК, основанного на общедоступном инструменте cas-offinder (Bae et al. Bioinformatics. 2014; 30(10): 1473-1475). Программа для конструирования пользовательских нРНК оценивает направляющие после расчета их склонности к отклонению от мишени по всему геному. Обычно совпадения в диапазоне от идеальных совпадений до 7 несовпадений рассматривают для направляющих длиной от 17 до 24. В некоторых аспектах, когда сайты вне мишени определены вычислительным способом, для каждой направляющей рассчитывают совокупный балл и суммируют в виде таблицы с использованием веб-интерфейса. В дополнение к идентификации потенциальных сайтов нРНК, соседних с последовательностями PAM, программное обеспечение также может идентифицировать все соседние последовательности PAM, которые отличаются на 1, 2, 3 или более нуклеотидов от выбранных сайтов нРНК. В некоторых вариантах осуществления, последовательности геномной ДНК для каждого гена получают из браузера UCSC Genome, и последовательности могут быть проверены на наличие повторяющихся элементов с использованием общедоступной программы RepeatMasker. RepeatMasker ищет входные последовательности ДНК для повторяющихся элементов и областей низкой сложности. Результатом является подробная аннотация повторов, присутствующих в данной

запрашиваемой последовательности.

После идентификации, нРНК могут быть ранжированы по уровням на основе одного или нескольких из их расстояния до сайта-мишени, их ортогональности и наличия 5' G (на основе идентификации близких совпадений в геноме человека, содержащем соответствующий PAM, например, в случае *S. pyogenes* - NGG PAM, в случае *S. aureus,* NNGRR (например, NNGRRT или NNGRRV) PAM, а в случае *N. meningtidis*, NNNNGATT или NNNNGCTT PAM). Ортогональность относится к количеству последовательностей в геноме человека, которые содержат минимальное количество ошибочных спариваний с последовательностью-мишенью. «Высокий уровень ортогональности» или «хорошая ортогональность» может, например, относиться к 20-мер таргетирующим доменам, которые не имеют ни идентичных последовательностей в геноме человека, кроме намеченной мишени, ни каких-либо последовательностей, которые содержат одно или два ошибочных спариваний в последовательности-мишени. Таргетирующие домены с хорошей ортогональностью выбирают для минимизации расщепления ДНК вне мишени. Следует понимать, что это не ограничивающий пример, и что для идентификации нРНК для использования с *S. pyogenes, S. aureus* и *N. meningitidis* или другими ферментами Cas9 можно использовать различные стратегии.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК для использования с *S. pyogenes* Cas9 можно идентифицировать с помощью общедоступного веб-сервера ZiFiT (Fu et al., Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat Biotechnol. 2014 Jan 26. doi: 10.1038/nbt.2808. PubMed PMID: 24463574, оригинальные ссылки см. в Sander et al., 2007, NAR 35:W599-605; Sander et al., 2010, NAR 38: W462-8). В дополнение к идентификации потенциальных сайтов нРНК, соседних с последовательностями PAM, программное обеспечение также идентифицирует все соседние последовательности PAM, которые отличаются на 1, 2, 3 или более нуклеотидов от выбранных сайтов нРНК. В некоторых аспектах, последовательности геномной ДНК для каждого гена могут быть получены из браузера UCSC Genome, и последовательности могут быть проверены на наличие повторяющихся элементов с использованием общедоступной программы Repeat-Masker. RepeatMasker ищет входные последовательности ДНК для повторяющихся элементов и областей низкой сложности. Результатом является подробная аннотация повторов, присутствующих в данной запрашиваемой последовательности.

После идентификации нРНК для использования с *S. pyogenes* Cas9 можно ранжировать по уровням, например, по 5 уровням. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующие домены для молекул нРНК первого уровня выбирают на основе их расстояния до сайта-мишени, их ортогональности и наличия 5' G (на основе ZiFiT-идентификации близких совпадений в геноме человека, содержащем NGG PAM). В некоторых вариантах осуществления, как 17-мерные, так и 20-мерные нРНК сконструированы для мишеней. В некоторых аспектах, нРНК также выбирают как для расщепления одной нуклеазой нРНК, так и для стратегии двойной нРНК никазы. Критерии выбора нРНК и определение того, какие нРНК могут использоваться для какой стратегии,

могут быть основаны на нескольких соображениях. В некоторых вариантах осуществления, идентифицированы нРНК как для расщепления нуклеазой одной нРНК, так и для стратегии спаренной с двойной нРНК «никазы». В некоторых вариантах осуществления, для выбора нРНК, включая определение того, какие нРНК могут быть использованы для стратегии спаренной с двойной нРНК «никазы», пары нРНК должны быть ориентированы на ДНК так, чтобы PAM были обращены наружу, и в результате произойдет разрезание с помощью Cas9 D10A никазы в 5' «липких» концах. В некоторых аспектах, можно предположить, что расщепление двойными парами никаз приведет к делеции всей промежуточной последовательности с разумной частотой. Однако расщепление двойными парами никаз также может часто приводить к мутациям вставки/делеции на сайте только одной из нРНК. Кандидатные члены пары могут быть протестированы на предмет того, насколько эффективно они удаляют всю последовательность по сравнению с просто проведением мутации вставки/делеции на сайте одной нРНК.

В некоторых вариантах осуществления, таргетирующие домены для молекул нРНК первого уровня могут быть выбраны на основе (1) разумного расстояния до положения-мишени, например, в пределах первых 500 по кодирующей последовательности ниже инициирующего кодона, (2) высокого уровня ортогональности и (3) наличия 5' G. В некоторых вариантах осуществления, для выбора нРНК второго уровня, требование 5' G может быть снято, но требуется ограничение расстояния и высокий уровень ортогональности. В некоторых вариантах осуществления, выбор третьего уровня использует такое же ограничение расстояния и требование для 5' G, но устраняет требование хорошей ортогональности. В некоторых вариантах осуществления, выбор четвертого уровня использует такое же ограничение расстояния, но устраняет требование хорошей ортогональности и начало с 5' G. В некоторых вариантах осуществления, выбор пятого уровня устраняет требование хорошей ортогональности и 5' G, и сканируется более длинная последовательность (например, остальная часть кодирующей последовательности, например, дополнительные 500 по выше или ниже сайта-мишени транскрипции). В некоторых случаях, нРНК не идентифицируется на основе критериев конкретного уровня.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК идентифицируют для расщепления одной нРНК нуклеазой, а также для стратегии спаренной с двойной нРНК «никазы».

В некоторых аспектах, нРНК для использования с Cas9s *N. meningitidis* и *S. aureus* могут быть идентифицированы вручную путем сканирования последовательности геномной ДНК на наличие последовательностей PAM. Эти нРНК можно разделить на два уровня. В некоторых вариантах осуществления, для нРНК первого уровня таргетирующие домены выбирают в пределах первых 500 по кодирующей последовательности ниже инициирующего кодона. В некоторых вариантах осуществления, для нРНК второго уровня таргетирующие домены выбирают в пределах оставшейся кодирующей последовательности (ниже первых 500 по). В некоторых случаях нРНК не идентифицируют на основе критериев конкретного уровня.

В некоторых вариантах осуществления, в другой стратегии идентификации

направляющих РНК (нРНК) для использования с Cas9 *S. pyogenes, S. aureus* и *N. meningtidis* может использоваться алгоритм поиска последовательности ДНК. В некоторых аспектах, конструирование направляющих РНК осуществляют с использованием специального программного обеспечения для проектирования направляющих РНК, основанного на общедоступном инструменте cas-offinder (Bae et al. Bioinformatics. 2014; 30(10): 1473-1475). Указанная программа для конструирования пользовательских нРНК оценивает направляющие после расчета их склонности к отклонению от мишени по всему геному. Обычно совпадения в диапазоне от идеальных совпадений до 7 несовпадений рассматривают для направляющих длиной от 17 до 24. Посте того, как вне мишени определены вычислительным способом, для каждой направляющей рассчитывают совокупный балл и суммируют в виде таблицы с использованием веб-интерфейса. В дополнение к идентификации потенциальных сайтов нРНК, соседних с последовательностями PAM, программное обеспечение также может идентифицировать все соседние последовательности PAM, которые отличаются на 1, 2, 3 или более нуклеотидов от выбранных сайтов нРНК. В некоторых вариантах осуществления, последовательности геномной ДНК для каждого гена получают из браузера UCSC Genome, и последовательности проверяют на наличие повторяющихся элементов с использованием общедоступной программы RepeatMasker. RepeatMasker ищет входные последовательности ДНК для повторяющихся элементов и областей низкой сложности. Результатом является подробная аннотация повторов, присутствующих в данной запрашиваемой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, после идентификации нРНК ранжируются по уровням на основе их расстояния до сайта-мишени или их ортогональности (на основе идентификации близких совпадений в геноме человека, содержащем соответствующий PAM, например, в случае *S. pyogenes,* a NGG PAM, в случае *S. aureus,* NNGRR (например, NNGRRT или NNGRRV) PAM, и в случае *N. meningtidis,* NNNNGATT или NNNNGCTT PAM). В некоторых аспектах, для минимизации выбираются таргетирующие домены с хорошей ортогональностью для минимизации расщепления ДНК вне мишени.

Например, для мишеней *S. pyogenes* и *N. meningtidis* могут быть сконструированы 17-мер или 20-мер нРНК. В качестве другого примера для мишеней *S. aureus* могут быть сконструированы 18-мер, 19-мер, 20-мер, 21-мер, 22-мер, 23-мер и 24-мер нРНК.

В некоторых вариантах осуществления, идентифицированы нРНК как для расщепления нуклеазой одной нРНК, так и для стратегии «никазы», спаренной с двумя нРНК. В некоторых вариантах осуществления, для выбора нРНК, включая определение того, какие нРНК могут быть использованы для стратегии двойной «никазы», спаренной с двумя нРНК, пары нРНК должны быть ориентированы на ДНК так, чтобы ПАМ были обращены наружу, и в результате будет разрезание с помощью никазы Cas9 D10A в 5' «липких» концах. В некоторых аспектах, можно предположить, что расщепление двойными парами никаз приведет к удалению всей промежуточной последовательности с разумной частотой. Однако расщепление двойными парами никаз также может часто приводить к

мутациям вставки/делеции в сайте только одной из нРНК. Кандидатные члены пары могут быть протестированы на предмет того, насколько эффективно они удаляют всю последовательность по сравнению с просто вызывающими мутации вставки/делеции в сайте одной нРНК.

Для разработки стратегий генетического разрушения в некоторых вариантах осуществления, таргетирующие домены для молекул нРНК 1 уровня для *S. pyogenes* выбирают на основе их расстояния до сайта-мишени и их ортогональности (PAM является NGG). В некоторых случаях, таргетирующие домены для молекул нРНК 1 уровня выбирают на основе (1) разумного расстояния до положения-мишени, например, в пределах первых 500 по кодирующей последовательности ниже инициирующего кодона и (2) высокого уровня ортогональности. В некоторых аспектах, для выбора нРНК 2 уровня не требуется высокий уровень ортогональности. В некоторых случаях нРНК 3 уровня устраняют требование хорошей ортогональности, и можно сканировать более длинную последовательность (например, остальную часть кодирующей последовательности). В некоторых случаях нРНК не идентифицируют на основе критериев конкретного уровня.

Для разработки стратегий генетического разрушения в некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен для молекул нРНК 1 уровня для *N. meningtidis* выбирают в пределах первых 500 пар оснований кодирующей последовательности и он имеет высокий уровень ортогональности. Таргетирующий домен для молекул нРНК 2 уровня для *N. meningtidis* выбирают в пределах первых 500 пар оснований кодирующей последовательности и он не требует высокой ортогональности. Таргетирующий домен для молекул нРНК 3 уровня для *N. meningtidis* выбирают в пределах оставшейся кодирующей последовательности ниже 500 по. Необходимо отметить, что уровни являются не включительными (каждая нРНК перечислена только один раз). В некоторых случаях, нРНК не была идентифицирована на основе критериев конкретного уровня.

Для разработки стратегий генетического разрушения в некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен для молекул нРНК 1 уровня для *S. aureus* выбирают в пределах первых 500 пар оснований кодирующей последовательности, и он имеет высокий уровень ортогональности и содержит NNGRRT PAM. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен для молекул нРНК 2 уровня для *S. aureus* выбирают в пределах первых 500 пар оснований кодирующей последовательности, уровень ортогональности не требуется, и он содержит NNGRRT PAM. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен для молекул нРНК 3 уровня для *S. aureus* выбирают в пределах остальной части кодирующей последовательности ниже и он содержит NNGRRT PAM. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен для молекул нРНК 4 уровня для *S. aureus* выбирают в пределах первых 500 пар оснований кодирующей последовательности и он содержит PAM NNGRRV. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен для молекул нРНК 5 уровня для *S. aureus* выбирают в оставшейся части кодирующей последовательности ниже, и он содержит PAM NNGRRV. В некоторых случаях нРНК не идентифицируют на основе критериев конкретного уровня.

(ii) *Cas9*

Молекулы Cas9 различных видов можно использовать в способах и композициях, описанных в настоящем документе. В то время как молекулы Cas9 *S. pyogenes, S. aureus, N. meningitidis* и *S. thermophilus* являются объектом большей части описания в настоящем документе, молекулы Cas9, полученные из или основанные на белках Cas9 других видов, перечисленных в настоящем документе, также могут использоваться. Другими словами, хотя в большей части описания в настоящем документе используют молекулы Cas9 *S. pyogenes, S. aureus, N. meningitidis* и *S. thermophilus*, молекулы Cas9 из других видов могут их заменить. К таким видам относятся: *Acidovorax avenae, Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus succinogenes, Actinobacillus suis, Actinomyces sp., Cycliphilusdenitrificans, Aminomonas paucivorans, Bacillus cereus, Bacillus smithii, Bacillus thuringiensis, Bacteroides sp., Blastopirellula marina, Bradyrhizobium sp., Brevibacillus laterosporus, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari, Candidatus puniceispirillum, Clostridium cellulolyticum, Clostridium perfringens, Corynebacterium accolens, Corynebacterium diphtheria, Corynebacterium matruchotii, Dinoroseobacter shibae, Eubacterium dolichum, Gammaproteobacterium, Gluconacetobacter diazotrophicus, Haemophilus parainfluenzae, Haemophilus sputorum, Helicobacter canadensis, Helicobacter cinaedi, Helicobacter mustelae, Ilyobacter polytropus, Kingella kingae, Lactobacillus crispatus, Listeria ivanovii, Listeria monocytogenes, Listeriaceae bacterium, Methylocystis sp., Methylosinus trichosporium, Mobiluncus mulieris, Neisseria bacilliformis, Neisseria cinerea, Neisseria flavescens, Neisseria lactamica, Neisseria meningitidis, Neisseria sp., Neisseria wadsworthii, Nitrosomonas sp., Parvibaculum lavamentivorans, Pasteurella multocida, Phascolarctobacterium succinatutens, Ralstonia syzygii, Rhodopseudomonas palustris, Rhodovulum sp., Simonsiella muelleri, Sphingomonas sp., Sporolactobacillus vineae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus lugdunensis, Streptococcus sp., Subdoligranulum sp., Tistrella mobilis, Treponema sp.* или *Verminephrobacter eiseniae.* Примеры молекул Cas9 могут включать молекулы, описанные, например, в WO2015/161276, WO2017/193107, WO2017/093969, US2016/272999 и US2015/056705.

Молекула Cas9 или полипептид Cas9, как этот термин используется в настоящем документе, относится к молекуле или полипептиду, который может взаимодействовать с молекулой нРНК и, вместе с молекулой нРНК, находится или локализуется в сайте, который содержит домен-мишень и последовательность PAM. Молекула Cas9 и полипептид Cas9, как эти термины используются в настоящем документе, относятся к встречающимся в природе молекулам Cas9 и к сконструированным, измененным или модифицированным молекулам Cas9 или полипептидам Cas9, которые отличаются, например, по меньшей мере, одним аминокислотным остатком от эталонной последовательности, например, наиболее похожей со встречающейся в природе молекулой Cas9.

Кристаллические структуры были определены для двух различных встречающихся в природе бактериальных молекул Cas9 (Jinek et al., Science, 343(6176):1247997, 2014) и для

S. pyogenes Cas9 с направляющей РНК (например, синтетическое слияние crRNA и tracrRNA.) (Nishimasu et al., Cell, 156:935-949, 2014; and Anders et al., Nature, 2014, doi: 10.1038/nature13579).

Встречающаяся в природе молекула Cas9 содержит две доли: долю распознавания (REC) и долю нуклеазы (NUC); каждый из которых дополнительно содержит домены, описанные в настоящем документе. Типовая схема организации важных доменов Cas9 в первичной структуре описана в WO2015/161276, например, на фиг. 8A-8B. Номенклатура домена и нумерация аминокислотных остатков, охватываемых каждым доменом, используемым в настоящем описании, соответствуют описанию Nishimasu et al. Нумерация аминокислотных остатков относится к Cas9 из *S. pyogenes.*

Доля REC содержит богатую аргинином мостиковую спираль (BH), домен REC1 и домен REC2. Доля REC не имеет структурного сходства с другими известными белками, указывая на то, что он является Cas9-специфичным функциональным доменом. Домен BH является длинную α-спираль и богатую аргинином область и содержит аминокислоты 60-93 последовательности *S. pyogenes* Cas9. Домен REC1 важен для распознавания дуплекса повтор:антиповтор, например, нРНК или tracrRNA, и, следовательно, имеет решающее значение для активности Cas9 за счет распознавания последовательности-мишени. Домен REC1 содержит два мотива REC1 в аминокислотах 94-179 и 308-717 последовательности Cas9 *S. pyogenes*. Эти два домена REC1, хотя и разделены доменом REC2 в линейной первичной структуре, собираются в третичную структуру с образованием домена REC1. Домен REC2 или его части могут также играть роль в распознавании дуплекса повтор:антиповтор. Домен REC2 содержит аминокислоты 180-307 последовательности Cas9 *S. pyogenes*.

Доля NUC содержит домен RuvC (также называемый в настоящем документе RuvC-подобным доменом), домен HNH (также называемый в настоящем документе HNH-подобным доменом) и домен, взаимодействующий с PAM (PI). Домен RuvC имеет структурное сходство с членами суперсемейства ретровирусной интегразы и расщепляет одну цепь, например, не комплементарную цепь молекулы нуклеиновой кислоты-мишени. Домен RuvC собран из трех расщепленных мотивов RuvC (RuvC I, RuvCII и RuvCIII, которые часто называют доменом RuvCI или N-концевым доменом RuvC, доменом RuvCII и доменом RuvCIII) на аминокислотах 1-59, 718-769 и 909-1098, соответственно, последовательности Cas9 *S. pyogenes*. Подобно домену REC1, три мотива RuvC линейно разделены другими доменами в первичной структуре, однако в третичной структуре три мотива RuvC собираются и образуют домен RuvC. Домен HNH имеет структурное сходство с эндонуклеазами HNH и расщепляет одну цепь, например, комплементарную цепь молекулы нуклеиновой кислоты-мишени. Домен HNH находится между мотивами RuvC II-III и содержит аминокислоты 775-908 последовательности Cas9 *S. pyogenes*. Домен PI взаимодействует с PAM молекулы нуклеиновой кислоты-мишени и содержит аминокислоты 1099-1368 последовательности Cas9 *S. pyogenes*.

(a) *RuvC-подобный домен и HNH-подобный домен*

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 содержит HNH-подобный домен и RuvC-подобный домен. В некоторых вариантах осуществления, активность расщепления зависит от RuvC-подобного домена и HNH-подобного домена. Молекула Cas9 или полипептид Cas9, например молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, может содержать один или несколько из следующих доменов: RuvC-подобный домен и HNH-подобный домен. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 является молекулой eaCas9 или полипептидом eaCas9, и молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 содержит RuvC-подобный домен, например RuvC-подобный домен, описанный в настоящем документе, и/или HNH-подобный домен, например, описанный в настоящем документе HNH-подобный домен.

(b) *RuvC-подобные домены*

В некоторых вариантах осуществления, RuvC-подобный домен расщепляет одну цепь, например, не комплементарную цепь молекулы нуклеиновой кислоты-мишени. Молекула Cas9 или полипептид Cas9 может включать более одного RuvC-подобного домена (например, один, два, три или более RuvC-подобных доменов). В некоторых вариантах осуществления, RuvC-подобный домен имеет длину, по меньшей мере, 5, 6, 7, 8 аминокислот, но не более 20, 19, 18, 17, 16 или 15 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 содержит N-концевой RuvC-подобный домен из примерно 10-20 аминокислот, например, из примерно 15 аминокислот в длину.

(c) *N-концевые RuvC-подобные домены*

Некоторые встречающиеся в природе молекулы Cas9 содержат более одного RuvC-подобного домена, причем расщепление зависит от N-концевого RuvC-подобного домена. Соответственно, молекулы Cas9 или полипептид Cas9 могут содержать N-концевой RuvC-подобный домен.

В варианте осуществления, N-концевой RuvC-подобный домен является способным к расщеплению.

В одном из вариантов осуществления, N-концевой RuvC-подобный домен является не способным к расщеплению.

В некоторых вариантах осуществления, N-концевой RuvC-подобный домен отличается от последовательности N-концевого RuvC-подобного домена, описанного в настоящем документе, например, в WO2015/161276, например, на фиг. 3A-3B или фиг. 7A-7B, не менее чем на 1, но не более чем на 2, 3, 4 или 5 остатков. В некоторых вариантах осуществления, 1, 2 или все 3 высоко консервативных остатка идентифицированы в WO2015/161276, например, на фиг. 3A-3B или фиг. 7A-7B.

В некоторых вариантах осуществления, N-концевой RuvC-подобный домен отличается от последовательности N-концевого RuvC-подобного домена, описанного в настоящем документе, например, в WO2015/161276, например, на фиг. 4A-4B или фиг. 7A-7B, не менее чем на 1, но не более чем на 2, 3, 4 или 5 остатков. В некоторых вариантах осуществления, 1, 2, 3 или все 4 высоко консервативных остатка идентифицированы в

WO2015/161276, например, на фиг. 4A-4B или фиг. 7A-7B.

(d) *Дополнительные RuvC-подобные домены*

В дополнение к N-концевому RuvC-подобному домену молекула Cas9 или полипептид Cas9, например, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, могут содержать один или несколько дополнительных RuvC-подобных доменов. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 может содержать два дополнительных RuvC-подобных домена. Предпочтительно дополнительный RuvC-подобный домен имеет длину, по меньшей мере, 5 аминокислот и, например, длину менее 15 аминокислот, например, длину от 5 до 10 аминокислот, например длину 8 аминокислот.

(e) *HNH-подобные домены*

В некоторых вариантах осуществления, HNH-подобный домен расщепляет одноцепочечный домен комплементарности, например, комплементарную цепь двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, HNH-подобный домен имеет длину, по меньшей мере, 15, 20, 25 аминокислот, но не более 40, 35 или 30 аминокислот, например, длину от 20 до 35 аминокислот, например, длину от 25 до 30 аминокислот. Здесь описаны типовые HNH-подобные домены.

В некоторых вариантах осуществления, HNH-подобный домен является способным к расщеплению.

В некоторых вариантах осуществления, HNH-подобный домен не является способным к расщеплению.

В некоторых вариантах осуществления, HNH-подобный домен отличается от последовательности HNH-подобного домена, описанного в настоящем документе, например, в WO2015/161276, например, на фиг. 5A-5C или фиг. 7A-7B не менее чем на 1, но не более чем на 2, 3, 4 или 5 остатков. В некоторых вариантах осуществления, 1 или оба высоко консервативных остатка идентифицированы в WO2015/161276, например, на фиг. 5A-5C или фиг. 7A-7B.

В некоторых вариантах осуществления, HNH-подобный домен отличается от последовательности HNH-подобного домена, описанного в настоящем документе, например, в WO2015/161276, например, на фиг. 6A-6B или фиг. 7A-7B не менее чем на 1, но не более чем на 2, 3, 4 или 5 остатков. В некоторых вариантах осуществления, 1, 2 все 3 высоко консервативных остатка идентифицированы в WO2015/161276, например, на фиг. 6A-6B или фиг. 7A-7B.

(f) *Активности нуклеазы и геликазы*

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 способна расщеплять молекулу нуклеиновой кислоты-мишени. Обычно молекулы Cas9 дикого типа расщепляют обе цепи молекулы нуклеиновой кислоты-мишени. Молекулы Cas9 и полипептиды Cas9 могут быть сконструированы для изменения расщепления нуклеазой (или других свойств), например, для получения молекулы Cas9 или полипептида Cas9, который является никазой или не обладает способностью расщеплять нуклеиновую кислоту-мишень. Молекула Cas9 или полипептид Cas9, способный расщеплять молекулу

нуклеиновой кислоты-мишени, называется в настоящем документе молекулой eaCas9 или полипептидом eaCas9.

В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 обладает одной или несколькими из следующих активностей: активностью никазы, то есть способностью расщеплять одну цепь, например, не комплементарную цепь или комплементарную цепь, молекулы нуклеиновой кислоты; активностью двухцепочечной нуклеазы, то есть способностью расщеплять обе цепи двухцепочечной нуклеиновой кислоты и создавать двухцепочечный разрыв, что в некоторых вариантах осуществления, свидетельствует о наличии активностей двух никаз; активностью эндонуклеазы; активностью экзонуклеазы; и активностью геликазы, т.е. способность раскручивать спиральную структуру двухцепочечной нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления, ферментативно активная или молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 расщепляет обе цепи и приводит к двухцепочечному разрыву. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 расщепляет только одну цепь, например, цепь, с которой гибридизуется нРНК, или цепь, комплементарную цепи, с которой гибридизуется нРНК. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 обладает активностью расщепления, связанной с HNH-подобным доменом. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 обладает активностью расщепления, связанной с N-концевым RuvC-подобным доменом. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 обладает активностью расщепления, связанной с HNH-подобным доменом, и активностью расщепления, связанной с N-концевым RuvC-подобным доменом. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 содержит активный или способный к расщеплению HNH-подобный домен и не активный или не способный к расщеплению N-концевой RuvC-подобный домен. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 содержит не активный или не способный к расщеплению HNH-подобный домен и активный или способный к расщеплению N-концевой RuvC-подобный домен.

Некоторые молекулы Cas9 или полипептиды Cas9 обладают способностью взаимодействовать с молекулой нРНК и в сочетании с молекулой нРНК локализуются в коровом домене-мишени, но неспособны расщеплять нуклеиновую кислоту-мишень или неспособны к расщеплению с эффективными скоростями. Молекулы Cas9, не обладающие или по существу не обладающие активностью расщепления, упоминаются в настоящем документе как молекула eiCas9 или полипептид eiCas9. Например, молекула eiCas9 или полипептид eiCas9 может не обладать активностью расщепления или обладать существенно меньшей, например, менее 20, 10, 5, 1 или 0,1% активности расщепления эталонной молекулы Cas9 или полипептида eiCas9, по данным анализа, описанного в настоящем документе.

(g) *Таргетирование и PAM*

Молекула Cas9 или полипептид Cas9 является полипептидом, который может

взаимодействовать с молекулой направляющей РНК (нРНК) и вместе с молекулой нРНК локализуется в сайте, который содержит домен-мишень и последовательность PAM.

В некоторых вариантах осуществления, способность молекулы eaCas9 или полипептида eaCas9 взаимодействовать и расщеплять нуклеиновую кислоту-мишень зависит от последовательности PAM. Последовательность PAM является последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах осуществления, расщепление нуклеиновой кислоты-мишени происходит выше последовательности PAM. Молекулы EaCas9 из разных видов бактерий могут распознавать разные мотивы последовательностей (например, последовательности PAM). В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 *S. pyogenes* распознает мотив последовательности NGG, NAG, NGA и направляет расщепление последовательности нуклеиновой кислоты-мишени от 1 до 10, например, от 3 до 5, пар оснований выше этой последовательности. См., например, Mali *et al.,* Science 2013; 339(6121): 823-826. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 *S. thermophilus* распознает мотив последовательности NGGNG и/или NNAGAAW (W=A или T) и направляет расщепление последовательности нуклеиновой кислоты-мишени от 1 до 10, например, от 3 до 5, пар оснований выше этой последовательности. См., например, See, e.g., Horvath *et al.*, Science 2010; 327(5962):167-170, and Deveau *et al.*, J Bacteriol 2008; 190(4): 1390-1400. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 *S. mutans* распознает мотив последовательности NGG и/или NAAR (R=A или G)) и направляет расщепление коровой последовательности нуклеиновой кислоты-мишени от 1 до 10, например, от 3 до 5 пар оснований, выше этой последовательности. См., например, Deveau *et al.*, J Bacteriol 2008; 190(4): 1390-1400. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRR (R=A или G) и направляет расщепление последовательности нуклеиновой кислоты-мишени от 1 до 10, например, от 3 до 5, пар оснований выше этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRRT (R=A или G) и направляет расщепление последовательности нуклеиновой кислоты-мишени от 1 до 10, например, от 3 до 5, пар оснований выше этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRRV (R=A или G) и направляет расщепление последовательности нуклеиновой кислоты-мишени от 1 до 10, например, от 3 до 5, пар оснований выше этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 *N. meningitidis* распознает мотив последовательности NNNNGATT или NNNGCTT (R=A или G, V=A, G или C) и направляет расщепление последовательности нуклеиновой кислоты-мишени от 1 до 10, например, от 3 до 5 пар оснований выше этой последовательности. См., например, Hou *et al.,* PNAS Early Edition 2013, 1-6. Способность молекулы Cas9 распознавать последовательность PAM может быть определена, например, с использованием анализа трансформации, описанного в Jinek *et al.,* Science 2012 337:816. В вышеупомянутых вариантах осуществления, N может быть любым нуклеотидным остатком, например, любым из A, G, C или T.

Как обсуждается в настоящем документе, молекулы Cas9 могут быть сконструированы для изменения специфичности PAM молекулы Cas9.

Примеры встречающихся в природе молекул Cas9 описаны в Chylinski et al., RNA Biology 2013 10:5, 727-737. К таким молекулам Cas9 относятся молекулы Cas9 кластера 1-78 бактериального семейства.

Примеры встречающихся в природе молекул Cas9 включают молекулу Cas9 кластера 1 бактериального семейства. Примеры включают молекулу Cas9: *S. pyogenes* (например, штамм SF370, MGAS10270, MGAS10750, MGAS2096, MGAS315, MGAS5005, MGAS6180, MGAS9429, NZ131 и SSI-1), *S. thermophilus* (например, штамм LMD-9), *S. pseudoporcinus* (например, штамм SPIN 20026), *S. mutans* (например, штамм UA159, NN2025), *S. macacae* (например, штамм NCTC11558), *S. gallolyticus* (например, штамм UCN34, ATCC BAA-2069), *S. equines* (например, штамм ATCC 9812, MGCS 124), *S. dysdalactiae* (например, штамм GGS 124), *S. bovis* (например, штамм ATCC 700338), *S. anginosus* (например, штамм F0211), *S. agalactiae* (например, штамм NEM316, A909), *Listeria monocytogenes* (например, штамм F6854), *Listeria innocua* (*L. innocua,* например, штамм Clip11262), *Enterococcus italicus* (например, штамм DSM 15952) или *Enterococcus faecium* (например, штамм 1,231,408). Другой типовой молекулой Cas9 является молекула Cas9 *Neisseria meningitidis* (Hou et al., PNAS Early Edition 2013, 1-6).

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9, например, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержит аминокислотную последовательность: имеющую 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%. 96%, 97%, 98% или 99% гомологии с; отличается не более чем на 2, 5, 10, 15, 20, 30 или 40% аминокислотных остатков по сравнению с; отличается, по меньшей мере, на 1, 2, 5, 10 или 20 аминокислот, но не более чем на 100, 80, 70, 60, 50, 40 или 30 аминокислот от; или идентичен любой последовательности молекулы Cas9, описанной в настоящем документе, или последовательности встречающейся в природе молекулы Cas9, например молекулы Cas9 из видов, перечисленных в настоящем документе (например, SEQ ID NOS: 112-115) или описанной в Chylinski et al., RNA Biology 2013 10: 5, 727-737; Hou et al., PNAS Early Edition 2013, 1-6. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 имеет одну или несколько из следующих активностей: активность никазы; активность двухцепочечного расщепления (например, активность эндонуклеазы и/или экзонуклеазы); активность геликазы; или способность вместе с молекулой нРНК возвращаться к нуклеиновой кислоте-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 содержит аминокислотную последовательность консенсусной последовательности WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G, где «*» обозначает любую аминокислоту, обнаруженную в соответствующем положении в аминокислотной последовательности молекулы Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans и L. innocua,* и «-» обозначает любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 отличается от последовательности консенсусной последовательности SEQ ID NO: 112-117

или консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G, по меньшей мере, на 1, но не более чем на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117 или как описано в WO2015/161276, например, на фиг. 7A-7B, где «*» обозначает любую аминокислоту, найденную в соответствующем положении в аминокислотной последовательности молекулы Cas9 *S. pyogenes* или *N. meningitidis*, «-» обозначает любую аминокислоту, и «-» обозначает любую аминокислоту или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 отличается от последовательности SEQ ID NO: 116 или 117 или как описано в WO2015/161276, например, на фиг. 7A-7B, по меньшей мере, на 1, но не более чем на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков.

Сравнение последовательности ряда молекул Cas9 показывает, что определенные области консервативны. Они обозначены как: область 1 (остатки от 1 до 180 или, в случае области 1', остатки от 120 до 180); область 2 (остатки от 360 до 480); область 3 (остатки от 660 до 720); область 4 (остатки от 817 до 900); и область 5 (остатки от 900 до 960).

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 содержит области 1-5 вместе с достаточной дополнительной последовательностью молекулы Cas9 для получения биологически активной молекулы, например молекулы Cas9, обладающей, по меньшей мере, одной активностью, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, каждая из областей 1-6, независимо, имеет 50%, 60%, 70% или 80% гомологию с соответствующими остатками молекулы Cas9 или полипептида Cas9, описанными в настоящем документе, например, представленными в SEQ ID NO: 112-117 или последовательности, описанной в WO2015/161276, например, с фиг. 2A-2G или фиг. 7A-7B.

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9, например, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержит аминокислотную последовательность, называемую областью 1, имеющую 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с аминокислотами 1-180 (нумерация соответствует последовательности мотива на фиг. 2A-2G WO 2015/161276; 52% остатков в четырех Cas9 последовательностях на фиг. 2A-2G WO 2015/161276 являются консервативными) аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes*; отличается по меньшей мере на 1, 2, 5, 10 или 20 аминокислот, но не более чем на 90, 80, 70, 60, 50, 40 или 30 аминокислот от аминокислот 1-180 аминокислотной последовательности Cas9 из *S y pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua*; или идентичен 1-180 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua.*

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9, например, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержит аминокислотную последовательность, называемую областью 1', имеющую 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с аминокислотами 120-180 (55% остатков в четырех последовательностях Cas9 на фиг. 2A-2G из WO 2015/161276 являются

консервативными) аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua*; отличается, по меньшей мере, на 1, 2 или 5 аминокислот, но не более чем на 35, 30, 25, 20 или 10 аминокислот от аминокислот 120-180 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua*; или идентичен 120-180 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua.*

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9, например, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержит аминокислотную последовательность, называемую областью 2, имеющую 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с аминокислотами 360-480 (52% остатков в четырех последовательностях Cas9 на фиг. 2A-2G WO 2015/161276 являются консервативными) аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua*; отличается, по меньшей мере, на 1, 2 или 5 аминокислот, но не более чем на 35, 30, 25, 20 или 10 аминокислот от аминокислот 360-480 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua*; или идентичен 360-480 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua.*

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9, например, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержит аминокислотную последовательность, называемую областью 3, имеющую 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с аминокислотами 660-720 (56% остатков в четырех последовательностях Cas9 на фиг. 2A-2G из WO 2015/161276 являются консервативными) аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua;* отличается, по меньшей мере, на 1, 2 или 5 аминокислот, но не более чем на 35, 30, 25, 20 или 10 аминокислот от аминокислот 660-720 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans или L. innocua;* или идентичен 660-720 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua.*

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9, например, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержит аминокислотную последовательность, называемую областью 4, имеющую 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с аминокислотами 817-900 (55% остатков в четырех последовательностях Cas9 на фиг. 2A-2G WO 2015/161276 являются консервативными) аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua;* отличается, по меньшей мере, на 1, 2 или 5 аминокислот, но не более чем на 35, 30, 25, 20 или 10 аминокислот от аминокислот 817-900 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua;* или идентичен 817-900 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua.*

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9,

например, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержит аминокислотную последовательность, называемую областью 5, имеющую 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с аминокислотами 900-960 (60% остатков в четырех последовательностях Cas9 на фиг. 2A-2G WO 2015/161276 являются консервативными) аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua;* отличается, по меньшей мере, на 1, 2 или 5 аминокислот, но не более чем на 35, 30, 25, 20 или 10 аминокислот от аминокислот 900-960 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua;* или идентичен 900-960 аминокислотной последовательности Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans* или *L. innocua.*

(h) *Сконструированные или измененные молекулы Cas9 и полипептиды Cas9*

Молекулы Cas9 и полипептиды Cas9, описанные в настоящем документе, например, встречающиеся в природе молекулы Cas9, могут обладать любым из ряда свойств, включая: активность никазы, активность нуклеазы (например, активность эндонуклеазы и/или экзонуклеазы); активность геликазы; способность функционально связываться с молекулой нРНК; и способность таргетировать (или локализоваться) сайт на нуклеиновой кислоте (например, распознавание и специфичность PAM). В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 может иметь все или часть этих свойств. В типовых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 обладает способностью взаимодействовать с молекулой нРНК и, вместе с молекулой нРНК, локализоваться на сайте в нуклеиновой кислоте. Другие активности, например специфичность PAM, активность расщепления или активность геликазы, могут более широко варьироваться в молекулах Cas9 и полипептидах Cas9.

Молекулы Cas9 содержат сконструированные молекулы Cas9 и сконструированные полипептиды Cas9 («сконструированные» в настоящем контексте означает просто, что молекула Cas9 или полипептид Cas9 отличается от эталонных последовательностей и не подразумевает никаких ограничений процесса или происхождения). Сконструированная молекула Cas9 или полипептид Cas9 может обладать измененными ферментативными свойствами, например, измененной активностью нуклеазы (по сравнению с природной или другой эталонной молекулой Cas9) или измененную активность геликазы. Как обсуждается в настоящем документе, сконструированная молекула Cas9 или полипептид Cas9 может обладать активностью никазы (в отличие от активности двухцепочечной нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления, сконструированная молекула Cas9 или полипептид Cas9 может иметь изменение, которое изменяет ее размер, например делецию аминокислотной последовательности, которая уменьшает ее размер, например, без значительного влияния на одну или несколько или любую активность Cas9. В некоторых вариантах осуществления, сконструированная молекула Cas9 или полипептид Cas9 может иметь изменение, которое влияет на распознавание PAM. Например, сконструированная молекула Cas9 может быть изменена для распознавания последовательности PAM, отличной от той, которая распознается эндогенным доменом PI дикого типа. В некоторых

вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 может отличаться по последовательности от встречающейся в природе молекулы Cas9, но не иметь значительных изменений в одной или нескольких активностях Cas9.

Молекулы Cas9 или полипептиды Cas9 с желаемыми свойствами могут быть получены различными способами, например, путем изменения исходных, например, встречающихся в природе молекул Cas9 или полипептидов Cas9, для получения измененной молекулы Cas9 или полипептида Cas9, обладающего желаемым свойством. Например, могут быть введены одна или несколько мутаций или отличий относительно исходной молекулы Cas9, например, встречающейся в природе или сконструированной молекулы Cas9. Такие мутации и отличия включают: замены (например, консервативные замены или замены не заменимых аминокислот); вставки; или делеции. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 может содержать одну или несколько мутаций или различий, например, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 мутаций, но менее 200, 100 или 80 мутаций относительно эталона, например родительской молекулы Cas9.

В некоторых вариантах осуществления, мутация или мутации не оказывают существенного влияния на активность Cas9, например активность Cas9, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, мутация или мутации оказывают существенное влияние на активность Cas9, например активность Cas9, описанную в настоящем документе.

(i) *Не расщепляющие и с модифицированным расщеплением молекулы Cas9 и полипептиды Cas9*

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 обладает свойством расщепления, которое отличается от встречающихся в природе молекул Cas9, например, от встречающейся в природе молекулы Cas9, имеющей наиболее близкую гомологию. Например, молекула Cas9 или полипептид Cas9 может отличаться от встречающихся в природе молекул Cas9, например, молекулы Cas9 *S. pyogenes,* следующим образом: ее способность модулировать, например, уменьшать или увеличивать, расщепление двухцепочечной нуклеиновой кислоты (активности эндонуклеазы и/или экзонуклеазы), например, по сравнению с встречающейся в природе молекулой Cas9 (например, молекулой Cas9 *S. pyogenes)*; ее способность модулировать, например, уменьшать или увеличивать, расщепление одной цепи нуклеиновой кислоты, например, не комплементарной цепи молекулы нуклеиновой кислоты или комплементарной цепи молекулы нуклеиновой кислоты (активность никазы), например, как по сравнению с встречающейся в природе молекулой Cas9 (например, молекулой Cas9 *S. pyogenes)*; или способность расщеплять молекулу нуклеиновой кислоты, например, двухцепочечную или одноцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, может быть элиминирована.

(j) *Модифицированное расщепление молекул eaCas9 и полипептидов eaCas9*

В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 имеет одну или несколько из следующих активностей: активность расщепления, связанная

с N-концевым RuvC-подобным доменом; активность расщепления, связанная с HNH-подобным доменом; активность расщепления, связанная с HNH-подобным доменом, и активность расщепления, связанная с N-концевым RuvC-подобным доменом.

В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 содержит активный или способный к расщеплению HNH-подобный домен и неактивный или не способный к расщеплению N-концевой RuvC-подобный домен. Типовой не активный или не способный к расщеплению N-концевой RuvC-подобный домен может иметь мутацию аспарагиновой кислоты в N-концевом RuvC-подобном домене, например, аспарагиновой кислоты в положении 9 консенсусной последовательности SEQ ID NO: 112-117 или консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G, или аспарагиновой кислоты в положении 10 SEQ ID NO: 117, например, может быть замещена аланином. В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 отличается от N-концевого RuvC-подобного домена дикого типа и не расщепляет нуклеиновую кислоту-мишень или расщепляет со значительно меньшей эффективностью, например, менее 20, 10, 5, 1 или 1% активности расщепления эталонной молекулы Cas9, например, по данным анализа, описанного в настоящем документе. Эталонной молекулой Cas9 может быть встречающаяся в природе не модифицированная молекула Cas9, например встречающаяся в природе молекула Cas9, такая как молекула Cas9 *S. pyogenes* или *S. thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления, эталонной молекулой Cas9 является встречающаяся в природе молекула Cas9, имеющая наиболее близкую идентичность или гомологию последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 содержит не активный или не способный к расщеплению домен HNH и активный или способный к расщеплению N-концевой RuvC-подобный домен. Типовые не активные или не способные к расщеплению HNH-подобные домены могут иметь мутацию на одном или нескольких из: гистидине в HNH-подобном домене, например гистидине, показанном в положении 856 консенсусной последовательности SEQ ID NO: 112-117 или консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G, например, который может быть замещен аланином; и одном или нескольких аспарагинах в HNH-подобном домене, например аспарагине, показанном в положении 870 консенсусной последовательности SEQ ID NO: 112-117, или консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G, и/или в положении 879 консенсусной последовательности SEQ ID NO: 112-117 или консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G, например, который может быть замещен аланином. В некоторых вариантах осуществления, eaCas9 отличается от дикого типа в HNH-подобном домене и не расщепляет нуклеиновую кислоту-мишень или расщепляет со значительно меньшей эффективностью, например, менее 20, 10, 5, 1 или 0,1% активности расщепления эталонной молекулы Cas9, например, по данным анализа, описанного в настоящем документе. Эталонной молекулой Cas9 может быть встречающаяся в природе не модифицированная молекула Cas9, например встречающаяся

в природе молекула Cas9, такая как молекула Cas9 *S. pyogenes* или *S. thermophilus.* В некоторых вариантах осуществления, эталонной молекулой Cas9 является природная молекула Cas9, имеющая наиболее близкую идентичность или гомологию последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления, молекула eaCas9 или полипептид eaCas9 содержит не активный или не способный к расщеплению домен HNH и активный или способный к расщеплению N-концевой RuvC-подобный домен. Типовые не активные или не способные к расщеплению HNH-подобные домены могут иметь мутацию на одном или нескольких из: гистидине в HNH-подобном домене, например гистидине, показанном в положении 856 консенсусной последовательности SEQ ID NO: 112-117 или консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G, например, может который быть замещен аланином; и одном или нескольких аспарагинах в HNH-подобном домене, например аспарагине, показанном в положении 870 консенсусной последовательности SEQ ID NO: 112-117, или консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G и/или в положении 879 консенсусной последовательности SEQ ID NO: 112-117 или консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G, например, который может быть замещен аланином. В некоторых вариантах осуществления, eaCas9 отличается от дикого типа в HNH-подобном домене и не расщепляет нуклеиновую кислоту-мишень или расщепляет со значительно меньшей эффективностью, например, менее 20, 10, 5, 1 или 0,1% активности расщепления эталонной молекулы Cas9, например, по данным анализа, описанного в настоящем документе. Эталонной молекулой Cas9 может быть встречающаяся в природе не модифицированная молекула Cas9, например встречающаяся в природе молекула Cas9, такая как молекула Cas9 *S. pyogenes или S. thermophilus.* В некоторых вариантах осуществления, эталонной молекулой Cas9 является природная молекула Cas9, имеющая наиболее близкую идентичность или гомологию последовательностей.

(k) *Изменение способности расщеплять одну или обе цепи нуклеиновой кислоты-мишени*

В некоторых вариантах осуществления, типовые активности Cas9 включают одну или несколько из специфичности PAM, активности расщепления и активности геликазы. Мутации могут присутствовать, например, в: одном или нескольких RuvC-подобных доменах, например, N-концевых RuvC-подобных доменах; HNH-подобном домене; области вне RuvC-подобных доменов и HNH-подобных доменов. В некоторых вариантах осуществления, мутации присутствуют в RuvC-подобном домене, например в N-концевом RuvC-подобном домене. В некоторых вариантах осуществления, мутации присутствует в HNH-подобном домене. В некоторых вариантах осуществления, мутации присутствуют как в RuvC-подобном домене, например в N-концевом RuvC-подобном домене, так и в HNH-подобном домене.

Типовые мутации, которые могут быть сделаны в домене RuvC или домене HNH в

отношении последовательности *S. pyogenes,* включают: D10A, E762A, H840A, N854A, N863A и/или D986A.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой Cas9 или полипептидом Cas9 является молекула eiCas9 или полипептид eiCas9, содержащий одно или несколько отличий в домене RuvC и/или в домене HNH по сравнению с эталонной молекулой Cas9, и молекула eiCas9 или полипептид eiCas9 не расщепляет нуклеиновую кислоту или расщепляет со значительно меньшей эффективностью, чем у дикого типа, например, по сравнению с диким типом в анализе расщепления, например, как описано в настоящем документе, отрезает менее чем с 50, 25, 10 или 1% эталонной молекулы Cas9, по данным анализа, описанного в настоящем документе.

Может ли или нет конкретная последовательность, например, замена, влиять на одну или несколько активностей, таких как активность таргетирования, активность расщепления и т.д., можно оценить или спрогнозировать, например, через оценку того, является ли мутация консервативной. В некоторых вариантах осуществления, «не незаменимый» аминокислотный остаток, используемый в контексте молекулы Cas9, является остаток, который может быть изменен из последовательности дикого типа молекулы Cas9, например, встречающейся в природе молекулы Cas9, например, молекулы eaCas9 без отмены или, более предпочтительно, без существенного изменения активности Cas9 (например, активности расщепления), тогда как изменение «незаменимого» аминокислотного остатка приводит к значительной потере активности (например, активности расщепления).

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 обладает свойством расщепления, которое отличается от встречающихся в природе молекул Cas9, например, от встречающейся в природе молекулы Cas9, имеющей наиболее близкую гомологию. Например, молекула Cas9 или полипептид Cas9 может отличаться от встречающихся в природе молекул Cas9, например, молекулы Cas9 *S aureus, S. pyogenes* или *C. jejuni* следующим образом: ее способность модулировать, например, уменьшать или увеличивать, расщепление двухцепочечного разрыва (активность эндонуклеазы и/или экзонуклеазы), например, по сравнению с встречающейся в природе молекулой Cas9 (например, молекулой Cas9 *S aureus, S. pyogenes* или *C. jejuni)*; ее способность модулировать, например, уменьшать или увеличивать, расщепление одной цепи нуклеиновой кислоты, например, не комплементарной цепи молекулы нуклеиновой кислоты или комплементарной цепи молекулы нуклеиновой кислоты (активность никазы), например, по сравнению с встречающейся в природе молекулой Cas9 (например, молекулой Cas9 *S aureus, S. pyogenes* или *C. jejuni)*; или способность расщеплять молекулу нуклеиновой кислоты, например, двухцепочечную или одноцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, может быть элиминирована.

В некоторых вариантах осуществления, измененной молекулой Cas9 или полипептидом Cas9 является молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, имеющий одну или несколько из следующих активностей: активность расщепления, связанная с доменом

RuvC; активность расщепления, связанная с доменом HNH; активность расщепления, связанная с доменом HNH, и активность расщепления, связанная с доменом RuvC.

В некоторых вариантах осуществления, измененной молекулой Cas9 или полипептидом Cas9 является молекула eiCas9 или полипептид eaCas9, который не расщепляет молекулу нуклеиновой кислоты (двухцепочечные или одноцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты) или расщепляет молекулу нуклеиновой кислоты со значительно меньшей эффективностью, например, менее 20, 10, 5, 1 или 0,1% активности расщепления эталонной молекулы Cas9, например, по данным анализа, описанного в настоящем документе. Эталонная молекула Cas9 может быть природной не модифицированной молекулой Cas9, например, встречающейся в природе молекулой Cas9, такой как молекула Cas9 *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus, C. jejuni* или *N. meningitidis.* В некоторых вариантах осуществления, эталонной молекулой Cas9 является природная молекула Cas9, имеющая наиболее близкую идентичность или гомологию последовательностей. В некоторых вариантах осуществления, молекула eiCas9 или полипептид eiCas9 не обладает значительной активностью расщепления, связанной с доменом RuvC, и активностью расщепления, связанной с доменом HNH.

В некоторых вариантах осуществления, измененной молекулой Cas9 или полипептидом Cas9 является молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержащий фиксированные аминокислотные остатки *S. pyogenes,* показанные в консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G, и имеет одну или несколько аминокислот, которые отличаются от аминокислотной последовательности *S. pyogenes* (например, имеют замену) на одном или нескольких остатках (например, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100, 200 аминокислотных остатков) в SEQ ID NO: 117 или остаток, представленный «-» в консенсусной последовательности, описанной в WO2015/161276, например, на фиг. 2A-2G.

В некоторых вариантах осуществления, измененная молекула Cas9 или полипептид Cas9 содержит последовательность, в которой: последовательность, соответствующая фиксированной последовательности консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20% фиксированных остатков в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276, последовательность, соответствующая остаткам, обозначенным «*» в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличаются не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40% остатков «*» из соответствующей последовательности встречающейся в природе молекулы Cas9, например, молекулы Cas9 *S. pyogenes*; и последовательность, соответствующая остаткам, обозначенным «-» в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличается не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 или 60% остатков «-» от соответствующей последовательности встречающейся в природе молекулы Cas9., например, молекулы Cas9 *S. pyogenes.*

В некоторых вариантах осуществления, измененной молекулой Cas9 или

полипептидом Cas9 является молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержащий фиксированные аминокислотные остатки *S. thermophilus,* показанные в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276, и имеет одну или несколько аминокислот, которые отличаются от аминокислотной последовательности *S. thermophilus* (например, имеют замену) на одном или нескольких остатках (например, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100, 200 аминокислотных остатках), представленных знаком «-» в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276.

В некоторых вариантах осуществления, измененной молекулой Cas9 или полипептидом Cas9 является последовательность, в которой: последовательность, соответствующая фиксированной последовательности консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20% фиксированных остатках в консенсусной последовательности, описанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276, последовательность, соответствующая остаткам, обозначенным «*» в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличаются не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40% остатков «*» из соответствующей последовательности встречающейся в природе молекулы Cas9, например, молекулы Cas9 *S. thermophilus*; и последовательность, соответствующая остаткам, обозначенным «-» в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличаются не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 или 60% остатков «-» от соответствующей последовательности встречающейся в природе молекулы Cas9, например, молекулы Cas9 *S. thermophilus*.

В некоторых вариантах осуществления, измененной молекулой Cas9 или полипептидом Cas9 является молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержащий фиксированные аминокислотные остатки *S. mutans,* показанные в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276, и имеет одну или несколько аминокислот, которые отличаются от аминокислотной последовательности *S. mutans* (например, имеют замену) на одном или нескольких остатках (например, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100, 200 аминокислотных остатках), представленных знаком «-» в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276.

В некоторых вариантах осуществления, измененная молекула Cas9 или полипептид Cas9 содержит последовательность, в которой: последовательность, соответствующая фиксированной последовательности консенсусной последовательности, описанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20% фиксированных остатков в консенсусной последовательности, описанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276, последовательность, соответствующая остаткам, идентифицированным «*» в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40% остатков «*» из соответствующей последовательности встречающейся в природе молекулы Cas9, например, молекулы Cas9 *S. mutans;* и последовательность, соответствующая остаткам, обозначенным «-» в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из

WO2015/161276 отличается не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 или 60% остатков «-» от соответствующей последовательности встречающейся в природе молекулы Cas9, например, молекулы Cas9 *S. mutans.*

В некоторых вариантах осуществления, измененной молекулой Cas9 или полипептидом Cas9 является молекула eaCas9 или полипептид eaCas9, содержащий фиксированные аминокислотные остатки *L. innocula,* показанные в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276, и имеет одну или несколько аминокислот, которые отличаются от аминокислотной последовательности *L. innocula* (например, имеют замену) на одном или нескольких остатках (например, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100, 200 аминокислотных остатках), представленных «-» в консенсусной последовательности, описанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276. В некоторых вариантах осуществления, измененная молекула Cas9 или полипептид Cas9 содержит последовательность, в которой: последовательность, соответствующая фиксированной последовательности консенсусной последовательности, описанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20% фиксированных остатков в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276, последовательность, соответствующая остаткам, обозначенным «*» в консенсусной последовательности, описанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличаются не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40% остатков «*» из соответствующей последовательности встречающейся в природе молекулы Cas9, например, молекулы Cas9 *L. innocula;* и последовательность, соответствующая остаткам, обозначенным «-» в консенсусной последовательности, показанной на фиг. 2A-2G из WO2015/161276 отличаются не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55 или 60% остатков «-» от соответствующей последовательности встречающейся в природе молекулы Cas9, например, молекула Cas9 *L. innocula.*

В некоторых вариантах осуществления, измененная молекула Cas9 или полипептид Cas9, например, молекула eaCas9, может быть слиянием, например, двух или нескольких различных молекул Cas9 или полипептидов Cas9, например, двух или нескольких встречающихся в природе молекул Cas9 разных видов. Например, фрагмент встречающейся в природе молекулы Cas9 одного вида может быть слит с фрагментом молекулы Cas9 второго вида. В качестве примера, фрагмент молекулы Cas9 *S. pyogenes,* содержащий N-концевой RuvC-подобный домен, может быть слит с фрагментом молекулы Cas9 вида, отличного от *S. pyogenes* (например, *S. thermophilus)*, содержащим HNH-подобный домен.

(I) *Молекулы Cas9 с измененным распознаванием PAM или без распознавания PAM*

Встречающиеся в природе молекулы Cas9 могут распознавать специфические последовательности PAM, например последовательности распознавания PAM, описанные в настоящем документе, например, для *S. pyogenes, S. thermophilus, S. mutans, S. aureus* и *N. meningitidis.*

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 имеет

такую же специфичность к PAM, что и встречающаяся в природе молекула Cas9. В других вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 имеет PAM-специфичность, не связанную с встречающейся в природе молекулой Cas9, или PAM-специфичность, не связанную с встречающейся в природе молекулой Cas9, с которой она имеет наиболее близкую гомологию последовательности. Например, встречающаяся в природе молекула Cas9 может быть изменена, например, для изменения распознавания PAM, например, для изменения последовательности PAM, которую распознает молекула Cas9 или полипептид Cas9, чтобы уменьшить сайты вне мишени и/или улучшить специфичность; или элиминировать требование распознавания PAM. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 может быть изменена, например, для увеличения длины последовательности распознавания PAM и/или повышения специфичности Cas9 до высокого уровня идентичности, например, для уменьшения сайтов вне мишени и повышения специфичности. В некоторых вариантах осуществления, длина последовательности распознавания PAM составляет, по меньшей мере, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 аминокислот.

Молекулы Cas9 или полипептиды Cas9, которые распознают различные последовательности PAM и/или обладают пониженной активностью вне мишени, могут быть получены с использованием направленной эволюции. Типовые способы и системы, которые могут применяться для направленной эволюции молекул Cas9, описаны, например, в Esvelt et al. Nature 2011, 472 (7344): 499-503. Кандидатные молекулы Cas9 могут быть оценены, например, способами, описанными в настоящем документе.

В настоящем документе обсуждаются изменения домена PI, который опосредует распознавание PAM.

(m) *Синтетические молекулы Cas9 и полипептиды Cas9 с измененными PI доменами*

Современные способы редактирования генома ограничены разнообразием последовательностей-мишеней, которые могут быть таргетированы последовательностью PAM, которая распознается используемой молекулой Cas9. Синтетическая молекула Cas9 (или молекула Syn-Cas9), или синтетический полипептид Cas9 (или полипептид Syn-Cas9), как этот термин используется в настоящем документе, относится к молекуле Cas9 или полипептиду Cas9, который содержит коровый домен Cas9 из одного вида бактерий и функционально измененный PI домен, т.е. PI домен, отличный от того, который в природе связан с коровым доменом Cas9, например, от другого вида бактерий.

В некоторых вариантах осуществления, измененный PI домен распознает последовательность PAM, которая отличается от последовательности PAM, распознаваемой существующим в природе Cas9, из которого происходит коровый домен Cas9. В некоторых вариантах осуществления, измененный PI домен распознает ту же последовательность PAM, распознаваемую существующим в природе Cas9, из которого происходит коровый домен Cas9, но с другой аффинностью или специфичностью. Молекула Syn-Cas9 или полипептид Syn-Cas9 может быть, соответственно, молекулой Syn-eaCas9, полипептидом Syn-eaCas9 или молекулой Syn-eiCas9, полипептидом Syn-eiCas9.

Типовая молекула Syn-Cas9 или полипептид Syn-Cas9 содержит: a) коровый домен

Cas9, например коровый домен Cas9, например коровый домен Cas9 *S. aureus, S. pyogenes* или *C. jejuni;* и b) измененный PI домен из последовательности Cas9 вида X.

В некоторых вариантах осуществления, мотив RKR (мотив связывания PAM) указанного измененного PI домена содержит: различия в 1, 2 или 3 аминокислотных остатках; различие в аминокислотной последовательности в первом, втором или третьем положении; различия в аминокислотной последовательности в первом и втором положениях, первом и третьем положениях или втором и третьем положениях; по сравнению с последовательностью мотива RKR нативного или эндогенного PI домена, связанного с коровым доменом Cas9.

В некоторых вариантах осуществления, молекула Syn-Cas9 или полипептид Syn-Cas9 также может быть оптимизирован по размеру, например, молекула Syn-Cas9 или полипептид Syn-Cas9 содержит одну или несколько делеций и, необязательно, один или несколько линкеров, расположенных между аминокислотными остатками, фланкирующими делеции. В некоторых вариантах осуществления, молекула Syn-Cas9 или полипептид Syn-Cas9 содержит делецию REC.

(n) *Оптимизированные по размеру молекулы Cas9 и полипептиды Cas9*

Сконструированные молекулы Cas9 и сконструированные полипептиды Cas9, описанные в настоящем документе, содержат молекулу Cas9 или полипептид Cas9, содержащий делецию, которая уменьшает размер молекулы, при этом сохраняя желаемые свойства Cas9, например, по существу нативную конформацию, активность нуклеазы Cas9 и/или распознавание молекулы нуклеиновой кислоты-мишени. Молекулы Cas9 или полипептиды Cas9, используемые в контексте представленных вариантов осуществления, могут содержать одну или несколько делеций и, необязательно, один или несколько линкеров, при этом линкер расположен между аминокислотными остатками, фланкирующими делецию.

Молекула Cas9, например молекула Cas9 *S. aureus, S. pyogenes* или *C. jejuni*, имеющая делецию, меньше, например, имеет меньшее количество аминокислот, чем соответствующая встречающаяся в природе молекула Cas9. Меньший размер молекул Cas9 обеспечивает повышенную гибкость способов доставки и, таким образом, увеличивает полезность для редактирования генома. Молекула Cas9 или полипептид Cas9 может содержать одну или несколько делеций, которые по существу не влияют или не снижают активность полученных молекул Cas9 или полипептидов Cas9, описанных в настоящем документе. Активности, которые сохраняются в молекулах Cas9 или полипептидах Cas9, содержащих делецию, как описано в настоящем документе, имеют одно или несколько из следующих: активность никазы, т. е. способность расщеплять одну цепь, например, не комплементарную цепь или комплементарную цепь, молекулы нуклеиновой кислоты; активность двухцепочечной нуклеазы, т. е. способность расщеплять обе цепи двухцепочечной нуклеиновой кислоты и создавать двухцепочечный разрыв, что в некоторых вариантах осуществления, является наличием двух активностей никазы; активность эндонуклеазы; активность экзонуклеазы; активность геликазы, т.е. способность

раскручивать спиральную структуру двухцепочечной нуклеиновой кислоты; и активность распознавания молекулы нуклеиновой кислоты, например нуклеиновой кислоты-мишени или нРНК.

Активность описанных в настоящем документе молекул Cas9 или полипептидов Cas9 можно оценить с помощью анализов активности, описанных в настоящем документе или известных.

(o) *Идентификация областей, подходящих для делеции*

Подходящие области молекул Cas9 для делеции можно идентифицировать множеством способов. Встречающиеся в природе ортологичные молекулы Cas9 из различных видов бактерий можно смоделировать на основе кристаллической структуры Cas9 *S. pyogenes* (Nishimasu et al., Cell, 156:935-949, 2014), чтобы исследовать уровень консервации для выбранных ортологов Cas9 относительно трехмерной конформации белка. Менее консервативные или не консервативные области, которые пространственно расположены далеко от областей, вовлеченных в активность Cas9, например, интерфейс с молекулой нуклеиновой кислоты-мишени и/или нРНК, представляют области или домены, которые являются кандидатами для делеции без существенного влияния или снижения активности Cas9.

(p) *REC-оптимизированные молекулы Cas9 и полипептиды Cas9*

REC-оптимизированная молекула Cas9 или REC-оптимизированный полипептид Cas9, как этот термин используется в настоящем документе, относится к молекуле Cas9 или полипептиду Cas9, который содержит делецию в одном или обоих из домена REC2 и домена $RE1_{CT}$ (в совокупности REC делеция), где делеция содержит, по меньшей мере, 10% аминокислотных остатков в родственном домене. REC-оптимизированная молекула Cas9 или полипептид Cas9 может быть молекулой eaCas9 или полипептидом eaCas9, или молекулой eiCas9 или полипептидом eiCas9. Примерная REC-оптимизированная молекула Cas9 или REC-оптимизированный полипептид Cas9 содержит: a) делецию, выбранную из: i) делеции REC2; ii) делеции $REC1_{CT}$; или iii) делеции $REC1_{SUB}$.

Необязательно, линкер расположен между аминокислотными остатками, фланкирующими делецию. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 или полипептид Cas9 содержит только одну делецию или только две делеции. Молекула Cas9 или полипептид Cas9 может содержать делецию REC2 и делецию $REC1_{CT}$. Молекула Cas9 или полипептид Cas9 может содержать делецию REC2 и делецию $REC1_{SUB}$.

Обычно делеция будет содержать, по меньшей мере, 10% аминокислот в родственном домене, например, делеция REC2 будет включать, по меньшей мере, 10% аминокислот в домене REC2. Делеция может включать: по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% аминокислотных остатков ее родственного домена; все аминокислотные остатки его родственного домена; аминокислотный остаток вне родственного домена; множество аминокислотных остатков вне родственного домена; аминокислотный остаток непосредственно на N-конце его родственного домена; аминокислотный остаток непосредственно на C-конце его родственного домена; аминокислотный остаток

непосредственно на N-конце его родственного домена и аминокислотный остаток непосредственно на С-конце его родственного домена; множество, например, вплоть до 5, 10, 15 или 20 аминокислотных остатков на N-конце его родственного домена; множество, например, вплоть до 5, 10, 15 или 20 аминокислотных остатков, С-концевых по отношению к его родственному домену; множество, например, вплоть до 5, 10, 15 или 20 аминокислотных остатков на N-конце его родственного домена и множество, например, вплоть до 5, 10, 15 или 20 аминокислотных остатков на С-конце его родственного домена.

В некоторых вариантах осуществления, делеция не распространяется за пределы: родственного домена; N-концевого аминокислотного остатка его родственного домена; С-концевого аминокислотного остатка его родственного домена.

REC-оптимизированная молекула Cas9 или REC-оптимизированный полипептид Cas9 может включать линкер, расположенный между аминокислотными остатками, фланкирующими делецию. Подходящие линкеры для использования между аминокислотными остатками, которые фланкируют делецию REC в REC-оптимизированной молекуле Cas9, описаны в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, REC-оптимизированная молекула Cas9 или REC-оптимизированный полипептид Cas9 содержит аминокислотную последовательность, которая, кроме любой делеции REC и связанного линкера, имеет, по меньшей мере, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% гомологию с аминокислотной последовательностью встречающейся в природе Cas9, например, молекулы Cas9 *S. aureus*, молекулы Cas9 *S. pyogenes* или молекулы Cas9 *C. jejuni*.

В некоторых вариантах осуществления, REC-оптимизированная молекула Cas9 или REC-оптимизированный полипептид Cas9 содержит аминокислотную последовательность, которая, кроме любой делеции REC и связанного линкера, отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7., 8, 9, 10, 15, 20 или 25 аминокислотных остатков из аминокислотной последовательности встречающейся в природе Cas9, например молекулы Cas9 *S. aureus*, молекулы Cas9 *S. pyogenes* или молекулы Cas9 *C. jejuni*.

В некоторых вариантах осуществления, REC-оптимизированная молекула Cas9 или REC-оптимизированный полипептид Cas9 содержит аминокислотную последовательность, которая, кроме любой делеции REC и ассоциированного линкера, отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7., 8, 9, 10, 15, 20 или 25% аминокислотных остатков из аминокислотной последовательности встречающейся в природе Cas9, например молекулы Cas9 *S. aureus*, молекулы Cas9 *S. pyogenes* или молекулы Cas9 *C. jejuni.*

Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравнивают тестовые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестовую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости указывают координаты субпоследовательности и указывают параметры программы алгоритма последовательности. Можно использовать параметры программы по умолчанию или указать альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей

вычисляет процент идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности на основе параметров программы. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, с помощью алгоритма выравнивания гомологии Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, способом поиска сходства Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, путем компьютеризированного осуществления этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем ручного выравнивания и визуального контроля (см., например, Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology).

Двумя примерами алгоритмов, которые подходят для определения доли идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; и Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно через National Center for Biotechnology Information.

Доля идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также может быть определена с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за удлинение гэпа, равного 12, и штрафа за гэп, равного 4. Кроме того, доля идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с использованием алгоритма Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG (доступен на www.gcg.com), с использованием либо матрицы Blossom 62, либо матрицы PAM250 и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Информация о последовательностях типовых делеций REC представлена для 83 встречающихся в природе ортологов Cas9, описанных, например, в международной публикации PCT №№ WO2015/161276, WO2017/193107 и WO2017/093969.

(q) *Нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулы Cas9*

Нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулы Cas9 или полипептиды Cas9, например, молекулу eaCas9 или полипептид eaCas9, можно использовать в связи с любым из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

Типовые нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулы Cas9 или полипептиды Cas9, описаны в Cong et al., Science 2013, 399(6121):819-823; Wang et al., Cell 2013, 153(4):910-918; Mali et al., Science 2013, 399(6121):823-826; Jinek et al., Science 2012, 337(6096):816-821 и WO2015/161276, например, на фиг. 8.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая

молекулу Cas9 или полипептид Cas9, может быть синтетической последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, синтетическая молекула нуклеиновой кислоты может быть химически модифицирована. В некоторых вариантах осуществления, иРНК Cas9 имеет одно или несколько (например, все следующие свойства: она кэпирована, полиаденилирована, замещена 5-метилцитидином и/или псевдоуридином.

В дополнение или альтернативно, последовательность синтетической нуклеиновой кислоты может быть кодон-оптимизирована, например, по меньшей мере, один не распространенный кодон или менее распространенный кодон был заменен общим распространенным. Например, синтетическая нуклеиновая кислота может направлять синтез оптимизированной информационной иРНК, например, оптимизированной для экспрессии в системе экспрессии млекопитающих, например, описанной в настоящем документе.

В дополнение или альтернативно, нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу Cas9 или полипептид Cas9, может содержать последовательность ядерной локализации (NLS). Последовательности ядерной локализации известны.

В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 кодирована последовательностью, которая является или содержит любую из SEQ ID NO: 121, 123 или 125, или последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90. %, 91%, 92%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 121, 123 или 125. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 является или содержит любую из SEQ ID NO: 122, 124 или 125 или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 122, 123 или 125. SEQ ID NO: 121 является типовой кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу Cas9 *S. pyogenes.* SEQ ID NO: 122 является соответствующей аминокислотной последовательностью молекулы Cas9 *S. pyogenes.* SEQ ID NO: 123 является типовой кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу Cas9 *N. meningitidis.* SEQ ID NO: 124 является соответствующей аминокислотной последовательностью молекулы Cas9 *N. meningitidis.* SEQ ID NO: 125 является типовой кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу Cas9 *S. aureus.* SEQ ID NO: 126 является соответствующей аминокислотной последовательностью молекулы Cas9 *S. aureus.*

Если любая из вышеуказанных последовательностей Cas9 слита с пептидом или полипептидом на С-конце, понятно, что стоп-кодон будет удален.

(r) *Другие молекулы Cas и полипептиды Cas*

Различные типы молекул Cas или полипептидов Cas можно использовать на практике описанных в настоящем документе изобретений. В некоторых вариантах осуществления, используют молекулы Cas систем Cas II типа. В других вариантах осуществления, используют молекулы Cas из других систем Cas. Например, можно

использовать молекулы Cas I типа или III типа. Типовые молекулы Cas (и системы Cas) описаны, например, в Haft et al., PLoS Computational Biology 2005, 1(6): e60 и Makarova et al., Nature Review Microbiology 2011, 9:467-477, содержание обеих ссылок полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Типовые молекулы Cas (и системы Cas) также показаны в **таблице 3.**

Таблица 3. Системы Cas

Наименование гена‡	**Тип или подтип системы**	**Наименование из Haft *et al.*§**	**Структура кодированного белка (PDB доступы)¶**	**Семейства (и суперсемейство) кодированного белка#****	**Представители**
cas1	• Тип I • Тип II • Тип III	*cas1*	3GOD, 3LFX и 2YZS	COG1518	SERP2463, SPy1047 и *ygbT*
cas2	• Тип I • Тип II • Тип III	*cas2*	2IVY, 2I8E и 3EXC	COG1343 и COG3512	SERP2462, SPy1048, SPy1723 (N-концевой домен) и *ygbF*
cas3'	• Тип I‡‡	*cas3*	NA	COG1203	APE1232 и *ygcB*
cas3''	• Подтип I-A • Подтип I-B	НД	НД	COG2254	APE1231 и BH0336
cas4	• Подтип I-A • Подтип I-B • Подтип I-C • Подтип I-D • Подтип II-B	*cas4* и *csa1*	НД	COG1468	APE1239 и BH0340
cas5	• Подтип I-A • Подтип I-B • Подтип I-C • Подтип I-E	*cas5a*, *cas5d*, *cas5e*, *cas5h*,	3KG4	COG1688 (RAMP)	APE1234, BH0337, *devS* и *ygcI*

		cas5p, *cas5t* и *cmx5*			
cas6	• Подтип I-A • Подтип I-B • Подтип I-D • Подтип III-A • Подтип III-B	*cas6* и *cmx6*	3I4H	COG1583 и COG5551 (RAMP)	PF1131 и slr7014
cas6e	• Подтип I-E	*cse3*	1WJ9	(RAMP)	*ygcH*
cas6f	• Подтип I-F	*csy4*	2XLJ	(RAMP)	y1727
cas7	• Подтип I-A • Подтип I-B • Подтип I-C • Подтип I-E	*csa2*, *csd2*, *cse4*, *csh2*, *csp1* и *cst2*	НД	COG1857 и COG3649 (RAMP)	*devR* и *ygcJ*
cas8a1	• Подтип I-A‡‡	*cmx1*, *cst1*, *csx8*, *csx13* и CXXC-CXXC	НД	BH0338-подобный	LA3191§§ и PG2018§§
cas8a2	• Подтип I-A‡‡	*csa4* и *csx9*	НД	PH0918	AF0070, AF1873, MJ0385, PF0637, PH0918 и SSO1401
cas8b	• Подтип I-B‡‡	*csh1* и TM1802	НД	BH0338-подобный	MTH1090 и TM1802
cas8c	• Подтип I-C‡‡	*csd1* и *csp2*	НД	BH0338-подобный	BH0338
cas9	• Тип II‡‡	*csn1* и *csx12*	НД	COG3513	FTN_0757 и SPy1046
cas10	• Тип III‡‡	*cmr2*, *csm1*	НД	COG1353	MTH326,

		и *csx11*			Rv2823c[§§] и TM1794[§§]
cas10d	• Подтип I-D[‡‡]	*csc3*	НД	COG1353	slr7011
csy1	• Подтип I-F[‡‡]	*csy1*	НД	y1724-подобный	y1724
csy2	• Подтип I-F	*csy2*	НД	(RAMP)	y1725
csy3	• Подтип I-F	*csy3*	НД	(RAMP)	y1726
cse1	• Подтип I-E[‡‡]	*cse1*	НД	YgcL-подобный	*ygcL*
cse2	• Подтип I-E	*cse2*	2ZCA	YgcK-подобный	*ygcK*
csc1	• Подтип I-D	*csc1*	НД	alr1563-подобный (RAMP)	alr1563
csc2	• Подтип I-D	*csc1* и *csc2*	НД	COG1337 (RAMP)	slr7012
csa5	• Подтип I-A	*csa5*	НД	AF1870	AF1870, MJ0380, PF0643 и SSO1398
csn2	• Подтип II-A	*csn2*	НД	SPy1049-подобный	SPy1049
csm2	• Подтип III-A[‡‡]	*csm2*	НД	COG1421	MTH1081 и SERP2460
csm3	• Подтип III-A	*csc2* и *csm3*	НД	COG1337 (RAMP)	MTH1080 и SERP2459
csm4	• Подтип III-A	*csm4*	НД	COG1567 (RAMP)	MTH1079 и SERP2458
csm5	• Подтип III-A	*csm5*	НД	COG1332 (RAMP)	MTH1078 и SERP2457
csm6	• Подтип III-	APE2256 и	2WTE	COG1517	APE2256 и

	A	*csm6*			SSO1445
cmr1	• Подтип III-B	*cmr1*	НД	COG1367 (RAMP)	PF1130
cmr3	• Подтип III-B	*cmr3*	НД	COG1769 (RAMP)	PF1128
cmr4	• Подтип III-B	*cmr4*	НД	COG1336 (RAMP)	PF1126
cmr5	• Подтип III-B‡‡	*cmr5*	2ZOP и 2OEB	COG3337	MTH324 и PF1125
cmr6	• Подтип III-B	*cmr6*	НД	COG1604 (RAMP)	PF1124
csb1	• Подтип I-U	GSU0053	НД	(RAMP)	Balac_1306 и GSU0053
csb2	• Подтип I-U§§	НД	НД	(RAMP)	Balac_1305 и GSU0054
csb3	• Подтип I-U	НД	НД	(RAMP)	Balac_1303§§
csx17	• Подтип I-U	НД	НД	НД	Btus_2683
csx14	• Подтип I-U	НД	НД	НД	GSU0052
csx10	• Подтип I-U	*csx10*	НД	(RAMP)	Caur_2274
csx16	• Подтип III-U	VVA1548	НД	НД	VVA1548
csaX	• Подтип III-U	*csaX*	НД	НД	SSO1438
csx3	• Подтип III-U	*csx3*	НД	НД	AF1864
csx1	• Подтип III-U	*csa3*, *csx1*, *csx2*, DXTHG, NE0113 и TIGR02710	1XMX и 2I71	COG1517 и COG4006	MJ1666, NE0113, PF1127 и TM1812

csx15	• неизвестен	НД	НД	TTE2665	TTE2665
csf1	• Тип U	*csf1*	НД	НД	AFE_1038
csf2	• Тип U	*csf2*	НД	(RAMP)	AFE_1039
csf3	• Тип U	*csf3*	НД	(RAMP)	AFE_1040
csf4	• Тип U	*csf4*	НД	НД	AFE_1037

(iii) *Cpf1*

В некоторых вариантах осуществления, направляющая РНК или нРНК способствует специфическому ассоциированному таргетированию РНК-управляемой нуклеазы, такой как Cas9 или Cpf1, на последовательность-мишень, такую как геномная или эписомальная последовательность в клетке. В общем, нРНК могут быть мономолекулярными (состоящими из одной молекулы РНК и также альтернативно называемыми химерными) или модульными (содержащими более одной, и обычно две отдельные молекулы РНК, такие как crRNA и tracrRNA, которые обычно связаны друг с другом, в некоторых вариантах осуществления, посредством дуплексной связи). нРНК и их составные части описаны во всей литературе, в некоторых вариантах осуществления, в Briner et al. (Molecular Cell 56(2), 333-339, October 23, 2014 (Briner), который включен посредством ссылки), и в Cotta-Ramusino.

Направляющие РНК, мономолекулярные или модульные, обычно содержат таргетирующий домен, который полностью или частично комплементарен мишени, и обычно имеют длину 10-30 нуклеотидов, а в некоторых вариантах осуществления, имеют длину 16-24 нуклеотида (в некоторых вариантах 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида). В некоторых аспектах, таргетирующие домены находятся на или рядом с 5'-концом нРНК в случае нРНК Cas9, и на или рядом с 3'-концом в случае Cpf1 нРНК. Хотя вышеприведенное описание сфокусировано на нРНК для использования с Cas9, следует понимать, что были (или могут быть в будущем) открыты или изобретены другие РНК-управляемые нуклеазы, которые используют нРНК, которые в некоторой степени отличаются от тех, что описаны до сих пор. В некоторых вариантах осуществления, Cpf1 («CRISPR от Prevotella и Franciscella 1») является недавно обнаруженной РНК-направляемой нуклеазой, для функционирования которой не требуется tracrRNA. (Zetsche et al., 2015, Cell 163, 759-771 October 22, 2015 (Zetsche I), включен сюда посредством ссылки). нРНК для использования в системе редактирования генома Cpf1 обычно включает таргетирующий домен и домен комплементарности (также альтернативно называемый «рукояткой»). Следует также отметить, что в нРНК для использования с Cpf1, таргетирующий домен обычно присутствует на или рядом с 3' концом, а не на 5'-конце, как описано выше в связи с Cas9 нРНК (рукоятка находится на или рядом с 5' концом Cpf1 нРНК).

Хотя структурные различия могут существовать между нРНК разных прокариотических видов или между нРНК Cpf1 и Cas9, принципы, по которым действуют

нРНК, в целом согласованы. Благодаря такой согласованности действия, нРНК могут быть определены в общих чертах по последовательностям их таргетирующего домена, и специалисты в данной области техники поймут, что данная последовательность таргетирующего домена может быть включена в любую подходящую нРНК, включая мономолекулярную или химерную нРНК, или нРНК, которая содержит одну или несколько химических модификаций и/или модификаций последовательности (замены, дополнительные нуклеотиды, усечения и т. д.). Таким образом, в некоторых аспектах, настоящего описания нРНК могут быть описаны исключительно в терминах последовательностей их таргетирующих доменов.

В более общем плане, некоторые аспекты настоящего описания относятся к системам, способам и композициям, которые могут быть реализованы с использованием множества РНК-управляемых нуклеаз. Если не указано иное, термин нРНК следует понимать как охватывающий любую подходящую нРНК, которая может использоваться с любой РНК-управляемой нуклеазой, а не только те нРНК, которые совместимы с конкретными видами Cas9 или Cpf1. В качестве иллюстрации, термин «нРНК» в некоторых вариантах осуществления, может включать нРНК для использования с любой РНК-управляемой нуклеазой, встречающейся в системе CRISPR класса 2, такой как система типа II или типа V или CRISPR, или РНК-управляемой нуклеазой, полученной или адаптированной из них.

Некоторые типовые модификации, обсуждаемые в этом разделе, могут быть включены в любое положение в последовательности нРНК, включая, без ограничения, на или рядом с 5'-концом (например, в пределах 1-10, 1-5 или 1-2 нуклеотидов 5' конца) и/или на или рядом с 3' концом (например, в пределах 1-10, 1-5 или 1-2 нуклеотидов 3' конца). В некоторых случаях, модификации расположены внутри функциональных мотивов, таких как дуплекс повтор-антиповтор Cas9 нРНК, структура «петля на стебле» Cas9 нРНК или Cpf1 и/или таргетирующий домен нРНК.

РНК-управляемые нуклеазы содержат, но не ограничиваются ими, существующие в природе нуклеазы CRISPR класса 2, такие как Cas9 и Cpf1, а также другие нуклеазы, производные или полученные из них. С функциональной точки зрения РНК-управляемые нуклеазы определены как те нуклеазы, которые: (a) взаимодействуют с (например, образуют комплекс с) нРНК; и (b) вместе с нРНК связываются с и, необязательно, расщепляют или модифицируют область-мишень ДНК, которая содержит (i) последовательность, комплементарную таргетирующему домену нРНК и, необязательно, (ii) дополнительную последовательность, называемую «мотив, прилегающий к протоспейсеру» или «PAM», который более подробно описан ниже. Как будут проиллюстрировано в следующих примерах, РНК-управляемые нуклеазы могут быть определены, в общих чертах, по их PAM специфичности и активности расщепления, даже несмотря на то, что могут существовать различия между отдельными РНК-управляемыми нуклеазами, которые обладают одинаковой специфичностью PAM или активностью расщепления. Специалисты в данной области техники поймут, что некоторые аспекты

настоящего описания относятся к системам, способам и композициям, которые могут быть реализованы с использованием любой подходящей РНК-управляемой нуклеазы, имеющей определенную специфичность PAM и/или активность расщепления. По этой причине, если не указано иное, термин РНК-управляемая нуклеаза следует понимать как общий термин и не ограничиваться каким-либо конкретным типом (например, Cas9 или Cpf1), видами (например, *S. pyogenes* или *S. aureus)* или вариацией (например, полноразмерная или усеченная или расщепленная; природная специфичность PAM или сконструированная специфичность PAM и т. д.) РНК-управляемой нуклеазы.

Помимо распознавания конкретных ориентаций последовательностей PAM и протоспейсеров, РНК-управляемые нуклеазы, в некоторых вариантах осуществления, могут также распознавать определенные последовательности PAM. *S. aureus* Cas9, в некоторых вариантах осуществления, обычно распознает последовательность PAM NNGRRT или NNGRRV, где остатки N находятся непосредственно 3' от области, распознаваемой нРНК таргетирующим доменом. *S. pyogenes* Cas9 обычно распознает последовательности NGG PAM. И *F. novicida* Cpf1 обычно распознает последовательность TTH PAM.

Кристаллическая структура *Acidaminococcus sp.* Cpf1 в комплексе с crRNA и двухцепочечной (ds) ДНК-мишенью, включающей последовательность TTTN PAM, была получена Yamano et al. (Cell. 2016 May 5; 165(4): 949-962 (Yamano), включен сюда посредством ссылки). Cpf1, как и Cas9, имеет две доли: долю REC (распознавание) и долю NUC (нуклеазу). Доля REC содержит домены REC1 и REC2, которые не имеют сходства с какими-либо известными белковыми структурами. Между тем доля NUC содержит три домена RuvC (RuvC-I, -II и -III) и домен BH. Однако, в отличие от Cas9, доля Cpf1 REC лишена домена HNH и содержит другие домены, которые также не имеют сходства с известными белковыми структурами: структурно уникальный PI домен, три домена Wedge (WED) (WED-I, -II и - III) и нуклеазный (Nuc) домен.

Хотя Cas9 и Cpf1 имеют сходство по структуре и функциям, следует понимать, что определенные активности Cpf1 опосредуются структурными доменами, которые не аналогичны каким-либо доменам Cas9. В некоторых вариантах осуществления, расщепление комплементарной цепи ДНК-мишени, по-видимому, опосредуется доменом Nuc, который последовательно и пространственно отличается от домена HNH Cas9. Кроме того, не таргетирующая часть Cpf1 нРНК (рукоятка) принимает структуру псевдоузла, а не структуру «петля на стебле», образованную дуплексом повтор:антиповтор в Cas9 нРНК.

В настоящем документе представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК-управляемые нуклеазы, например Cas9, Cpf1 или их функциональные фрагменты. Примеры нуклеиновых кислот, кодирующих РНК-управляемые нуклеазы, были описаны ранее (см., например, Cong 2013; Wang 2013; Mali 2013; Jinek 2012).

b. Подходы к редактированию генома

В общем, следует понимать, что изменение любого гена в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, может быть опосредовано любым

механизмом, и что любые способы не ограничиваются конкретным механизмом. Типовые механизмы, которые могут быть связаны с изменением гена, включают, но не ограничены ими, не гомологичное соединение концов (например, классическое или альтернативное), соединение концов, опосредованное микрогомологией (MMEJ), репарацию, направляемую гомологией (например, опосредованную эндогенной донорской матрицей), зависимый от синтеза отжиг цепи (SDSA), отжиг одиночной цепи, инвазию одиночной цепи, репарацию разрыва одиночной нити (SSBR), репарацию ошибочного спаривания (MMR), эксцизионную репарацию оснований (BER), межцепочечную поперечную сшивку (ICL), синтез «через/сквозь» поврежденные участки (TLS) или безошибочную пострепликативную репарацию (PRR). В настоящем документе описаны типовые способы таргетного нокаута одного или обоих аллелей локуса *TGFBR2*.

1) Подходы NHEJ к таргетированию гена

Как описано в настоящем документе, индуцированное нуклеазой негомологичное соединение концов (NHEJ) можно использовать для специфичных к гену-мишени нокаутов. Индуцированное нуклеазой NHEJ также можно использовать для удаления (например, делеции) вставок последовательности в представляющем интерес гене.

Не желая быть связанными теорией, полагают, что в некоторых вариантах осуществления, геномные изменения, связанные с описанными в настоящем документе способами, зависят от индуцированного нуклеазой NHEJ и подверженной ошибкам природы пути репарации NHEJ. NHEJ восстанавливает двухцепочечный разрыв ДНК путем соединения двух концов; однако, как правило, исходная последовательность восстанавливается только в том случае, если два совместимых конца, точно так же, как они были образованы двухцепочечным разрывом, идеально лигированы. Концы ДНК двухцепочечного разрыва часто подвергают ферментативной обработке, что приводит к добавлению или удалению нуклеотидов на одной или обеих цепях перед повторным соединением концов. Это приводит к наличию инсерционных и/или делеционных (индел) мутаций в последовательности ДНК на сайте репарации NHEJ. Две трети этих мутаций обычно изменяют рамку считывания и, следовательно, производят не функциональный белок. Кроме того, мутации, которые поддерживают рамку считывания, но которые вставляют или удаляют значительную часть последовательности, могут нарушить функциональность белка. Это зависит от локуса, поскольку мутации в критических функциональных доменах, вероятно, менее переносимы, чем мутации в не критических областях белка. Мутации вставки/делеции, создаваемые NHEJ, непредсказуемы по своей природе; однако в данном месте разрыва предпочтение отдается определенным последовательностям вставки/делеции, которые избыточно представлены в популяции, вероятно, из-за небольших участков микрогомологии. Длина делеций может широко варьироваться; чаще всего в диапазоне 1-50 по, но они могут легко достигать более 100-200 по. Вставки обычно короче и часто содержат короткие дубликаты последовательности, непосредственно окружающей место разрыва. Однако можно получить большие вставки, и в этих случаях вставленная последовательность часто прослеживается до других участков

генома или плазмидной ДНК, присутствующей в клетках.

Поскольку NHEJ является мутагенным процессом, его также можно использовать для удаления небольших мотивов последовательности, поскольку создание конкретной конечной последовательности не требуется. Если двухцепочечный разрыв таргетирован рядом с короткой последовательностью-мишенью, делеционные мутации, вызванные репарацией NHEJ, часто охватывают и, следовательно, удаляют нежелательные нуклеотиды. Для делеции более крупных сегментов ДНК, введение двух двухцепочечных разрывов, по одному с каждой стороны последовательности, может привести к NHEJ между концами с удалением всей промежуточной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, пара нРНК может использоваться для введения двух двухцепочечных разрывов, что приводит к делеции промежуточных последовательностей между двумя разрывами.

Оба этих подхода можно использовать для делеции определенных последовательностей ДНК; тем не менее, склонность к ошибкам NHEJ может по-прежнему приводить к возникновению мутаций вставки/делеции в месте репарации.

Как двухцепочечные расщепляющие молекулы eaCas9, так и одноцепочечные молекулы eaCas9, или никазы, можно использовать в способах и композициях, описанных в настоящем документе, для создания NHEJ-опосредованных вставок/делеций. NHEJ-опосредованные вставки/делеции, направленные на ген, например, кодирующую область, например, раннюю кодирующую область представляющего интерес гена, можно использовать для нокаута (т.е. элиминации экспрессии) представляющего интерес гена. Например, ранняя кодирующая область представляющего интерес гена содержит последовательность, следующую сразу за сайтом начала транскрипции, в пределах первого экзона кодирующей последовательности или в пределах 500 по от сайта начала транскрипции (например, менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по).

В некоторых вариантах осуществления, NHEJ-опосредованные вставки/делеции вводят в локус *TGFBR2*. Отдельные нРНК или пары нРНК, таргетирующие ген, представлены вместе с двухцепочечной нуклеазой Cas9 или одноцепочечной никазой.

(1) Размещение двухцепочечных или одноцепочечных разрывов относительно положения-мишени

В некоторых вариантах осуществления, в которых нРНК и нуклеаза Cas9 создают двухцепочечный разрыв с целью индукции NHEJ-опосредованных вставок/делеций, нРНК, например, мономолекулярная (или химерная) или модульная молекула нРНК, сконфигурирована так, чтобы расположить один двухцепочечный разрыв в непосредственной близости от нуклеотида положения-мишени. В некоторых вариантах осуществления, сайт расщепления находится на расстоянии 0-30 по от положения-мишени (например, менее 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 по от положения-мишени).

В некоторых вариантах осуществления, в которых две нРНК, образующие комплекс с никазами Cas9, индуцируют два однонитевых разрыва с целью индуцирования NHEJ-опосредованных вставок/делеций, две нРНК, например, независимо, мономолекулярные

(или химерные) или модульные нРНК, сконфигурированы так, чтобы расположить два одноцепочечных разрыва цепи так, чтобы обеспечить репарацию NHEJ нуклеотида в положении-мишени. В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурированы для размещения разрезов в одном и том же положении или в пределах нескольких нуклеотидов друг от друга, на разных цепях, по существу имитируя двухцепочечный разрыв. В некоторых вариантах осуществления, более близкий ник находится на расстоянии 0-30 по от положения-мишени (например, менее 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 от положения-мишени), и два ника находятся в пределах 25-55 по друг от друга (например, между 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, 25-30, 50-55, 45-55, 40-55, 35-55, 30-55, 30-50, 35-50, 40-50, 45-50, 35-45 или 40-45 по) и не более 100 по друг от друга (например, не более 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 по). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурированы так, чтобы размещать однонитевой разрыв по обе стороны от нуклеотида положения-мишени.

Как двухцепочечные расщепляющие молекулы eaCas9, так и одноцепочечные молекулы eaCas9, или никазы, можно использовать в способах и композициях, описанных в настоящем документе, для создания разрывов с обеих сторон от положения-мишени. Двухцепочечные или парные одноцепочечные разрывы могут быть созданы по обе стороны от положения-мишени для удаления последовательности нуклеиновой кислоты между двумя разрезами (например, области между двумя разрывами в делеции). В некоторых вариантах осуществления, две нРНК, например, независимо, мономолекулярная (или химерная) или модульная нРНК, сконфигурированы так, чтобы расположить двухцепочечный разрыв по обе стороны от положения-мишени. В альтернативном варианте осуществления, три нРНК, например, независимо, мономолекулярные (или химерные) или модульные нРНК, сконфигурированы так, чтобы расположить двухцепочечный разрыв (т.е. один комплекс нРНК с нуклеазой cas9) и два одноцепочечных разрыва или парные одноцепочечные разрывы. (т.е. два комплекса нРНК с никазами Cas9) по обе стороны от положения-мишени. В другом варианте осуществления, четыре нРНК, например, независимо, мономолекулярные (или химерные) или модульные нРНК, сконфигурированы так, чтобы создать две пары одноцепочечных разрывов (т.е. две пары из двух комплексов нРНК с никазами Cas9) по обе стороны от положения-мишени. Двухцепочечные разрывы или более близкий из двух одноцепочечных разрывов в паре в идеале должен находиться в пределах 0-500 по от положения-мишени (например, не более 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 или 25 по от положения-мишени). Когда используют никазы, два ника в паре находятся в пределах 25-55 по друг от друга (например, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, 25-30, 50-55, 45-55, 40-55, 35-55, 30-55, 30-50, 35-50, 40-50, 45-50, 35-45 или 40-45 по) и не более 100 по друг от друга (например, не более 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 по).

2) Таргетный нокдаун

В отличие от CRISPR/Cas-опосредованного нокаута гена, который навсегда элиминирует или снижает экспрессию путем мутации гена на уровне ДНК, CRISPR/Cas нокдаун позволяет временно снизить экспрессию гена за счет использования

искусственных факторов транскрипции. Мутации ключевых остатков в обоих доменах расщепления ДНК белка Cas9 (например, мутации D10A и H840A) приводят к образованию каталитически неактивного Cas9 (eiCas9, также известного как мертвый Cas9 или dCas9). Каталитически неактивный Cas9 образует комплекс с нРНК и локализуется в последовательности ДНК, определенной таргетирующим доменом этой нРНК, однако он не расщепляет ДНК-мишень. Слияние dCas9 с эффекторным доменом, например, с доменом репрессии транскрипции, делает возможным рекрутинг эффектора в любой сайт ДНК, определенный нРНК. Хотя было показано, что сам eiCas9 может блокировать транскрипцию при рекрутинге в ранние области в кодирующей последовательности, более надежная репрессия может быть достигнута путем слияния домена репрессии транскрипции (например, KRAB, SID или ERD) с Cas9 и рекрутинге его в промоторную область гена. Вероятно, что таргетирование гиперчувствительных областей ДНКазы I промотора может привести к более эффективной репрессии или активации гена, потому что эти области с большей вероятностью будут доступны для белка Cas9 и также более вероятно будут содержать сайты для эндогенных факторов транскрипции. В частности, для репрессии гена в настоящем документе предполагается, что блокирование сайта связывания эндогенного фактора транскрипции может способствовать подавлению экспрессии гена. В другом варианте осуществления, eiCas9 может быть слита с белком, модифицирующим хроматин. Изменение статуса хроматина может привести к снижению экспрессии гена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, молекула нРНК может быть направлена на известные элементы ответа транскрипции (например, промоторы, энхансеры и т. д.), известные восходящие активирующие последовательности (UAS) и/или последовательности с неизвестной или известной функцией, которые предположительно способны контролировать экспрессию ДНК-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, нокдаун гена, опосредованный CRISPR/Cas, можно использовать для снижения экспрессии одного или нескольких генов, экспрессируемых Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, в которых слитый белок eiCas9 или eiCas9, описанный в настоящем документе, используют для нокдауна локуса *TGFBR2,* отдельные нРНК или пары нРНК, таргетирующие оба или все гены, представлены вместе со слитым белком eiCas9 или eiCas9.

3) Одноцепочечный отжиг

Одноцепочечный отжиг (SSA) представляет собой еще один процесс репарации ДНК, который восстанавливает двухцепочечный разрыв между двумя повторяющимися последовательностями, присутствующими в нуклеиновой кислоте-мишени. Повторяющиеся последовательности, используемые в пути SSA, обычно имеют длину более 30 нуклеотидов. Резекция на концах разрыва происходит для выявления повторяющихся последовательностей на обеих цепях нуклеиновой кислоты-мишени. После резекции, одноцепочечные «липкие» концы, содержащие повторяющиеся последовательности, покрывают белком RPA для предотвращения неправильного отжига

повторяющихся последовательностей, например, между собой. RAD52 связывается с каждой из повторяющихся последовательностей на «липких» концах и выравнивает последовательности, чтобы обеспечить отжиг комплементарных повторяющихся последовательностей. После отжига, одноцепочечные лоскуты «липких» концов отщепляют. Новый синтез ДНК заполняет любые гэпы, и лигирование восстанавливает дуплекс ДНК. В результате обработки последовательность ДНК между двумя повторами удаляется. Длина делеции может зависеть от многих факторов, включая расположение двух используемых повторов, а также путь или процессивность резекции.

В отличие от путей HDR, SSA не требует матричной нуклеиновой кислоты для изменения или коррекции последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Вместо этого используют комплементарную повторяющуюся последовательность.

4) Другие пути репарации ДНК

A) SSBR (репарация одиночного разрыва цепи)

Одноцепочечные разрывы (SSB) в геноме репарируют с помощью пути SSBR, который является механизмом, отличным от механизмов репарации DSB, обсужденных выше. Путь SSBR состоит из четырех основных этапов: обнаружение SSB, обработка концов ДНК, заполнение гэпов в ДНК и лигирование ДНК. Более подробное объяснение дано в Caldecott, Nature Reviews Genetics 9, 619-631 (August 2008), и в настоящем документе приводится краткое изложение.

На первой стадии, когда формируется SSB, PARP1 и/или PARP2 распознают разрыв и привлекают механизм репарации. Связывание и активность PARP1 на разрывах ДНК временны и, по-видимому, ускоряет SSBr, способствуя фокусному накоплению или стабильности белковых комплексов SSBr в очаге повреждения. Возможно, наиболее важным из этих белков SSBr является XRCC1, который функционирует как молекулярный каркас, который взаимодействует, стабилизирует и стимулирует множество ферментных компонентов процесса SSBr, включая белок, ответственный за очистку 3 'и 5' концов ДНК. В некоторых вариантах осуществления, XRCC1 взаимодействует с несколькими белками (ДНК полимераза бета, PNK и три нуклеазы, APE1, APTX и APLF), которые способствуют конечной обработки. APE1 обладает активностью эндонуклеазы. APLF демонстрирует активность эндонуклеазы и от 3 'до 5' активность экзонуклеазы. APTX обладает активностью эндонуклеазы и 3’-5' экзонуклеазы.

Эта конечная обработка является важной стадией SSBR, поскольку 3'- и/или 5'-концы большинства, если не всех, SSB «повреждены». Конечная обработка обычно включает восстановление поврежденного 3'-конца до гидроксилированного состояния и/или поврежденного 5'-конца до фосфатной группы, так что концы становятся пригодными для лигирования. Ферменты, которые могут обрабатывать поврежденные 3'-концы, включают PNKP, APE1 и TDP1. Ферменты, которые могут обрабатывать поврежденные 5'-концы, включают PNKP, ДНК-полимеразу бета и APTX. LIG3 (ДНК лигаза III) также может участвовать в конечной обработке. После очистки концов может произойти заполнение гэпа.

На стадии заполнения гэпа ДНК обычно присутствуют белки PARP1, ДНК полимераза бета, XRCC1, FEN1 (эндонуклеаза лоскута 1), ДНК полимераза дельта/эпсилон, PCNA и LIG1. Есть два способа заполнения гэпов, репарация короткими последовательностями и репарация длинными последовательностями. Репарация короткими последовательностями включает вставку одного отсутствующего нуклеотида. На некоторых SSB «заполнение гэпа» может продолжать смещение двух или нескольких нуклеотидов (сообщалось о смещении до 12 оснований). FEN1 является эндонуклеазой, удаляющей смещенные 5'-остатки. Множественные ДНК-полимеразы, включая Pol β, вовлечены в репарацию SSB, причем выбор ДНК полимеразы зависит от источника и типа SSB.

На четвертой стадии ДНК-лигаза, такая как LIG1 (лигаза I) или LIG3 (лигаза III), катализирует соединение концов. При репарации короткими последовательностями используют Лигазу III, и при репарации длинными последовательностями используют Лигазу I.

Иногда SSBR связан с репликацией. Этот путь может вовлекать один или несколько из CtIP, MRN, ERCC1 и FEN1. Дополнительные факторы, которые могут способствовать SSBR, включают: aPARP, PARP1, PARP2, PARG, XRCC1, ДНК полимеразу b, ДНК полимеразу d, ДНК полимеразу e, PCNA, LIG1, PNK, PNKP, APE1, APTX, APLF, TDP1, LIG3, FEN1, CtIP, MRN и ERCC1.

B) MMR (репарация ошибочно спаренных оснований)

Клетки содержат три пути эксцизионной репарации: MMR, BER и NER. Пути эксцизионной репарации имеют общий признак в том, что они обычно распознают повреждение на одной цепи ДНК, затем экзо/эндонуклеазы удаляют повреждение и оставляют гэп в 1-30 нуклеотидов, который затем заполняется ДНК полимеразой и, наконец, запечатывается лигазой. Более полная картина дана в Li, Cell Research (2008) 18:85-98, и краткое изложение представлено настоящем документе.

Репарация ошибочно спаренных оснований (MMR) работает на ошибочно спаренных основаниях ДНК. Комплексы MSH2/6 или MSH2/3 обладают активностью АТФаз, которая играет важную роль в распознавании ошибочного спаривания и инициации репарации. MSH2/6 предпочтительно распознает ошибочное спаривание оснований и идентифицирует ошибочные пары из 1 или 2 нуклеотидов, тогда как MSH2/3 преимущественно распознает более крупные ошибочные пары ID.

hMLH1 гетеродимеризуется с hPMS2 с образованием hMutLα, который обладает активностью АТФазы и важен для множества стадий MMR. Он обладает зависимой от PCNA/фактора репликации C (RFC) активностью эндонуклеазы, которая играет важную роль в 3' ник-направленном MMR с участием EXO1. (EXO1 является участником как HR, так и MMR.) Он регулирует терминацию вызванного ошибочным спариванием вырезания. Лигаза I является соответствующей лигазой для этого пути. Дополнительные факторы, которые могут способствовать MMR, включают: EXO1, MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2, MLH3, DNA Pol d, RPA, HMGB1, RFC и ДНК лигазу I.

C) Эксцизионная репарация оснований (BER)

Путь эксцизионной репарации оснований (BER) активен на протяжении всего клеточного цикла; он отвечает в первую очередь за удаление небольших, не искажающих спираль повреждений оснований генома. Наоборот, родственный путь эксцизионной репарации нуклеотида (обсуждается в следующем разделе) восстанавливает объемные повреждения, искажающие спираль. Более подробное объяснение дано в Caldecott, Nature Reviews Genetics 9, 619-631 (August 2008), и в настоящем документе приводится краткое изложение.

При повреждении основания ДНК инициируется эксцизионная репарация оснований (BER), и процесс можно упростить до пяти основных стадий: (a) удаление поврежденного основания ДНК; (b) рассечение последующего основного сайта; (c) очистка концов ДНК; (d) вставка правильного нуклеотида в репарационный гэп; и (e) лигирование оставшегося ника в основной цепи ДНК. Эти последние стадии аналогичны SSBR.

На первой стадии ДНК гликозилаза, специфичная для повреждения, вырезает поврежденное основание путем расщепления N-гликозидной связи, связывающей основание с сахарно-фосфатным остовом. Затем AP эндонуклеаза-1 (APE1) или бифункциональные ДНК гликозилазы с ассоциированной активностью лиазы рассекают фосфодиэфирный остов с образованием однонитевого разрыва ДНК (SSB). Третья стадия BER включает очистку концов ДНК. Четвертая стадия в BER проводится Pol β, который добавляет новый комплементарный нуклеотид в гэп репарации, и на конечной стадии XRCC1/лигаза III герметично закрывает оставшийся ник в основной цепи ДНК. Это завершает путь короткой последовательности BER, в котором большая часть (~80%) поврежденных оснований ДНК репарируется. Однако, если 5'-концы на стадии 3 устойчивы к активности конечной обработки, после вставки одного нуклеотида с помощью Pol β происходит переключение полимеразы на репликативные ДНК полимеразы, Pol δ/ε, которые затем добавляют еще ~2-8 нуклеотидов в гэп репарации ДНК. Это создает 5'-лоскутную структуру, которая распознается и вырезается флэп-эндонуклеазой-1 (FEN-1) в ассоциации с фактором процессивности ядерного антигена пролиферирующей клетки (PCNA). Затем ДНК-лигаза I герметично закрывает оставшийся ник в основной цепи ДНК и завершает BER с длинными последовательностями. Дополнительные факторы, которые могут способствовать пути BER, включают: ДНК гликозилазу, APE1, Polb, Pold, Pole, XRCC1, лигазу III, FEN-1, PCNA, RECQL4, WRN, MYH, PNKP и APTX.

D) Эксцизионная репарация нуклеотида (NER)

Эксцизионная репарация нуклеотида (NER) является важным механизмом эксцизии, который удаляет объемные искажающие спираль повреждения из ДНК. Дополнительные сведения о NER даны в Marteijn et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology 15, 465-481 (2014), а краткое изложение приведено в настоящем документе. NER - широкий путь, охватывающий два меньших пути: глобальный геномный NER (GG-NER) и NER репарацию, сопряженную с транскрипцией (TC-NER). GG-NER и TC-NER используют разные факторы для распознавания повреждений ДНК. Тем не менее, они используют один

и тот же механизм для разрезания, репарации и лигирования повреждения.

Как только повреждение обнаружено, клетка удаляет короткий одноцепочечный сегмент ДНК, содержащий повреждение. Эндонуклеазы XPF/ERCC1 и XPG (кодированные ERCC5) удаляют повреждение путем разрезания поврежденной цепи с обеих сторон повреждения, что приводит к образованию однонитевого гэпа из 22-30 нуклеотидов. Затем клетка выполняет синтез заполнения гэпов ДНК и лигирование. В этот процесс вовлечены: PCNA, RFC, ДНК Pol δ, ДНК Pol ε или ДНК Pol κ, а также ДНК лигаза I или XRCC1/лигаза III. Реплицирующиеся клетки склонны использовать ДНК pol ε и ДНК лигазу I, в то время как не реплицирующиеся клетки склонны использовать ДНК Pol δ, ДНК Pol κ и комплекс XRCC1/лигаза III для выполнения стадии лигирования.

NER может включать следующие факторы: XPA-G, POLH, XPF, ERCC1, XPA-G и LIG1. Сопряженный с транскрипцией NER (TC-NER) может включать следующие факторы: CSA, CSB, XPB, XPD, XPG, ERCC1 и TTDA. Дополнительные факторы, которые могут способствовать пути репарации NER, включают XPA-G, POLH, XPF, ERCC1, XPA-G, LIG1, CSA, CSB, XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG, TTDA, UVSSA, USP7, CETN2, RAD23B, UV-DDB, CAK субкомплекс, RPA и PCNA.

E) Межнитевая поперечная сшивка (ICL)

Специализированный путь, называемый путем репарации ICL, репарирует межнитевые поперечные сшивки. Межнитевые поперечные сшивки или ковалентные поперечные сшивки между основаниями в разных цепях ДНК могут происходить во время репликации или транскрипции. Репарация ICL включает координацию множества процессов репарации, в частности нуклеолитическую активность, синтез «через/сквозь» поврежденные участки (TLS) и HDR. Нуклеазы привлекаются для вырезания ICL по обе стороны от поперечно-сшитых оснований, в то время как TLS и HDR координируются для восстановления разрезанных цепей. В репарацию ICL могут быть вовлечены следующие факторы: эндонуклеазы, например, XPF и RAD51C, эндонуклеазы, такие как RAD51, полимеразы «через/сквозь» поврежденные участки, например ДНК полимераза дзета и Rev1), и белки анемии Фанкони (FA), например FancJ.

F) Другие пути

У млекопитающих существует несколько других путей репарации ДНК. Синтез «через/сквозь» поврежденные участки (TLS) является путем репарации одноцепочечного разрыва, оставшегося после дефектного события репликации, и содержит полимеразы «через/сквозь» поврежденные участки, например, ДНК polζ и Rev1. Безошибочная пострепликационная репарация (PRR) является еще одним путем репарации одноцепочечного разрыва, оставшегося после дефектного события репликации.

5) Примеры нРНК в способах редактирования генома

Любая из описанных в настоящем документе молекул нРНК может использоваться с любыми молекулами Cas9, которые создают двухцепочечный разрыв или одноцепочечный разрыв, чтобы изменить последовательность нуклеиновой кислоты-мишени, например, положение-мишень или генетическую сигнатуру-мишень. В некоторых

примерах, нуклеиновая кислота -мишень находится в или рядом с локусом *TGFBR2,* например, в любом из описанных. В некоторых вариантах осуществления, молекула рибонуклеиновой кислоты, такая как молекула нРНК, и белок, такой как белок Cas9 или его варианты, вводят в любую из сконструированных клеток, представленных в настоящем документе. Молекулы нРНК, используемые в этих способах, описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК, например химерная нРНК, сконфигурирована так, что она содержит одно или несколько из следующих свойств;

a) она может позиционировать, например, при таргетировании молекулы Cas9, которая создает двухцепочечные разрывы, двухцепочечный разрыв (i) в пределах 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 нуклеотидов от положения-мишени, или (ii) достаточно близко, чтобы положение-мишень находилось в области конечной резекции;

b) она имеет таргетирующий домен из, по меньшей мере, 16 нуклеотидов, например, таргетирующий домен из (i) 16, (ii), 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25 или (xi) 26 нуклеотидов; а также

c) (i) проксимальный и хвостовой домен, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из встречающихся в природе хвостового и проксимального домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(ii) имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающейся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iii) имеется, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен своему соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности, например, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающихся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iv) хвостовой домен имеет длину, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов, например, он содержит, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов из встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов; или

(v) хвостовой домен содержит 15, 20, 25, 30, 35, 40 нуклеотидов или все соответствующие части встречающегося в природе хвостового домена, например,

встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis.*

В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(iii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(iv). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(v). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(vi). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(vii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(viii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(ix). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(x). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(xi). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и c. В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a, b и c. В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(i) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(i) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(iv) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iv) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(v) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(v) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(vi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vi) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(viii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(viii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(ix) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ix) и c(ii). В некоторых вариантах

осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(x) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(x) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(xi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(xi) и c(ii).

В некоторых вариантах осуществления, нРНК, например химерная нРНК, сконфигурирована так, что она содержит одно или несколько из следующих свойств;

a) одна или обе нРНК могут позиционироваться, например, при таргетировании молекулу Cas9, которая делает разрывы одной цепи, разрыв одной цепи в пределах (i) 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 нуклеотидов от положения-мишени, или (ii) достаточно близко, чтобы положение-мишень находилось в области конечной резекции;

b) одна или обе имеют таргетирующий домен из, по меньшей мере, 16 нуклеотидов, например, таргетирующий домен из (i) 16, (ii), 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25 или (xi) 26 нуклеотидов; и

c) (i) проксимальный и хвостовой домен, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из встречающихся в природе хвостового и проксимального домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(ii) имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающейся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iii) имеется по меньшей мере 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен своему соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности, например, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающихся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iv) хвостовой домен имеет длину, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов, например, он содержит, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов из встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов; или

(v) хвостовой домен содержит 15, 20, 25, 30, 35, 40 нуклеотидов или все соответствующие части встречающегося в природе хвостового домена, например,

встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis.*

В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(iii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(iv). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(v). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(vi). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(vii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(viii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(ix). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(x). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и b(xi). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a и c. В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a, b и c. В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(i) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(i) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(iv) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(iv) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(v) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(v) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(vi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vi) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(vii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(viii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(viii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(ix) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(ix) и c(ii). В некоторых вариантах

осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(x) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(x) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что имеет свойства: a(i), b(xi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, нРНК сконфигурирована так, что она имеет свойства: a(i), b(xi) и c(ii).

В некоторых вариантах осуществления, нРНК используют с молекулой никазы Cas9, имеющей активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в D10, например, мутацию D10A.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК используют с молекулой никазы Cas9, имеющей активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в H840, например, H840A.

В некоторых вариантах осуществления, пара нРНК, например пара химерных нРНК, содержащая первую и вторую нРНК, сконфигурирована так, что они обладают одним или несколькими из следующих свойств;

a) одна или обе нРНК могут позиционироваться, например, при таргетировании молекулы Cas9, которая создает разрывы одной цепи, разрыв одной цепи в пределах (i) 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 нуклеотидов от положения-мишени, или (ii) достаточно близко, чтобы положение-мишень находилось в области конечной резекции;

b) один или оба имеют таргетирующий домен из, по меньшей мере, 16 нуклеотидов, например, таргетирующий домен из (i) 16, (ii), 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25 или (xi) 26 нуклеотидов;

c) для одной или обеих:

(i) проксимальный и хвостовой домен, взятые вместе, содержат, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из встречающихся в природе хвостового и проксимального домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(ii) имеется, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, например, по меньшей мере, 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 или 53 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающейся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iii) имеется по меньшей мере 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или 54 нуклеотида от 3' до последнего нуклеотида второго домена комплементарности, который комплементарен своему соответствующему нуклеотиду первого домена комплементарности, например, по меньшей мере, 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 или

54 нуклеотида из соответствующей последовательности встречающихся в природе нРНК *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis,* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов;

(iv) хвостовой домен имеет длину, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов, например, он содержит, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нуклеотидов из встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis;* или последовательность, отличающуюся на не более чем 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов; или

(v) хвостовой домен содержит 15, 20, 25, 30, 35, 40 нуклеотидов или все соответствующие части встречающегося в природе хвостового домена, например, встречающегося в природе хвостового домена *S. pyogenes, S. thermophilus, S. aureus* или *N. meningitidis;*

d) нРНК сконфигурированы таким образом, что при гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью они разделяются 0-50, 0-100, 0-200, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 30 или, по меньшей мере, 50 нуклеотидами;

e) разрывы, сделанные первой нРНК и второй нРНК находятся на разных цепях; и

f) PAM обращены наружу.

В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(iii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(iv). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(v). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(vi). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и b(vii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(viii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы таким образом, что они обладают свойствами: a и b(ix). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(x). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a и b(xi). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a и c. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что обладают свойствами: a, b и c. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе

нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(i), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ii), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iii), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iv) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iv) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iv), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(iv), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы таким образом, что они обладают свойствами: a(i), b(iv), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(v), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vi), c, d и e. В некоторых

вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(vii), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(viii) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(viii) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(viii), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(viii), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(viii), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(ix), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(x), c, d и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi) и c(i). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi) и c(ii). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi), c и d. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi), c и e. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе нРНК сконфигурированы так, что они обладают свойствами: a(i), b(xi), c, d и e.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК используют с молекулой никазы Cas9, имеющей активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную

активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в D10, например, с мутацией D10A.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК используют с молекулой никазы Cas9, имеющей активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в H840, например, H840A. В некоторых вариантах осуществления, нРНК используют с молекулой никазы Cas9, имеющей активность RuvC, например, с молекулой Cas9, имеющей инактивированную активность HNH, например, с молекулой Cas9, имеющей мутацию в N863, например, N863A.

6) Функциональный анализ агентов для редактирования генов

Любая из молекул Cas9, молекул нРНК, комплексов молекула Cas9/молекула нРНК, может быть оценена известными в данной области техники способами или как описано в настоящем документе. Например, типовые способы оценки эндонуклеазной активности молекулы Cas9 описаны, например, в Jinek *et al.*, SCIENCE 2012, 337(6096):816-821.

G) Анализ связывания и расщепления: тестирование активности эндонуклеазы молекулы Cas9

Способность комплекса молекула Cas9/молекула нРНК связываться и расщеплять нуклеиновую кислоту-мишень может быть оценена с помощью анализа плазмидного расщепления. В этом анализе, синтетическую или транскрибируемую *in vitro* молекулу нРНК перед реакцией подвергают предварительному отжигу путем нагревания до 95°C и медленного охлаждения до комнатной температуры. Нативную или линеаризованную рестрикционным фрагментом плазмидную ДНК (300 нг (~8 нМ)) инкубируют в течение 60 мин при 37°C с очищенной молекулой белка Cas9 (50-500 нМ) и иРНК (50-500 нМ, 1:1) в буфер для расщепления плазмиды Cas9 (20 мМ HEPES pH 7,5, 150 мМ KCl, 0,5 мМ DTT, 0,1 мМ EDTA) с или без 10 мМ $MgCl_2$. Реакции останавливают 5X загрузочным буфером ДНК (30% глицерин, 1,2% SDS, 250 мМ EDTA), разделяют электрофорезом в 0,8 или 1% агарозном геле и визуализируют окрашиванием бромидом этидия. Полученные продукты расщепления показывают, расщепляет ли молекула Cas9 обе цепи ДНК или только одну из двух цепей. Например, линейные продукты ДНК указывают на расщепление обеих цепей ДНК. Содержащие разрыв открытые циркулярные продукты указывают на то, что только одна из двух нитей расщеплена.

Альтернативно, способность комплекса молекула Cas9/молекула нРНК связываться и расщеплять нуклеиновую кислоту-мишень может быть оценена в анализе расщепления олигонуклеотидной ДНК. В этом анализе, ДНК олигонуклеотиды (10 пмоль) радиоактивно метят путем инкубации с 5 единицами полинуклеотидкиназы T4 и ~3-6 пмоль (~20-40 мКи) [γ-^{32}P]-АТФ в 1X реакционном буфере полинуклеотидкиназы T4 при 37°C в течение 30 мин в 50 мкл реакционной смеси. После тепловой инактивации (65°C в течение 20 мин) реакции очищают через колонку для удаления не включенной метки. Дуплексные субстраты (100 нМ) получают путем отжига меченых олигонуклеотидов с эквимолярными количествами немеченого комплементарного олигонуклеотида при 95°C в течение 3 минут с

последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Для анализов расщепления молекулы нРНК отжигают путем нагревания до 95°C в течение 30 с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Cas9 (конечная концентрация 500 нМ) предварительно инкубируют с отожженными молекулами нРНК (500 нМ) в буфере для анализа расщепления (20 мМ HEPES pH 7,5, 100 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ DTT, 5% глицерин) в общем объеме 9 мкл. Реакции инициируют добавлением 1 мкл ДНК-мишени (10 нМ) и инкубируют в течение 1 ч при 37°C. Реакции гасят добавлением 20 мкл загрузочного красителя (5 мМ EDTA, 0,025% SDS, 5% глицерина в формамиде) и нагревают до 95°C в течение 5 мин. Продукты расщепления разделяют на 12% денатурирующих полиакриламидных гелях, содержащих 7 М мочевину, и визуализируют формированием изображения на люминесцентном фосфорном покрытии. Полученные продукты расщепления указывают на то, расщепляется ли комплементарная цепь, не комплементарная цепь или обе.

Один или оба этих анализа можно использовать для оценки пригодности любой из представленных молекул нРНК или Cas9.

H) Анализ связывания: тестирование связывания молекулы Cas9 с ДНК-мишенью

Типовые способы оценки связывания молекулы Cas9 с ДНК-мишенью описаны, например, в Jinek *et al.*, SCIENCE 2012; 337(6096):816-821.

Например, в анализе изменения электрофоретической подвижности дуплексы ДНК-мишени образуются путем смешивания каждой цепи (10 нмоль) в деионизированной воде, нагревания до 95°C в течение 3 минут и медленного охлаждения до комнатной температуры. Все ДНК очищают на 8% нативных гелях, содержащих 1X TBE. Полосы ДНК визуализируют УФ-затенением, вырезают и элюируют путем вымачивания кусочков геля в H_2O, обработанном DEPC. Элюированную ДНК осаждают этанолом и растворяют в H_2O, обработанном DEPC. Образцы ДНК имеют 5' конец, меченый [γ-32P]-АТФ с использованием полинуклеотидкиназы T4 в течение 30 мин при 37°C. Полинуклеотидкиназу денатурируют нагреванием при 65°C в течение 20 мин, и не включенную радиоактивную метку удаляют с помощью колонки. Анализы связывания проводят в буфере, содержащем 20 мМ HEPES pH 7,5, 100 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ DTT и 10% глицерин в общем объеме 10 мкл. Молекулу белка Cas9 программируют с помощью эквимолярных количеств предварительно отожженной молекулы нРНК и титруют от 100 пМ до 1 мкМ. Радиоактивно меченную ДНК добавляют до конечной концентрации 20 пМ. Образцы инкубируют в течение 1 ч при 37°C и разделяют при 4°C на 8% нативном полиакриламидном геле, содержащем 1X TBE и 5 мМ $MgCl_2$. Гели сушат и ДНК визуализируют формированием изображения на люминесцентном фосфорном покрытии.

I) Способы измерения термостабильности комплексов Cas9/нРНК

Термостабильность рибонуклеопротеиновых (RNP) комплексов Cas9-нРНК может быть определена с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) и других методов. Термостабильность белка может увеличиваться при благоприятных условиях, таких как добавление связывающей молекулы РНК, например, нРНК. Таким

образом, информация, касающаяся термостабильности комплекса Cas9/нРНК полезна для определения того, является ли комплекс стабильным.

J) Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF)

Термостабильность рибонуклеопротеиновых комплексов Cas9-нРНК (RNP) может быть измерена с помощью DSF. Комплексы RNP, как описано ниже, включают последовательность рибонуклеотидов, таких как РНК или нРНК, и белок, такой как белок Cas9 или его вариант. Этот способ измеряет термостабильность белка, которая может увеличиваться при благоприятных условиях, таких как добавление связывающей молекулы РНК, например, нРНК.

Анализ можно применять множеством путей. Типовые протоколы включают, но не ограничены ими, протокол для определения желаемых условий раствора для образования RNP (анализ 1, см. ниже), протокол для тестирования желаемого стехиометрического соотношения нРНК:Cas9 белок (анализ 2, см. ниже), протокол для скрининга эффективных молекул нРНК для молекул Cas9, например, молекул Cas9 дикого типа или мутантных (анализ 3, см. ниже), и протокол для изучения образования RNP в присутствии ДНК-мишени (анализ 4). В некоторых вариантах осуществления, анализ выполняют с использованием двух разных протоколов, один для тестирования наилучшего стехиометрического соотношения нРНК:Cas9 белок, и другой для определения условий наилучшего раствора для образования RNP.

Чтобы определить лучший раствор для образования комплексов RNP, 2 мкМ раствор Cas9 в воде+10x SYPRO Orange® (Life Technologies, кат. № S-6650) распределяют в 384-луночный планшет. Затем добавляют эквимолярное количество нРНК, разведенной растворами с различным pH, и соль. После инкубации при комнатной температуре в течение 10 минут и непродолжительного центрифугирования для удаления пузырьков используют Bio-Rad CFX384™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler с программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager для создания градиента от 20°C до 90°C с повышением температуры на 1° каждые 10 секунд.

Второй анализ состоит из смешивания различных концентраций нРНК с 2 мкМ Cas9 в оптимальном буфере из анализа 1, описанного выше, и инкубирования при комнатной температуре в течение 10 минут в 384-луночном планшете. Добавляют равный объем оптимального буфера+10x SYPRO Orange® (Life Technologies, кат. № S-6650) и планшет герметизируют клеем Microseal® B (MSB-1001). После кратковременного центрифугирования для удаления пузырьков используют Bio-Rad CFX384™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler с программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager для создания градиента от 20°C до 90°C с увеличением температуры на 1° каждые 10 секунд.

В третьем анализе очищают представляющую интерес молекулу Cas9 (например, белок Cas9, например, вариант белка Cas9). Синтезируют библиотеку вариантных молекул нРНК и ресуспендируют до концентрации 20 мкМ. Молекулу Cas9 инкубируют с молекулой нРНК в конечной концентрации 1 мкМ, каждая в заранее определенном буфере

в присутствии 5x SYPRO Orange® (Life Technologies, кат № S-6650). После инкубации при комнатной температуре в течение 10 минут и центрифугирования при 2000 об/мин в течение 2 минут для удаления пузырьков используют термоциклер Bio-Rad CFX384™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler с программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager для запуска градиента от 20°C до 90°C с повышением температуры на 1°C каждые 10 секунд.

В четвертом анализе, DSF-эксперимент проводят со следующими образцами: только белок Cas9, белок Cas9 с нРНК, белок Cas9 с нРНК и ДНК-мишенью и белок Cas9 с ДНК-мишенью. Порядок смешивания компонентов: реакционный раствор, белок Cas9, нРНК, ДНК и SYPRO Orange. Реакционный раствор содержит 10 мМ HEPES pH 7,5, 100 мМ NaCl в отсутствие или в присутствии $MgCl_2$. После центрифугирования при 2000 об/мин в течение 2 минут для удаления пузырьков используют Bio-Rad CFX384™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler с программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager для создания градиента от 20°C до 90°C с повышением температуры на 1° каждые 10 секунд.

3. Доставка агентов для генетических разрушений

В некоторых вариантах осуществления, таргетное генетическое разрушение, например разрыв ДНК, эндогенного локуса *TGFBR2* (кодирующего TGFBRII) у человека осуществляется путем доставки или введения одного или нескольких агентов, способных вызывать генетические разрушения, например Cas9 и/или компоненты нРНК, в клетку с использованием любого из ряда известных способов доставки или носителя для введения или переноса в клетки, например, с использованием вирусных, например, лентивирусных, векторов доставки или любого из известных способов или носителей для доставки молекул Cas9 и нРНК. Типовые способы описаны, например, в Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; и Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие один или несколько компонентов одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение, например разрыв ДНК, вводят в клетки, например, любыми способами введения нуклеиновых кислот в клетку, описанными в настоящем документе или известными. В некоторых вариантах осуществления, вектор, кодирующий компоненты одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение, таких как направляющая РНК CRISPR и/или фермент Cas9, может быть доставлен в клетку.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение, например, один или несколько агентов, представляющих собой Cas9/нРНК, вводят в клетку в виде комплекса рибонуклеопротеина (RNP). Комплексы RNP включают последовательность рибонуклеотидов, такую как РНК или молекула нРНК, и белок, такой как белок Cas9 или его вариант. Например, белок Cas9 доставляют в виде комплекса RNP, который содержит белок Cas9 и молекулу нРНК, направленную на последовательность-мишень, например, с использованием электропорации или другого способа физической доставки. В некоторых вариантах

осуществления, RNP доставляют в клетку посредством электропорации или других физических средств, например, с помощью генной пушки, трансфекции фосфатом кальция, сжатия или сдавливания клеток. В некоторых вариантах осуществления, RNP может пересекать плазматическую мембрану клетки без необходимости в дополнительных агентах доставки (например, низкомолекулярных агентов, липидов и т. д.). В некоторых вариантах осуществления, доставка одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение, например CRISPR/Cas9, в качестве RNP предлагает преимущество, заключающееся в том, что таргетное разрушение происходит временно, например, в клетках, в которые введен RNP, без распространения агента на потомство клеток. Например, доставка с помощью RNP сводит к минимуму передачу агента по наследству потомству, тем самым снижая вероятность генетического разрушения вне мишени в потомстве. В таких случаях генетическое разрушение и интеграция трансгена могут быть унаследованы клетками-потомками, но без самого агента, который может дополнительно вносить генетические разрушения вне мишени, передаваемые клеткам-потомкам.

Агенты и компоненты, способные вызывать генетическое разрушение, например, молекула Cas9 и молекула нРНК, могут быть введены в клетки-мишени в различных формах с использованием различных способов доставки и составов, как указано в **таблицах 4** и **5,** или способов, описанных, например, в WO 2015/161276; US 2015/0056705, US 2016/0272999, US 2017/0211075; или US 2017/0016027. Как описано далее в настоящем документе, способы и составы доставки можно использовать для доставки матричных полинуклеотидов и/или других агентов в клетку (например, тех, которые необходимы для конструирования клеток) на предшествующих или последующих стадиях описанных в настоящем документе способов. Когда компонент Cas9 или нРНК кодирован как ДНК для доставки, ДНК обычно, но не обязательно, может включать контрольную область, например, содержащую промотор, для осуществления экспрессии. Подходящие промоторы для последовательностей молекулы Cas9 включают, например, промоторы CMV, EF-1α, EFS, MSCV, PGK или CAG. Подходящие промоторы для нРНК содержат, например, промоторы H1, EF-1α, тРНК или U6. Промоторы с аналогичной или разной силой могут быть выбраны для настройки экспрессии компонентов. Последовательности, кодирующие молекулу Cas9, могут содержать сигнал ядерной локализации (NLS), например, NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления, промотор для молекулы Cas9 или молекулы нРНК может быть, независимо, индуцибельным, тканеспецифичным или клеточно-специфичным. В некоторых вариантах осуществления, агент, способный вызывать генетические разрушения, является введенными комплексами RNP.

Таблица 4. Типовые способы доставки

Элементы		Комментарии
Молекула Cas9	**Молекула нРНК**	
ДНК	ДНК	В этом варианте осуществления, молекула Cas9 и нРНК транскрибированы из ДНК. В этом варианте осуществления, они кодированы отдельными молекулами.
ДНК		В этом варианте осуществления, молекула Cas9 и нРНК транскрибированы из ДНК, в настоящем случае, из одной молекулы.
ДНК	РНК	В этом варианте осуществления, молекула Cas9 транскрибирована из ДНК, и нРНК представлена как in vitro транскрибированная или синтезированная РНК.
иРНК	РНК	В этом варианте осуществления, молекула Cas9 транслируется из in vitro транскрибированной иРНК, и нРНК представлена в виде in vitro транскрибированной или синтезированной РНК.
иРНК	ДНК	В этом варианте осуществления, молекула Cas9 транслируется из in vitro транскрибированной иРНК, и нРНК транскрибирована из ДНК.
Белок	ДНК	В этом варианте осуществления, молекула Cas9 представлена в виде белка, а нРНК транскрибирована из ДНК.
Белок	РНК	В этом варианте осуществления, молекула Cas9 представлена в виде белка, и нРНК представлена в виде транскрибированной или синтезированной РНК.

Таблица 5. Сравнение типовых способов доставки

Вектор/способ доставки	**Доставка в не делящиеся клетки**	**Длительность экспрессии**	**Интеграция генома**	**Тип доставляемой молекулы**
Физические (например, электропорация, генная пушка, трансфекция фосфатом кальция, сжатие или сдавливание клеток)	ДА	Временная	НЕТ	Нуклеиновые кислоты и белки

Вирусный	**Ретровирус**	НЕТ	Стабильная	ДА	РНК
	Лентивирус	ДА	Стабильная	ДА/НЕТ с модификациями	РНК
	Аденовирус	ДА	Временная	НЕТ	ДНК
	Аденоассоциированный вирус (AAV)	ДА	Стабильная	НЕТ	ДНК
	Вирус осповакцины	ДА	Очень кратко-временная	НЕТ	ДНК
	Вирус простого герпеса	ДА	Стабильная	НЕТ	ДНК
Не вирусный	**Катионные липосомы**	ДА	Временная	Зависит от того, что доставляется	Нуклеиновые кислоты и белки
	Полимерные наночастицы	ДА	Временная	Зависит от того, что доставляется	Нуклеиновые кислоты и белки
Биологические невирусные средства доставки	**Ослабленные бактерии**	ДА	Временная	НЕТ	Нуклеиновые кислоты
	Сконструированные бактериофаги	ДА	Временная	НЕТ	Нуклеиновые кислоты
	Частицы, подобные вирусу млекопитающих	ДА	Временная	НЕТ	Нуклеиновые кислоты
	Биологические липосомы: фиктивные эритроциты и экзосомы	ДА	Временная	НЕТ	Нуклеиновые кислоты

В некоторых вариантах осуществления, ДНК, кодирующая молекулы Cas9 и/или молекулы нРНК, или комплексы RNP, содержащие молекулу Cas9 и/или молекулы нРНК, могут быть доставлены в клетки известными способами или как описано в настоящем документе. Например, ДНК, кодирующая Cas9 и/или кодирующая нРНК, может быть

доставлена, например, векторами (например, вирусными или не вирусными векторами), способами, не основанными на векторах (например, с использованием голой ДНК или комплексов ДНК) или их сочетанием. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий агент и/или его компоненты, доставляется с помощью вектора (например, вирусного вектора/вируса или плазмиды). Вектор может быть любым, описанным в настоящем документе.

В некоторых аспектах, фермент CRISPR (например, нуклеаза Cas9) в комбинации с (и необязательно в комплексе с) направляющей последовательностью доставляют в клетку. Например, один или несколько элементов системы CRISPR получают из системы CRISPR типа I, типа II или типа III. Например, один или несколько элементов системы CRISPR получают из конкретного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, такого как Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus или Neisseria meningitides.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеазу Cas9 (например, кодированная иРНК из Staphylococcus aureus или из Streptococcus pyogenes, например, pCW-Cas9, Addgene # 50661, Wang et al. (2014) Science, 3:343-80-4; или лентивирусные векторы нуклеазы или никазы, доступные от Applied Biological Materials (ABM; Canada) под кат. № K002, K003, K005 или K006) и направляющую РНК, специфичную для локуса-мишени (например, локуса *TGFBR2* у людей), вводят в клетки.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий агенты и/или его компоненты, или комплекс RNP, доставляют способом, не основанным на векторе (например, с использованием голой ДНК или комплексов ДНК). Например, ДНК или РНК, или белки, или их комбинация, например, комплексы рибонуклеопротеинов (RNP), могут быть доставлены, например, с помощью органически модифицированного диоксида кремния или силиката (Ормосил), электропорации, временного сжатия или сдавливания клеток (например, как описано в Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27, Kollmannsperger et al (2016) Nat Comm 7, 10372), генной пушки, сонопорации, магнитофекции, липид-опосредованная трансфекции, дендримеров, неорганических наночастиц, фосфатов кальция или их клмбинации.

В некоторых вариантах осуществления, доставка посредством электропорации включает смешивание клеток с ДНК, кодирующей Cas9 и/или нРНК, или RNP комплексом в картридже, камере или кювете и применение одного или нескольких электрических импульсов определенной длительности и амплитуды. В некоторых вариантах осуществления, доставку посредством электропорации осуществляют с использованием системы, в которой клетки смешиваются с ДНК, кодирующей Cas9 и/или нРНК, в сосуде, соединенном с устройством (например, насосом), которое подает смесь в картридж, камеру или кювету, в которой применяют один или несколько электрических импульсов определенной длительности и амплитуды, после чего клетки доставляют во второй сосуд.

В некоторых вариантах осуществления, средством доставки является не вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, не вирусным вектором является неорганическая наночастица. Типовые неорганические наночастицы включают, например,

магнитные наночастицы (например, Fe_3MnO_2) и диоксид кремния. Внешняя поверхность наночастицы может быть конъюгирована с положительно заряженным полимером (например, полиэтиленимином, полилизином, полисерином), который позволяет прикреплять (например, конъюгировать или захватывать) полезную нагрузку. В некоторых вариантах осуществления, не вирусным вектором является органическая наночастица. Типовые органические наночастицы включают, например, липосомы SNALP, которые содержат катионные жиры вместе с нейтральными вспомогательными жирами, которые покрыты полиэтиленгликолем (PEG), и комплексы протамин-нуклеиновая кислота, покрытые жиром. Примеры жиров для переноса генов показаны ниже в **Таблице 6.**

Таблица 6. Жиры, используемые для переноса генов

Жир	**Аббревиатура**	**Признак**
1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин	DOPC	Помощник
1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин	DOPE	Помощник
Холестерин		Помощник
N-[1-(2,3-диолеилокси)профил]*N, N,N*-триметиламмония хлорид	DOTMA	Катионный
1,2-диолеилокси-3-триметиламмоний-пропан	DOTAP	Катионный
Диоктадециламидоглицилспермин	DOGS	Катионный
N-(3-аминопропил)-*N, N*-диметил-2,3-бис(додецилокси)-1-пропанаминия бромид	GAP-DLRIE	Катионный
Цетилтриметиламмония бромид	CTAB	Катионный
6-Лауроксигексила орнитинат	LHON	Катионный
1-(2,3-диолеилоксипропил)-2,4,6-триметилпиридиния	2Oc	Катионный
2,3-Диолеилокси-*N*-[2(сперминкарбоксамидоэтил]-*N, N*-диметил-1-пропанаминия трифторацетат	DOSPA	Катионный
1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан	DOPA	Катионны

		й
N-(2-гидроксиэтил)-*N, N*-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)-1-пропанаминия бромид	MDRIE	Катионный
Димиристооксипропилдиметилгидроксиэтиламмония бромид	DMRI	Катионный
3β-[*N*-(*N'*,*N'*-диметиламиноэтан)карбамоил]холестерин	DC-Chol	Катионный
Бис-гуанидиум-трен-холестерин	BGTC	Катионный
1,3-диодеокси-2-(6-карбоксиспермил)пропиламид	DOSPER	Катионный
Диметилоктадециламмония бромид	DDAB	Катионный
Диоктадециламидоглицилспермидин	DSL	Катионный
rac-[(2,3-диоктадецилоксипропил)(2-гидроксиэтил)]-диметиламмония хлорид	CLIP-1	Катионный
rac-[2(2,3-дигексадецилоксипропилоксиметилокси)этил]триметиламмония бромид	CLIP-6	Катионный
Этилдимиристоилфосфатидилхолин	EDMPC	Катионный
1,2-Дистеарилокси-*N, N*-диметил-3-аминопропан	DSDMA	Катионный
1,2-димиристоилтриметиламмонийпропан	DMTAP	Катионный
O, O'-димиристил-N-лизила аспартат	DMKE	Катионный
1,2-Дистеароил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин	DSEPC	Катионный
N-Пальмитоил D-эритросфингозилкарбамоилспермин	CCS	Катионный
N-*m*-Бутил-*N*0-тетрадецил-3-тетрадециламинопропионамидин	диС14-амидин	Катионный

Октадеценолокси[этил-2-гептадеценил-3-гидроксиэтил]имидазолиния хлорид	DOTIM	Катионный
*N*1-холестерилоксикарбонил-3,7-диазанонан-1,9-диамин	CDAN	Катионный
2-(3-[Бис(3-аминопропил)амино]пропиламино)-*N*-дитетрадецилкарбамоилметилацетамид	RPR209120	Катионный
1,2-дилинолеилокси-3-диметиламинопропан	DLinDMA	Катионный
2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил[1,3]диоксолан	DLin-KC2-DMA	Катионный
дилинолеилметил-4-диметиламинобутират	DLin-MC3-DMA	Катионный

Примеры полимеров для переноса генов показаны ниже в **Таблице 7.**

Таблица 7. Полимеры, используемые для переноса генов

Полимер	**Аббревиатура**
Полиэтиленгликоль	PEG
Полиэтиленимин	PEI
Дитиобис(сукцинимидилпропионат)	DSP
Диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат	DTBP
Поли(этиленимин)бискарбамат	PEIC
Поли(L-лизин)	PLL
Модифицированный гистидином PLL	
Поли(*N*-винилпирролидон)	PVP
Поли(пропиленимин)	PPI
Поли(амидоамин)	PAMAM
Поли(амидоэтиленимин)	SS-PAEI
Триэтилентетрамин	TETA
Поли(β-аминоэфир)	
Поли(4-гидрокси-L-пролиновый эфир)	PHP
Поли(аллиламин)	
Поли(α-[4-аминобутил]-L-гликолевая кислота)	PAGA
Поли(D, L-молочно-со-гликолевая кислота)	PLGA
Поли(*N*-этил-4-винилпиридиния бромид)	
Поли(фосфазены)	PPZ

Поли(фосфоэстеры)	PPE
Поли(фосфорамидаты)	PPA
Поли(*N*-2-гидроксипропилметакриламид)	pHPMA
Поли(2-(диметиламино)этилметакрилат)	pDMAEMA
Поли(2-аминоэтилпропиленфосфат)	PPE-EA
Хитозан	
Галактозилированный хитозан	
N-додацилированный хитозан	
Гистон	
Коллаген	
Декстран-спермин	D-SPM

В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет таргетирующие модификации для увеличения обновления наночастиц и липосом в клетках-мишенях, например, клеточноспецифических антигенов, моноклональных антител, одноцепочечных антител, аптамеров, полимеров, сахаров и проникающих пептидов. В некоторых вариантах осуществления, в носителе используют фузогенные и дестабилизирующие эндосомы пептиды/полимеры. В некоторых вариантах осуществления, носитель претерпевает вызванные кислотой конформационные изменения (например, для ускорения эндосомного выхода нагрузки). В некоторых вариантах осуществления, используется расщепляемый стимулом полимер, например, для высвобождения в клеточном компартменте. Например, можно использовать катионные полимеры на основе дисульфидов, которые расщепляются в восстанавливающей клеточной среде.

В некоторых вариантах осуществления, средством доставки является биологическое не вирусное средство доставки. В некоторых вариантах осуществления, носителем является ослабленная бактерия (например, естественно или искусственно сконструированная, чтобы быть инвазивной, но ослабленная для предотвращения патогенеза и экспрессии трансгена (например, *Listeria monocytogenes,* некоторые штаммы *Salmonella, Bifidobacterium longum* и модифицированные *Escherichia coli)*, бактерии, имеющие питательный и тканеспецифический тропизм к конкретным клеткам-мишеням, бактерии, имеющие модифицированные поверхностные белки для изменения специфичности клеток-мишеней). В некоторых вариантах осуществления, носителем является генетически модифицированный бактериофаг (например, сконструированные фаги, имеющие большую упаковочную способность, меньшую иммуногенность, содержащие поддерживающие последовательности плазмиды млекопитающих и имеющие включенные таргетирующие лиганды). В некоторых вариантах осуществления, носителем является вирусоподобнвя частица млекопитающего. Например, могут быть созданы модифицированные вирусные частицы (например, путем очистки «пустых» частиц с последующей сборкой вируса *ex vivo* с желаемой нагрузкой). Носитель также может быть сконструирован так, чтобы включать

таргетирующие лиганды для изменения тканеспецифичности мишени. В некоторых вариантах осуществления, носителем является биологическая липосома. Например, биологической липосомой является частица на основе фосфолипидов, полученная из клеток человека (например, фиктивные эритроциты, которыми являются красные кровяные тельца, разбитые на сферические структуры, полученные от субъекта (например, таргетирование ткани может быть достигнуто путем прикрепления различных ткане- или клеточно-специфических лигандов) или секреторные экзосомы - полученные от субъекта мембраносвязанные нанопузырьки (30-100 нм) эндоцитарного происхождения (например, могут быть получены из различных типов клеток и, следовательно, могут поглощаться клетками без необходимости таргетирования лигандов).

В некоторых вариантах осуществления, РНК, кодирующая молекулы Cas9 и/или молекулы нРНК, может быть доставлена в клетки, например, в клетки-мишени, описанные в настоящем документе, известными способами или как описано в настоящем документе. Например, РНК, кодирующая Cas9 и/или кодирующая нРНК, может быть доставлена, например, с помощью микроинъекции, электропорации, временного сжатия или сдавливания клеток (например, как описано в Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27), опосредованной жирами трансфекции, опосредованной пептидами доставка, например, пептидами, проникающими в клетки, или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления, доставка посредством электропорации включает смешивание клеток с РНК, кодирующей молекулы Cas9 и/или молекулы нРНК, в картридже, камере или кювете и применение одного или нескольких электрических импульсов определенной длительности и амплитуды. В некоторых вариантах осуществления, доставку посредством электропорации осуществляют с использованием системы, в которой клетки смешивают с РНК, кодирующей молекулы Cas9 и/или молекулы нРНК, в сосуде, соединенном с устройством (например, насосом), которое подает смесь в картридж, камеру или кювету, в которой применяют один или несколько электрических импульсов определенной длительности и амплитуды, после чего клетки доставляют во второй сосуд.

В некоторых вариантах осуществления, молекулы Cas9 могут быть доставлены в клетки известными способами или как описано в настоящем документе. Например, молекулы белка Cas9 могут быть доставлены, например, с помощью микроинъекции, электропорации, временного сжатия или сдавливания клеток (как описано в Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27), опосредованной жиром трансфекции, опосредованной пептидом доставки или их комбинации. Доставка может сопровождаться ДНК, кодирующей нРНК, или нРНК.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов, способных к расщеплению, например, систему Cas9/нРНК, вводят в клетку в виде комплекса рибонуклеопротеина (RNP). Комплексы RNP содержат последовательность рибонуклеотидов, таких как РНК или молекула нРНК, и белка, такого как белок Cas9 или его вариант. Например, белок Cas9 доставляется в виде комплекса RNP, который содержит

белок Cas9 и молекулу нРНК, таргетирующую последовательность-мишень, например, с использованием электропорации или другого метода физической доставки. В некоторых вариантах осуществления, RNP доставляют в клетку посредством электропорации или других физических средств, например, с помощью генной пушки, трансфекции фосфатом кальция, сжатия или сдавливания клеток.

В некоторых вариантах осуществления, доставка посредством электропорации включает смешивание клеток с молекулами Cas9 с или без молекул нРНК, в картридже, камере или кювете и применение одного или нескольких электрических импульсов определенной длительности и амплитуды. В некоторых вариантах осуществления, доставку посредством электропорации осуществляют с использованием системы, в которой клетки смешивают с молекулами Cas9 с или без молекул нРНК, в сосуде, соединенном с устройством (например, насосом), которое подает смесь в картридж, камеру или кювету, в которой применяют один или несколько электрических импульсов определенной длительности и амплитуды, после чего клетки доставляют во второй сосуд.

В некоторых вариантах осуществления, доставка посредством электропорации включает смешивание клеток с молекулами Cas9 (например, молекулами eaCas9, молекулами eiCas9 или слитыми белками eiCas9) с или без молекул нРНК в картридже, камере или кювете, и применение одного или нескольких электрических импульсов определенной длительности и амплитуды. В некоторых вариантах осуществления, доставку посредством электропорации осуществляют с использованием системы, в которой клетки смешаны с молекулами Cas9 (например, молекулами eaCas9, молекулами eiCas9 или слитыми белками eiCas9).

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий агент и/или его компоненты, доставляют с помощью комбинации вектора и способа, не основанного на векторах. Например, виросома содержит липосому, объединенную с инактивированным вирусом (например, HIV или вирусом гриппа), что может привести к более эффективному переносу гена, чем только вирусным или липосомным способом.

В некоторых вариантах осуществления, в клетку доставляется более одного агента или их компонентов. Например, в некоторых вариантах осуществления, агент, способный вызывать генетическое разрушение в двух или более местах в геноме, например, в двух или более сайтах в локусе *TGFBR2* (кодирующем TGFBRII), доставляется в клетку. В некоторых вариантах осуществления, агенты и их компоненты доставляются одним способом. Например, в некоторых вариантах осуществления, агент для индукции генетического разрушения локуса *TGFBR2* доставляется в виде полинуклеотидов, кодирующих компоненты генетического разрушения. В некоторых вариантах осуществления, один полинуклеотид может кодировать агенты, направленные на локус *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, два или более разных полинуклеотида могут кодировать агенты, направленные на локус *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, агенты, способные вызывать генетическое разрушение, могут быть доставлены в виде комплексов рибонуклеопротеидов (RNP), и два или более различных

комплекса RNP могут быть доставлены вместе в виде смеси или по отдельности.

В некоторых вариантах осуществления, доставляется одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты, отличных от одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение и/или его компонента, например, компонент молекулы Cas9 и/или компонент молекулы нРНК, такой как матричный полинуклеотид для HDR-направленной интеграции (такой как любой матричный полинуклеотид, описанный в настоящем документе, например, в Разделе I.B). В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, например матричный полинуклеотид, доставляется одновременно с одним или несколькими компонентами системы Cas. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты доставляется до или после (например, менее чем примерно через 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 6 часов, 9 часов, 12 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня, 1 неделю, 2 недели или 4 недели) доставки одного или нескольких компонентов системы Cas. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, например матричный полинуклеотид, доставляется с помощью средств, отличных от одного или нескольких компонентов системы Cas, например, компонента молекулы Cas9 и/или компонента молекулы нРНК. Молекула нуклеиновой кислоты, например матричный полинуклеотид, может быть доставлена любым из способов доставки, описанных в настоящем документе. Например, молекула нуклеиновой кислоты, например матричный полинуклеотид, может быть доставлена вирусным вектором, например ретровирусом или лентивирусом, а компонент молекулы Cas9 и/или компонент молекулы нРНК может быть доставлен путем электропорации. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, например матричный полинуклеотид, содержит одну или несколько экзогенных последовательностей, например последовательностей, которые кодируют рекомбинантный рецептор или его часть, и/или последовательностей нуклеиновой кислоты другого экзогенного гена.

B. Таргетная интеграция с помощью репарации, направляемой гомологией (HDR)

В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления включают таргетную интеграцию определенной части полинуклеотида, такой как часть матричного полинуклеотида, содержащая трансгенные последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть, в конкретную локацию (такую как сайт-мишень или местоположение-мишень) в геноме с эндогенным *TGFBR2* локусом, кодирующим TGFBRII. В некоторых аспектах, репарация, направляемая гомологией (HDR) может опосредовать сайт-специфическую интеграцию трансгенных последовательностей в сайт-мишень. В некоторых вариантах осуществления, наличие генетического разрушения (например, разрыва ДНК, такого как описано в разделе I.A) и матричного полинуклеотида, содержащего одно или несколько плеч гомологии (например, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, гомологичные последовательностям, окружающим генетическое разрушение), может вызывать или направить HDR, с

гомологичными последовательностями, действующими как матрица для репарации ДНК. Основываясь на гомологии между последовательностью эндогенного гена, окружающей генетическое разрушение, и 5' и/или 3' плечами гомологии, включенными в матричный полинуклеотид, механизм репарации клеточной ДНК может использовать матричный полинуклеотид для репарации разрыва ДНК и повторного синтеза (например, копирования) генетической информации в месте генетического разрушения, таким образом эффективно вставляя или интегрируя трансгенные последовательности в матричный полинуклеотид на или рядом с сайтом генетического разрушения. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение в эндогенном локусе *TGFBR2* может быть вызвано любым из способов создания таргетного генетического разрушения, описанных в настоящем документе, например, в Разделе I.A.

Также представлены полинуклеотиды, например, матричные полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, и наборы, которые содержат такие полинуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления, представленные полинуклеотиды и/или наборы можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, например, с участием HDR, для таргетирования трансгенных последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть в эндогенном локусе *TGFBR2*.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является или содержит полинуклеотид, содержащий трансген, такой как экзогенные или гетерологичные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть (например, одну или несколько областей или доменов рекомбинантного рецептора) и гомологические последовательности (например, плечи гомологии), которые гомологичны последовательностям на или рядом с эндогенным геномным сайтом в эндогенном локусе *TGFBR2*. В некоторых аспектах, трансгенные последовательности в матричном полинуклеотиде содержат последовательность нуклеотидов, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых аспектах, при таргетной интеграции трансгенных последовательностей локус *TGFBR2* в сконструированной клетке модифицируется так, что модифицированный локус *TGFBR2* содержит трансгенные последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых аспектах, модифицированный локус *TGFBR2* кодирует доминантно-негативную форму полипептида TGFBRII и рекомбинантный рецептор, например CAR.

В некоторых аспектах, матричный полинуклеотид вводят в виде линейного фрагмента ДНК или он содержится в векторе. В некоторых аспектах, стадию индукции генетического разрушения и стадию таргетной интеграции (например, путем введения матричного полинуклеотида) выполняют одновременно или последовательно.

1. Репарация, направляемая гомологией (HDR)

В некоторых вариантах осуществления, репарация, направляемая гомологией (HDR) может использоваться для таргетной интеграции или вставки одной или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот, например трансгенных последовательностей,

кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть, в один или несколько сайтов-мишеней в геном в локусе *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, индуцированную нуклеазой HDR можно использовать для изменения последовательности-мишени, интеграции трансгенных последовательностей в конкретной локации-мишени и/или для редактирования или репарации мутации в конкретном гене-мишени.

Изменение последовательностей нуклеиновой кислоты в сайте-мишени может происходить посредством HDR с экзогенно полученным полинуклеотидом, например матричным полинуклеотидом (также называемым «донорным полинуклеотидом» или «матричной последовательностью»). Например, матричный полинуклеотид обеспечивает изменение последовательности-мишени, такое как вставка трансгенных последовательностей, содержащихся в матричном полинуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления, плазмиду или вектор можно использовать в качестве матрицы для гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления, линейный фрагмент ДНК можно использовать в качестве матрицы для гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный матричный полинуклеотид можно использовать в качестве матрицы для изменения последовательности-мишени с помощью альтернативных способов репарации, направляемой гомологией (например, одноцепочечного отжига) между последовательностью-мишенью и матричным полинуклеотидом. Изменение последовательности-мишени под действием матричного полинуклеотида зависит от расщепления нуклеазой, например таргетной нуклеазой, такой как CRISPR/Cas9. Расщепление нуклеазой может включать двухцепочечный разрыв или два одноцепочечных разрыва.

В некоторых вариантах осуществления, «рекомбинация» включает процесс обмена генетической информацией между двумя полинуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, «гомологичная рекомбинация (HR)» содержит специализированную форму такого обмена, которая имеет место, например, во время репарации двухцепочечных разрывов в клетках с помощью механизмов репарации, направляемой гомологией. Этот процесс требует гомологии нуклеотидной последовательности, использует матричный полинуклеотид для репарации матрицы ДНК-мишени (т. е. такой, в которой произошел двухцепочечный разрыв, такой как сайт-мишень в эндогенном гене), и по-разному известен как «не пересекающаяся конверсия гена» или «конверсия гена короткой последовательностью», потому что он приводит к передаче генетической информации от матричного полинуклеотида к мишени. В некоторых вариантах осуществления, такой перенос может включать коррекцию ошибочного спаривания гетеродуплексной ДНК, которая образуется между разрушенной мишенью и матричным полинуклеотидом, и/или «синтеза-зависимый отжиг цепи», в котором матричный полинуклеотид используют для повторного синтеза генетической информации, которая станет частью мишени и/или связанных процессов. Такая специализированная HR часто приводит к изменению последовательности молекулы-мишени, так что часть или вся последовательность матричного полинуклеотида содержится в полинуклеотиде-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, часть полинуклеотида, такая как матричный полинуклеотид, например, полинуклеотид, содержащий трансген, интегрируется в геном клетки через механизмы, не зависимые от гомологии. Способы включают создание двухцепочечного разрыва (DSB) в геноме клетки и расщепление молекулы матричного полинуклеотида с использованием нуклеазы, так что матричный полинуклеотид интегрируется в сайт DSB. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид интегрируется с помощью способов, не зависимых от гомологии (например, NHEJ). При расщеплении in vivo матричные полинуклеотиды могут быть таргетно интегрированы в геном клетки в локации DSB. Матричный полинуклеотид может включать один или несколько одинаковых сайтов-мишеней для одной или нескольких нуклеаз, используемых для индуцирования DSB. Таким образом, матричный полинуклеотид может быть расщеплен одной или несколькими одинаковыми нуклеазами, которые используются для расщепления эндогенного гена, в который желательна интеграция. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит сайты-мишени нуклеаз, отличные от нуклеаз, используемых для индукции DSB. Как описано в настоящем документе, генетическое разрушение сайта-мишени или положения-мишени может быть создано любыми известными способами или любыми способами, описанными в настоящем документе, такими как ZFN, TALEN, система CRISPR/Cas9 или нуклеазы TtAgo.

В некоторых вариантах осуществления, механизмы репарации ДНК могут быть индуцированы нуклеазой после (1) одного двухцепочечного разрыва, (2) двух одноцепочечных разрывов, (3) двух двухцепочечных разрывов с разрывом, происходящим с каждой стороны сайта-мишени, (4) одного двухцепочечнного разрыва и двух одноцепочечных разрывов с двухцепочечным разрывом и двумя одноцепочечными разрывами, происходящими на каждой стороне сайта-мишени, (5) четырех одноцепочечных разрывов с парой одноцепочечных разрывов, происходящих на каждой стороне сайта-мишени, или (6) одноцепочечного разрыва. В некоторых вариантах осуществления, используют одноцепочечный матричный полинуклеотид, и сайт-мишень может быть изменен с помощью альтернативной HDR.

Изменение сайта-мишени под действием матричного полинуклеотида зависит от расщепления молекулой нуклеазы. Расщепление нуклеазой может включать ник, двухцепочечный разрыв или два одноцепочечных разрыва, например, по одному на каждой цепи ДНК в сайте-мишени. После введения разрывов в сайт-мишень резекция происходит на концах разрыва, в результате чего образуются одноцепочечные «липкие концы» областей ДНК.

В канонической HDR вводят двухцепочечный матричный полинуклеотид, содержащий гомологичную последовательность к сайту-мишени, которая будет либо непосредственно включена в сайт-мишень, либо использована в качестве матрицы для вставки трансгена или корректировки последовательности сайта-мишени. После резекции разрыва репарация может прогрессировать разными путями, например, с помощью модели двойного соединения Холлидея (или репарации двойного разрыва цепи, DSBR, путь) или

путем синтез-зависимого отжига цепи (SDSA).

В модели двойного соединения Холлидея происходит инвазия цепи двумя однонитевыми «липкими» концами сайта-мишени к гомологичным последовательностям в матричном полинуклеотиде, что приводит к образованию промежуточного соединения с двумя соединениями Холлидея. Соединения мигрируют по мере того, как на концах введенной цепи синтезируется новая ДНК, чтобы заполнить гэп, возникший в результате резекции. Конец вновь синтезированной ДНК лигируют с удаленным концом, и соединения разделяют, что приводит к вставке на сайте-мишени, например вставке трансгена в матричный полинуклеотид. Пересечение с матричным полинуклеотидом может происходить после разделения соединений.

В пути SDSA только один одноцепочечный «липкий» конец внедряется в матричный полинуклеотид, и новая ДНК синтезируется с конца внедряющейся цепи, чтобы заполнить гэп, возникший в результате резекции. Затем вновь синтезированная ДНК отжигается с оставшимся одноцепочечным «липким» концом, новая ДНК синтезируется, чтобы заполнить гэп, и цепи лигируются для получения модифицированного дуплекса ДНК.

В альтернативной HDR вводят одноцепочечный матричный полинуклеотид, например матричный полинуклеотид. Ник, одноцепочечный разрыв или двухцепочечный разрыв в сайте-мишени для изменения желаемого сайта-мишени, опосредуется молекулой нуклеазы, и резекция на разрыве происходит для выявления одноцепочечных «липких» концов. Включение последовательности матричного полинуклеотида для исправления или изменения сайта-мишени ДНК обычно происходит посредством пути SDSA, как описано в настоящем документе.

«Альтернативная HDR» или альтернативная репарация, направляемая гомологией в некоторых вариантах осуществления, относится к процессу репарации повреждений ДНК с использованием гомологичной нуклеиновой кислоты (например, эндогенной гомологичной последовательности, например сестринской хроматиды, или экзогенной нуклеиновой кислоты, например, матричного полинуклеотида). Альтернативная HDR отличается от канонической HDR тем, что в этом процессе используются пути, отличные от канонической HDR, и она может быть ингибирована каноническими медиаторами HDR, RAD51 и BRCA2. Кроме того, альтернативная HDR использует одноцепочечную или гомологичную нуклеиновую кислоту с разрывом для репарации разрыва. «Каноническая HDR» или каноническая репарация, направляемая гомологией в некоторых вариантах осуществления, относится к процессу репарации повреждений ДНК с использованием гомологичной нуклеиновой кислоты (например, эндогенной гомологичной последовательности, например сестринской хроматиды, или экзогенной нуклеиновой кислоты, например, матричной нуклеиновой кислоты). Каноническая HDR обычно действует, когда произошла значительная резекция двухцепочечного разрыва, образуя по меньшей мере одну одноцепочечную часть ДНК. В нормальной клетке HDR обычно включает серию стадий, таких как распознавание разрыва, стабилизация разрыва, резекция, стабилизация одноцепочечной ДНК, образование промежуточного соединения ДНК,

разделение промежуточного соединения и лигирование. Для этого процесса требуются RAD51 и BRCA2, и гомологичная нуклеиновая кислота обычно является двухцепочечной. Если не указано иное, термин «HDR» в некоторых вариантах осуществления, охватывает каноническую HDR и альтернативную HDR.

В некоторых вариантах осуществления, двухцепочечное расщепление осуществляется нуклеазой, например, молекулой Cas9, обладающей активностью расщепления, связанной с HNH-подобным доменом, и активностью расщепления, связанной с RuvC-подобным доменом, например N-концевым RuvC-подобным доменом, например, Cas9 дикого типа. Такие варианты осуществления, требуют только одной нРНК.

В некоторых вариантах осуществления, на одноцепочечный разрыв или ник влияет молекула нуклеазы, обладающая активностью никазы, например, никазы Cas9. ДНК с разрывом в сайте-мишени может быть субстратом для альтернативной HDR.

В некоторых вариантах осуществления, два одноцепочечных разрыва или ника вызваны нуклеазой, например, молекулой Cas9, обладающей активностью никазы, например, активностью расщепления, связанной с HNH-подобным доменом, или активностью расщепления, связанной с N-концевым RuvC-подобным доменом. Такие варианты осуществления, обычно требуют двух нРНК, по одной для размещения каждого одноцепочечного разрыва. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9, обладающая активностью никазы, расщепляет цепь, с которой гибридизуется нРНК, но не цепь, которая комплементарна цепи, с которой гибридизируется нРНК. В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9, обладающая активностью никазы, не расщепляет цепь, с которой гибридизуется нРНК, а скорее расщепляет цепь, которая комплементарна цепи, с которой гибридизируется нРНК. В некоторых вариантах осуществления, никаза обладает активностью HNH, например, молекула Cas9, имеющая инактивированную активность RuvC, например, молекула Cas9, имеющая мутацию в D10, например, мутацию D10A. D10A инактивирует RuvC; следовательно, никаза Cas9 обладает (только) активностью HNH и будет разрезать цепь, с которой гибридизуется нРНК (например, комплементарную цепь, на которой нет NGG PAM). В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9, имеющая мутацию H840, например, H840A, может использоваться в качестве никазы. H840A инактивирует HNH; следовательно, никаза Cas9 обладает (только) активностью RuvC и разрезает не комплементарную цепь (например, цепь, которая имеет NGG PAM и последовательность которой идентична нРНК). В некоторых вариантах осуществления, молекула Cas9 является никазой N-концевого RuvC-подобного домена, например, молекула Cas9 содержит мутацию на N863, например, N863A.

В некоторых вариантах осуществления, в которых никаза и две нРНК используют для позиционирования двух одноцепочечных разрывов, один ник находится на+цепи, и один ник находится на - цепи ДНК-мишени. ПАМ обращены наружу. нРНК могут быть выбраны таким образом, чтобы нРНК были разделены примерно 0-50, 0-100 или 0-200 нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, нет пересечения между

последовательностями-мишенями, которые комплементарны таргетирующим доменам двух нРНК. В некоторых вариантах осуществления, нРНК не пересекаются и разделены не более 50, 100 или 200 нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, использование двух нРНК может повысить специфичность, например, за счет уменьшения связывания вне мишени (Ran et al., Cell 2013).

В некоторых вариантах осуществления, можно использовать одиночный ник, чтобы вызвать HDR, например альтернативную HDR. В настоящем документе предполагается, что одиночный ник можно использовать для увеличения отношения HR к NHEJ в настоящем сайте расщепления, таком как сайт-мишень. В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный разрыв образуется в цепи ДНК в сайте-мишени, к которому таргетирующий домен указанной нРНК комплементарен. В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный разрыв образуется в цепи ДНК в сайте-мишени, отличном от цепи, к которой таргетирующий домен указанной иРНК комплементарен.

В некоторых вариантах осуществления, другие пути репарации ДНК, такие как отжиг одиночной цепи (SSA), репарация одноцепочечного разрыва (SSBR), репарация ошибочного спаривания (MMR), эксцизионная репарация оснований (BER), эксцизионная репарация нуклеотидов (NER), межцепочечная поперечная сшивка (ICL), синтез «через/сквозь» поврежденные участки (TLS), безошибочная пострепликационная репарация (PRR) могут использоваться клеткой для восстановления двухцепочечного или одноцепочечного разрыва, созданного нуклеазами.

Таргетная интеграция приводит к тому, что трансген, например, последовательности между плечами гомологии, интегрируются в локус *TGFBR2* в геноме. Трансген может быть интегрирован в любом месте на или рядом с, по меньшей мере, одним сайтом-мишенью или сайтом в геноме. В некоторых вариантах осуществления, трансген интегрирован на или рядом с одним из, по меньшей мере, одного сайта-мишени, например, в пределах 300, 250, 200, 150, 100, 50, 10, 5, 4, 3, 2, 1 или менее пар оснований выше или ниже сайта расщепления, например, в пределах 100, 50, 10, 5, 4, 3, 2, 1 пары оснований с любой стороны от сайта-мишени, например, в пределах 50, 10, 5, 4, 3, 2, 1 пары оснований с каждой стороны от сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, интегрированная последовательность, содержащая трансген, не содержит никаких векторных последовательностей (например, вирусных векторных последовательностей). В некоторых вариантах осуществления, интегрированная последовательность содержит часть векторных последовательностей (например, вирусных векторных последовательностей).

Двухцепочечный разрыв или одноцепочечный разрыв (например, сайт-мишень) в одной из цепей должен быть достаточно близко к сайту-мишени интеграции, например сайту таргетной интеграции, чтобы в желаемой области производилось изменение, такое как вставка трансгена, или происходила коррекция мутации. В некоторых вариантах осуществления, расстояние составляет не более 10, 25, 50, 100, 200, 300, 350, 400 или 500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, считается, что разрыв должен располагаться достаточно близко к сайту-мишени интеграции, так чтобы разрыв находился

внутри области, которая подлежит опосредованному экзонуклеазой удалению во время конечной резекции. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен сконфигурирован так, что событие расщепления, например двухцепочечный или однонитевой разрыв, располагался в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400 или 500 нуклеотидов области, которую необходимо изменить, например сайта для таргетной вставки. Разрыв, например двухцепочечный или одноцепочечный разрыв, может быть расположен выше или ниже области, которую необходимо изменить, например сайта для таргетной вставки. В некоторых вариантах осуществления, разрыв расположен внутри области, которую необходимо изменить, например, внутри области, определяемой, по меньшей мере, двумя мутантными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, разрыв располагается непосредственно рядом с областью, которую необходимо изменить, например, непосредственно выше или ниже сайта-мишени интеграции.

В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный разрыв сопровождается дополнительным одноцепочечным разрывом, расположенным второй молекулой нРНК. Например, таргетирующие домены сконфигурированы так, что событие расщепления, например, два одноцепочечных разрыва, расположены в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45., 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400 или 500 нуклеотидов от сайта-мишени интеграции. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая молекулы нРНК имеют такую конфигурацию, что при управлении никазой Cas9 одноцепочечный разрыв будет сопровождаться дополнительным одноцепочечным разрывом, расположенным второй нРНК, достаточно близко друг к другу, чтобы приводить к изменению желаемой области. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая молекулы нРНК сконфигурированы так, что одноцепочечный разрыв, расположенный указанной второй нРНК, находится в пределах 10, 20, 30, 40 или 50 нуклеотидов от разрыва, расположенного указанной первой молекулой нРНК, например, когда Cas9 является никазой. В некоторых вариантах осуществления, две молекулы нРНК сконфигурированы для размещения разрезов в одном и том же положении или в пределах нескольких нуклеотидов друг от друга, на разных цепях, например, по существу имитируя двухцепочечный разрыв.

В некоторых вариантах осуществления, в которых нРНК (мономолекулярная (или химерная) или модульная нРНК) и нуклеаза Cas9 индуцируют двухцепочечный разрыв с целью индуцирования HDR для опосредованной вставки трансгена или коррекции, сайт расщепления, такой как сайт-мишень, находится в от 0 до 200 по (например, от 0 до 175, от 0 до 150, от 0 до 125, от 0 до 100, от 0 до 75, от 0 до 50, от 0 до 25, от 25 до 200, от 25 до 175, от 25 до 150, от 25 до 125, от 25 до 100, от 25 до 75, от 25 до 50, от 50 до 200, от 50 до 175, от 50 до 150, от 50 до 125, от 50 до 100, от 50 до 75, от 75 до 200, от 75 до 175, от 75 до 150, от 75 до 125, от 75 до 100 по) от сайта-мишени интеграции. В некоторых вариантах осуществления, сайт расщепления, такой как сайт-мишень, находится в от 0 до 100 по (например, от 0 до 75, от 0 до 50, от 0 до 25, от 25 до 100, от 25 до 75, от 25 до 50, от 50 до

100, от 50 до 75 или от 75 до 100 по) от сайта для таргетной интеграции.

В некоторых вариантах осуществления, можно способствовать HDR, используя никазы для создания разрыва с «липкими» концами. В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный характер «липких» концов может повысить вероятность репарации клетки посредством HDR, в отличие, например, от NHEJ.

В частности, в некоторых вариантах осуществления, HDR продвигается путем выбора первой нРНК, которая нацеливает первую никазу на первый сайт-мишень, и второй нРНК, которая нацеливает вторую никазу на второй сайт-мишень, который находится на цепи ДНК, противоположной первому сайту-мишени и в стороне от первого ника. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен молекулы нРНК сконфигурирован для размещения события расщепления достаточно далеко от предварительно выбранного нуклеотида, например нуклеотида кодирующей области, так что нуклеотид не изменяется. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен молекулы нРНК сконфигурирован для размещения события интронного расщепления достаточно далеко от границы интрона/экзона или естественного сигнала сплайсинга, чтобы избежать изменения экзонной последовательности или нежелательных событий сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен молекулы нРНК сконфигурирован так, чтобы располагаться в раннем экзоне, чтобы обеспечить интеграцию внутри рамки трансгенной последовательности на или рядом с одним из, по меньшей мере, одного сайта-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, двухцепочечный разрыв может сопровождаться дополнительным двухцепочечным разрывом, расположенным второй молекулой нРНК. В некоторых вариантах осуществления, двухцепочечный разрыв может сопровождаться двумя дополнительными одноцепочечными разрывами, размещенными второй молекулой нРНК и третьей молекулой нРНК. В некоторых вариантах осуществления, две нРНК, например, независимо, мономолекулярная (или химерная) или модульная нРНК, сконфигурированы так, чтобы располагать двухцепочечный разрыв по обе стороны от сайта-мишени интеграции, например сайта для таргетной интеграции.

2. Матричный полинуклеотид

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид, например полинуклеотид, содержащий трансген, такой как экзогенные или гетерологичные последовательности нуклеиновых кислот, который содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора, химерного рецептора или его части, и последовательности гомологии (например, плечи гомологии), которые гомологичны последовательностям на или рядом с эндогенным геномным сайтом для таргетной интеграции, может быть использован в качестве матрицы для репарации молекул и механизмов, участвующих в процессах репарации клеточной ДНК, таких как гомологичная рекомбинация. В некоторых аспектах, матричный полинуклеотид, имеющий гомологию с последовательностями на или рядом с одним или несколькими сайтами-мишенями в эндогенной ДНК, может быть использован для

изменения структуры ДНК-мишени, такой как сайт-мишень в эндогенном локусе *TGFBR2,* для таргетной вставки трансгенных, гетерологичных или экзогенных последовательностей, например, экзогенных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его части. Также предоставлены полинуклеотиды, например матричные полинуклеотиды, для использования в способах, представленных в настоящем документе, например, в качестве матриц для таргетной интеграции трансгенных последовательностей, опосредованной репарацией, направляемой гомологией (HDR). В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, такую как трансген, кодирующий одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его часть; и одно или несколько плеч гомологии, связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, где одно или несколько плеч гомологии содержат последовательность, гомологичную одной или нескольким областям открытой рамки считывания локуса *TGFBR2.*

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит одну или несколько гомологических последовательностей (например, плечей гомологии), связанных с трансгеном и/или фланкирующих трансген (экзогенные или гетерологичные последовательности нуклеиновых кислот), которые содержат последовательность нуклеотидов, кодирующих одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его части. В некоторых вариантах осуществления, гомологические последовательности используют для таргетирования экзогенных последовательностей в эндогенном локусе *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит последовательности нуклеиновой кислоты, такие как трансгенные последовательности, между плечами гомологии, для вставки или интеграции в геном клетки. Трансген в матричном полинуклеотиде может содержать одну или несколько последовательностей, кодирующих функциональный полипептид (например, кДНК), с или без промотора или других регуляторных элементов.

В некоторых вариантах осуществления, матричным полинуклеотидом является последовательность нуклеиновой кислоты, которую можно использовать в сочетании с одним или несколькими агентами, способными вызывать генетическое разрушение, для изменения структуры сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид изменяет структуру сайта-мишени, например, вставкой трансгена, посредством события репарации, направляемой гомологией.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид изменяет последовательность сайта-мишени, например, приводит к вставке или интеграции трансгенных последовательностей между плечами гомологии в геном клетки. В некоторых аспектах, таргетная интеграция приводит к интеграции внутри рамки кодирующей части трансгенных последовательностей с одним или несколькими экзонами открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2,* например, внутри рамки с соседним экзоном в сайте интеграции.. Например, в некоторых случаях интеграция внутри рамки приводит к экспрессии части эндогенной открытой рамки считывания и рекомбинантного рецептора

или его части, необязательно разделенных мультицистронным элементом, таким как элемент 2A. Таким образом, модифицированный локус *TGFBR2* может экспрессировать полипептид, содержащий часть TGFBRII и рекомбинантный рецептор или его часть, которые могут быть разделены на 2 разных полипептида благодаря мультицистронному элементу.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит последовательности, которые соответствуют или гомологичны сайту на последовательности-мишени, которые расщепляются, например, одним или несколькими агентами, способными вызвать генетическое разрушение. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит последовательности, которые соответствуют или гомологичны обоим, первому сайту на последовательности-мишени, который расщепляется первым агентом, способным вводить генетическое разрушение, и второму сайту на последовательности-мишени, который расщепляется во втором агенте, способном вводить генетическое разрушение.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит следующие компоненты: [5 'плечо гомологии]-[трансгенные последовательности (экзогенные или гетерологичные последовательности нуклеиновых кислот, например, кодирующие одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его часть)]-[3' плечо гомологии]. Плечи гомологии обеспечивают рекомбинацию в хромосому, таким образом эффективно вставляя или интегрируя трансген, например, который кодирует рекомбинантный рецептор или его часть, в геномную ДНК на или рядом с сайтом расщепления, таким как сайт-мишень. В некоторых вариантах осуществления, плечи гомологии фланкируют последовательности в сайте-мишени генетического разрушения.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является двухцепочечным. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является одноцепочечным. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит одноцепочечную часть и двухцепочечную часть. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержится в векторе. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является ДНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является РНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является двухцепочечной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является одноцепочечной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является двухцепочечной РНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является одноцепочечной РНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит одноцепочечную часть и двухцепочечную часть. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержится в векторе.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, например матричный полинуклеотид, содержит и/или включает трансген, кодирующий одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора, например CAR, или его части. В конкретных вариантах

осуществления, трансген направлен на сайт-мишень, который находится внутри эндогенного гена, локуса или открытой рамки считывания, кодирующей TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, трансген направлен для интеграции в эндогенную открытую рамку считывания *TGFBR2,* например, чтобы получить кодирующую последовательность, которая кодирует доминантно-негативную форму полипептида TGFBRII.

Полинуклеотиды для вставки также могут называться «трансгенами», «экзогенными последовательностями» или «донорными» полинуклеотидами или молекулами. Матричный полинуклеотид может быть ДНК, одноцепочечной и/или двухцепочечной, и его можно вводить в клетку в линейной или кольцевой форме. Матричный полинуклеотид может быть ДНК, одноцепочечной и/или двухцепочечной, и его можно вводить в клетку в линейной или кольцевой форме. Матричный полинуклеотид может быть одноцепочечным и/или двухцепочечным и может быть введен как молекула РНК (например, часть РНК вируса). *См. также* публикации патентов США №№ 20100047805 и 20110207221. Матричный полинуклеотид также может быть введен в форме ДНК, которая может быть введена в клетку в кольцевой или линейной форме. При введении в линейной форме, концы матричного полинуклеотида могут быть защищены (например, от экзонуклеолитической деградации) известными способами. Например, один или несколько дидеоксинуклеотидных остатков добавляют к 3' концу линейной молекулы и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируют с одним или обоими концами. См., например, Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от деградации включают, но не ограничены ими, добавление концевой аминогруппы и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфоротиоаты, фосфорамидаты и остатки О-метилрибозы или деоксирибозы. При введении в двухцепочечной форме, матричный полинуклеотид может включать один или несколько нуклеазных сайтов-мишеней, например нуклеазные сайты-мишени, фланкирующие трансген для интеграции в геном клетки. См., например, публикацию патенте США № 20130326645.

В некоторых вариантах осуществления, двухцепочечный матричный полинуклеотид содержит последовательности (также называемые трансгеном) длиной более 1 тн, например, от 2 до 200 тн, от 2 до 10 тн (или любое значение между ними). Двухцепочечный матричный полинуклеотид также содержит, например, по меньшей мере, один нуклеазный сайт-мишень. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит, по меньшей мере, 2 сайта-мишени, например, для пары ZFN или TALEN. Обычно нуклеазные сайты-мишени находятся вне трансгенных последовательностей, например, 5' и/или 3' относительно трансгенных последовательностей, для расщепления трансгена. Нуклеазные сайты расщепления, такие как сайты-мишени, могут относиться к любой нуклеазе. В некоторых вариантах осуществления, нуклеазные сайты-мишени, содержащиеся в двухцепочечном матричном полинуклеотиде, относятся к одной и той же

нуклеазе, которая используется для расщепления эндогенной мишени, в которую интегрирован расщепленный матричный полинуклеотид с помощью способов, не зависящих от гомологии.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является одноцепочечной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является двухцепочечной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, например, из одного или нескольких нуклеотидов, которые будут добавлены или будут матрицами для изменения ДНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которую можно использовать для модификации сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, например, из одного или нескольких нуклеотидов, которая соответствует последовательности ДНК-мишени дикого типа, например, сайта-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является линейной двухцепочечной ДНК. Длина может составлять, например, от примерно 200 до примерно 5000 пар оснований, например, примерно 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 или 5000 пар оснований. Длина может составлять, например, по меньшей мере, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 или 5000 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления, длина не превышает 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 или 5000 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления, двухцепочечный матричный полинуклеотид имеет длину примерно 160 пар оснований, например, от примерно 200 до 4000, от 300 до 3500, от 400 до 3000, от 500 до 2500, от 600 до 2000, от 700 до 1900, от 800 до 1800, от 900 до 1700, от 1000 до 1600, от 1100 до 1500 или от 1200 до 1400 пар оснований.

Трансген, содержащийся в матричном полинуклеотиде, описанном в настоящем документе, может быть выделен из плазмид, клеток или других источников с использованием известных стандартных методик, таких как ПЦР. Матричный полинуклеотид для использования может включать различные типы топологии, включая суперскрученную кольцевую, расслабленную кольцевую, линейную и т.п. Альтернативно, они могут быть синтезированы химическим путем с использованием стандартных методик синтеза олигонуклеотидов. Кроме того, матричные полинуклеотиды могут быть метилированы или не иметь метилирования. Матричные полинуклеотиды могут быть в форме бактериальных или дрожжевых искусственных хромосом (BAC или YAC).

Матричный полинуклеотид может быть линейной одноцепочечной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, матричным полинуклеотидом является (i) линейная одноцепочечная ДНК, которая может отжигаться с содержащей разрыв цепью ДНК-мишени, (ii) линейная одноцепочечная ДНК, которая может отжигаться с интактной цепью ДНК-мишени, (iii) линейная одноцепочечная ДНК, которая может отжигаться с

транскрибируемой цепью ДНК-мишени, (iv) линейная одноцепочечная ДНК, которая может отжигаться с не транскрибированной цепью ДНК-мишени, или более одной из вышеперечисленных.

Длина может составлять, например, от примерно 200 до 5000 нуклеотидов, например, примерно 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 или 5000 нуклеотидов. Длина может составлять, например, по меньшей мере, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 или 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, длина не превышает 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 или 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный матричный полинуклеотид имеет длину примерно 160 нуклеотидов, например, от примерно 200 до 4000, от 300 до 3500, от 400 до 3000, от 500 до 2500, от 600 до 2000, от 700 до 1900, от 800 до 1800, от 900 до 1700, от 1000 до 1600, от 1100 до 1500 или от 1200 до 1400 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, матричным полинуклеотидом является кольцевая двухцепочечная ДНК, например плазмида. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит от примерно 500 до 1000 пар оснований гомологии по обе стороны от трансгена и/или сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит примерно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 пар оснований гомологии 5' сайта-мишени или трансгена, 3' сайта-мишени или трансгена или оба 5' и 3' сайта-мишени или трансгена. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 пар оснований гомологии 5' сайта-мишени или трансгена, 3' сайта-мишени или трансгена или 5' и 3' сайта-мишени или трансгена. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит не более 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 пар оснований гомологии 5' сайта-мишени или трансгена, 3' сайта-мишени или трансгена, или 5 'и 3' сайта-мишени или трансгена.

а. Трансгенные последовательности

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит трансгенную последовательность, кодирующую одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора, химерного рецептора или его части, такого как любой рекомбинантный рецептор, описанный в настоящем документе, например, в Разделе III.B, или одну или несколько областей, доменов или цепей такого рекомбинантного рецептора.

В некоторых аспектах, трансгенные последовательности кодируют рекомбинантный рецептор, который содержит внеклеточную связывающую область, трансмембранный домен и/или внутриклеточную область. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность может кодировать весь рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность кодирует любой

рекомбинантный рецептор, описанный в настоящем документе, например, в разделе III.B, или одну или несколько его областей, доменов или цепей. В некоторых аспектах, после интеграции трансгенной последовательности в эндогенный локус *TGFBR2,* полученный модифицированный локус *TGFBR2* кодирует рекомбинантный рецептор, такой как любой рекомбинантный рецептор, описанный в настоящем документе, например, в разделе III.B, или одну или несколько его областей, доменов или цепей. Например, трансгенные последовательности могут включать последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько внеклеточных областей, трансмембранных доменов и внутриклеточных областей, которые могут включать костимулирующие сигнальные домены и другие домены или их части.

В некоторых аспектах, трансгенные последовательности, которыми являются представляющие интерес последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его часть, включая кодирующие и/или не кодирующие последовательности и/или их частичные кодирующие последовательности, которые вставлены или интегрированы в локации-мишени в геноме также могут называться «трансгеном», «трансгенными последовательностями», «последовательностями экзогенных нуклеиновых кислот», «гетерологичными последовательностями» или «донорными последовательностями». В некоторых аспектах, трансгеном является последовательность нуклеиновой кислоты, которая является экзогенной или гетерологичной к эндогенным геномным последовательностям, таким как эндогенные геномные последовательности на конкретном локусе-мишени или локации-мишени в геноме Т-клетки, например Т-клетки человека. В некоторых аспектах, трансгеном является последовательность, которая модифицирована или отличается от эндогенной геномной последовательности в локусе-мишени или локации-мишени Т-клетки, например, Т-клетки человека. В некоторых аспектах, трансгеном является последовательность нуклеиновой кислоты, которая происходит из или модифицирована по сравнению с последовательностями нуклеиновой кислоты из разных генов, видов и/или происхождения. В некоторых аспектах, трансгеном является последовательность, которая происходит из последовательности из другого локуса, например, из другой геномной области или другого гена того же вида. В некоторых аспектах, типовые рекомбинантные рецепторы содержат любые описанные в настоящем документе, например, в Разделе III.B.

В некоторых вариантах осуществления, индуцированная нуклеазой HDR приводит к вставке трансгена (также называемого «экзогенной последовательностью» или «трансгенной последовательностью») для экспрессии трансгена для таргетной вставки. Последовательность матричного полинуклеотида обычно не идентична геномной последовательности, в которую она помещена. Последовательность матричного полинуклеотида может содержать негомологичную последовательность, фланкированную двумя областями гомологии, чтобы обеспечить эффективную HDR в представляющей интерес локации. Кроме того, последовательность матричного полинуклеотида может включать векторную молекулу, содержащую последовательности, которые не гомологичны

представляющей интерес области в клеточном хроматине. Последовательность матричного полинуклеотида может содержать несколько прерывистых областей гомологии с клеточным хроматином. Например, для таргетной вставки последовательностей, обычно не присутствующих в представляющей интерес области, указанные последовательности могут присутствовать в трансгене и фланкированы областями гомологии последовательности в представляющей интерес области.

В некоторых аспектах, трансгенной последовательностью является последовательность, которая является экзогенной или гетерологичной по отношению к открытой рамке считывания эндогенного геномного локуса *TGFBR2* Т-клетки, необязательно, Т-клетки человека. В некоторых аспектах, HDR в присутствии матричного полинуклеотида, содержащего трансгенные последовательности, связанные с одним или несколькими плечами гомологии, которые гомологичны последовательностям рядом с сайтом-мишенью на эндогенном локусе *TGFBR2,* дает модифицированный локус *TGFBR2,* кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть.

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность кодирует все или часть различных областей, доменов или цепей рекомбинантного рецептора, такого как рекомбинантный рецептор, или различных областей, доменов или цепей, описанных в разделе III.B настоящего документа.

В некоторых аспектах, трансгеном является химерная последовательность, содержащая последовательность, полученную путем соединения различных последовательностей нуклеиновых кислот из разных генов, видов и/или происхождения. В некоторых аспектах, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих различные области или домены или их части, из разных генов, кодирующих последовательностей или экзонов или их частей, которые соединены или связаны. В некоторых аспектах, трансгенные последовательности для таргетной интеграции кодируют полипептид или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность может кодировать рекомбинантный рецептор, которым является химерный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), или его часть, такую как его домен или область. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность кодирует различные области или домены рекомбинантного рецептора, такого как химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих внутриклеточную область, такую как внутриклеточная область CAR. В некоторых вариантах осуществления, трансген также содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих трансмембранную область или область мембранной ассоциации, такую как трансмембранная область CAR. В некоторых вариантах осуществления, трансген также содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих внеклеточную область, например, внеклеточную область CAR. Типовые химерные рецепторы содержат рецепторы, описанные в разделах B.1 и B.3 ниже.

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность может

кодировать рекомбинантный рецептор, такой как рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), или его часть, такую как его домен, область или цепь. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как рекомбинантный TCR, содержит две или более отдельных полипептидных цепей, таких как цепи TCR альфа (TCRα) и TCR бета (TCRβ). В некоторых аспектах, трансгенная последовательность может кодировать одну или несколько цепей рекомбинантного TCR, таких как TCRα или TCRβ, или обе. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность может кодировать одну или несколько областей или доменов рекомбинантного TCR, таких как внутриклеточная область, трансмембранная область и/или внеклеточная область TCRα или TCRβ или обе. В некоторых аспектах, последовательности, кодирующие TCRα и TCRβ, необязательно разделены мультицистронным элементом, таким как элемент 2A. Типовые рекомбинантные TCR включают такие, которые описаны в разделе III.B.4 ниже.

В некоторых аспектах, трансген также содержит не кодирующие, регуляторные или контрольные последовательности, например последовательности, необходимые для разрешения, модуляции и/или регуляции экспрессии кодированного полипептида или его фрагмента, или последовательности, необходимые для модификации полипептида. В некоторых вариантах осуществления, трансген не содержит интрон или лишен одного или нескольких интронов по сравнению с соответствующей нуклеиновой кислотой в геноме, если трансген происходит из геномной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность не содержит интрон. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть, где все или часть трансгенных последовательностей кодон-оптимизированы, например, для экспрессии в клетках человека.

В некоторых вариантах осуществления, длина трансгенных последовательностей, включая кодирующие и не кодирующие области, составляет от точно или примерно 100 до примерно 10000 пар оснований, например примерно 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 или 10000 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления, длина трансгенной последовательности ограничена максимальной длиной полинуклеотида, который может быть получен, синтезирован или собран и/или введен в клетку, или емкостью вирусного вектора. В некоторых аспектах, длина трансгенной последовательности может варьироваться в зависимости от максимальной длины матричного полинуклеотида и/или длины одного или нескольких требуемых плеч гомологии.

В некоторых вариантах осуществления, HDR, индуцированная генетическим разрушением, приводит к вставке или интеграции трансгенных последовательностей в локации-мишени в геноме. Последовательность матричного полинуклеотида обычно не идентична геномной последовательности, на которую она направлена. Последовательность матричного полинуклеотида может содержать трансгенные последовательности,

фланкированные двумя областями гомологии, чтобы обеспечить эффективную HDR в представляющей интерес локации. Последовательность матричного полинуклеотида может содержать несколько прерывистых областей гомологии с геномной ДНК. Например, для таргетной вставки последовательностей, обычно не присутствующих в представляющей интерес области, указанные последовательности могут присутствовать в трансгене и фланкированы областями, гомологичными последовательности в представляющей интерес области. В некоторых вариантах осуществления, трансгенные последовательности кодируют рекомбинантный рецептор или его часть, например, одну или несколько из внеклеточной области связывания, трансмембранного домена и/или части внутриклеточной области.

В некоторых аспектах, при таргетной интеграции трансгена посредством HDR, геном клетки содержит модифицированный локус *TGFBR2,* содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых аспектах, весь рекомбинантный рецептор кодирован трансгенными последовательностями. В некоторых аспектах, трансгенные последовательности также содержат последовательность нуклеотидов, кодирующих другие молекулы и/или регуляторные или контрольные элементы, например экзогенный промотор и/или мультицистронные элементы.

В некоторых вариантах осуществления, трансгенные последовательности также содержат сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, регуляторные или контрольные элементы, такие как промотор, и/или один или несколько мультицистронных элементов, например, элемент проскока рибосомы или внутренний участок посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления, сигнальная последовательность может быть размещена 5' последовательности нуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор.

Типовые области, домены или цепи, кодированные трансгенной последовательностью, описаны ниже, а также могут быть любой областью или доменом, описанными в разделе III.B настоящего документа.

(i) *Сигнальная последовательность*

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или не нативный сигнальный пептид, например сигнальный пептид из другого гена или вида, или сигнальный пептид, который отличается от сигнального пептида эндогенного локуса *TGFBR2.* В некоторых аспектах, типовая сигнальная последовательность содержит сигнальную последовательность альфа-цепи GMCSFR, указанную в SEQ ID NO: 24 и кодирующую сигнальный пептид, указанный в SEQ ID NO: 25, или сигнальный пептид CD8, указанный в SEQ ID NO: 26. В зрелой форме экспрессируемого рекомбинантного рецептора, сигнальная последовательность отщепляется от оставшихся частей полипептида. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность расположена 3' от регуляторного или

контрольного элемента, например, промотора, такого как гетерологичный промотор, например, промотора, не полученного из локуса *TGFBR2*. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность расположена 3' от одного или нескольких мультицистронных элементов, например последовательности нуклеотидов, кодирующей последовательность проскока рибосомы и/или внутренний участок посадки рибосомы (IRES). В некоторых аспектах, сигнальная последовательность может быть размещена 5' от последовательности нуклеотидов, кодирующих один или несколько компонентов внеклеточной области в трансгене. В некоторых вариантах осуществления, сигнальная последовательность наибольшей 5' области присутствует в трансгене и связана с одним из плеч гомологии. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность, кодированная трансгенной последовательностью, содержит любую сигнальную последовательность, описанную в настоящем документе, например, в Разделе III.B.

(ii) *Типовые последовательности, кодирующие химерный рецептор*

В некоторых аспектах, трансгенные последовательности для таргетной интеграции содержат последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор, который является химерным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR) или рецептор химерного аутоантитела (CAAR). В некоторых аспектах, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую различные области или домены или части рекомбинантного рецептора, которые могут происходить из разных генов, кодирующих последовательностей или экзонов или их частей, которые соединены или связаны.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор, такой как CAR, содержит одну или несколько областей или доменов, таких как одна или несколько внеклеточных областей (например, содержащих один или несколько внеклеточных связывающих доменов и/или спейсеров), трансмембранных доменов и/или внутриклеточных областей (например, содержащих первичную сигнальную область или домен и/или один или несколько костимулирующих сигнальных доменов). В некоторых аспектах, кодированный CAR дополнительно содержит другие домены, такие как домены мультимеризации, или линкеры.

В некоторых аспектах, в трансгене, последовательность нуклеотидов, кодирующих внеклеточную область, расположена между сигнальной последовательностью и нуклеотидами, кодирующими спейсер. В некоторых аспектах, в трансгене, последовательность нуклеотидов, кодирующая внеклеточный домен мультимеризации, расположена между последовательностью нуклеотидов, кодирующей связывающий домен, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей спейсер. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая спейсер, расположена между последовательностью нуклеотидов, кодирующей связывающий домен, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит в порядке от 5' до 3', последовательность нуклеотидов, кодирующую внеклеточную область, последовательность нуклеотидов трансмембранного домена (или мембраноассоциированного домена) и последовательность

нуклеотидов внутриклеточной области.

В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является CAR, и трансген, кодирующий внеклеточную область, может включать, в порядке от 5' до 3', последовательность нуклеотидов, кодирующую внеклеточный связывающий домен, и последовательность нуклеотидов, кодирующую спейсер. В некоторых вариантах осуществления, трансген также содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую один или несколько внеклеточных доменов мультимеризации, которые могут быть размещены 5' или 3' от любой из последовательностей нуклеотидов, кодирующих связывающие домены и/или спейсеры, и/или 5' от последовательности нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность также содержит сигнальную последовательность, обычно расположенную 5' от последовательности нуклеотидов, кодирующей внеклеточную область.

В некоторых аспектах, в трансгене, последовательность нуклеотидов, кодирующая связывающий домен, расположена между сигнальной последовательностью и нуклеотидами, кодирующими спейсер. В некоторых аспектах, в трансгене, последовательность нуклеотидов, кодирующая внеклеточный домен мультимеризации, расположена между последовательностью нуклеотидов, кодирующей связывающий домен, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей спейсер. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая спейсер, расположена между последовательностью нуклеотидов, кодирующей связывающий домен, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен.

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую внутриклеточную область, которая может включать последовательность нуклеотидов, кодирующую один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и/или первичный сигнальный домен или область.

В некоторых вариантах осуществления, трансген также содержит один или несколько мультицистронных элементов, например, последовательность проскока рибосомы и/или внутренний участок посадки рибосомы (IRES). В некоторых аспектах, трансген также содержит регуляторные или контрольные элементы, такие как промотор, обычно на наибольшей 5' части трансгенной последовательности, например 5' от сигнальной последовательности. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая одну или несколько дополнительных молекул или дополнительных доменов или областей, может быть включена в трансгенную часть полинуклеотида. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая одну или несколько дополнительных молекул или дополнительных доменов или областей, может быть расположена на 5' последовательности нуклеотидов, кодирующей одну или несколько областей, или доменов, или цепей CAR. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая одну или несколько дополнительных молекул или дополнительных доменов, областей или цепей, расположена выше последовательности

нуклеотидов, кодирующей одну или несколько областей CAR.

Типовые домены или области химерного рецептора, кодированные трансгенными последовательностями, описаны ниже и также могут включать любую область или домен типовых химерных рецепторов, описанных в разделах III.B.1 и III.B.3 ниже.

(a) *Связывающий домен*

В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует часть рекомбинантного рецептора, такого как CAR, со специфичностью в отношении конкретного антигена (или лиганда), такого как антиген, экспрессированный на поверхности определенного типа клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или не целевыми клетками или тканями, например, в здоровых клетках или тканях.

В некоторых аспектах, трансген кодирует внеклеточную область рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, трансгенные последовательности кодируют внеклеточный связывающий домен, такой как связывающий домен, который специфически связывает антиген или лиганд.

В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен является или содержит полипептид, лиганд, рецептор, лиганд-связывающий домен, рецептор-связывающий домен, антиген, эпитоп, антитело, антигенсвязывающий домен, эпитоп-связывающий домен, антитело-связывающий домен, метка-связывающий домен или фрагмент любого из вышеперечисленных. В других вариантах осуществления, антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках. В некоторых аспектах, антиген распознается связывающим доменом, таким как лиганд-связывающий домен или антигенсвязывающий домен. В некоторых аспектах, трансген кодирует внеклеточную область, содержащую один или несколько связывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления, типовой связывающий домен, кодированный трансгеном, содержит антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, включая scFv или sdAb. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельные области антитела, соединенные гибким линкером.

В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен является или содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен является или содержит однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован, специфичен и/или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием, нарушением или состоянием является инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления, антигеном-мишенью является опухолевый антиген.

Типовые антигены и антиген- или лиганд-связывающие домены, кодированные трансгенными последовательностями, содержат те, которые описаны в разделе III.B.1

настоящего документа. В некоторых аспектах, кодированный рекомбинантный рецептор содержит связывающий домен, который является или содержит TCR-подобное антитело или его фрагмент, такой как scFv, который специфически распознает внутриклеточный антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, представленный на поверхности клетки как главный комплекс гистосовместимости (MHC)-пептидный комплекс. В некоторых аспектах, трансгенные последовательности могут кодировать связывающий домен, которым является TCR-подобное антитело или его фрагмент. Таким образом, кодированный рекомбинантный рецептор является TCR-подобным CAR, таким как любой, описанный в настоящем документе в разделе III.B. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен является мультиспецифическим, например биспецифическим, связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор содержит связывающий домен, который является антигеном, связывающимся с аутоантителом. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является рецептор химерного аутоантитела (CAAR), такой как любой, описанный в настоящем документе в разделе III.B.3.

В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая один или несколько связывающих доменов, может быть расположена 3' от сигнальной последовательности, если она присутствует, в трансгене. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая один или несколько связывающих доменов, может быть расположена 3' от последовательности нуклеотидов, кодирующей один или несколько регуляторных или контролирующих элементов, в трансгене. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая один или несколько связывающих доменов, может быть расположена 5' от последовательности нуклеотидов, кодирующих спейсер, если он присутствует, в трансгене. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая один или несколько связывающих доменов, может быть расположена 5' от последовательности нуклеотидов, кодирующих трансмембранный домен, в трансгене.

(b) *Спейсер и трансмембранный домен*

В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор является CAR, и трансген содержит последовательности, кодирующие спейсер, и/или последовательности, кодирующие трансмембранный домен или его часть. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область кодированного рекомбинантного рецептора содержит спейсер, необязательно, где спейсер функционально связан между связывающим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых аспектах, спейсер и/или трансмембранный домен может связывать внеклеточную часть, содержащую лиганд- (например, антиген-) связывающий домен, и другие области или домены рекомбинантного рецептора, такие как внутриклеточная область (например, содержащая один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, внутриклеточный домен мультимеризации и/или первичный сигнальный домен или область).

В некоторых вариантах осуществления, трансген дополнительно содержит

последовательность нуклеотидов, кодирующую спейсер и/или шарнирную область, которая разделяет антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен. В некоторых аспектах, спейсер может представлять собой или включать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина или ее вариант или модифицированную версию, такую как шарнирная область, например шарнирная область IgG4, и/или область C_H1/C_L и/или Fc. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть является IgG человека, таким как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах, часть константной области служит спейсерной областью между связывающим доменом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Типовые спейсеры, которые могут быть кодированы трансгеном, включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, или шарнир IgG4, связанный с доменом C_H3, и те, что описаны в Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135 или в публикации международной заявки на патент № WO2014031687 или любой из описанных в разделе III.B.1 настоящего документа.

В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая спейсер, может быть расположена 3' от последовательности нуклеотидов, кодирующей один или несколько связывающих доменов, в трансгене. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая спейсер, может быть расположена 5' от последовательности нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен, в трансгене. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеотидов, кодирующая спейсер, расположена между последовательностью нуклеотидов, кодирующей один или несколько связывающих доменов, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен.

В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует трансмембранный домен, который может связывать внеклеточную область, например, содержащую один или несколько связывающих доменов и/или спейсеры, с внутриклеточной областью, например, содержащей один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, внутриклеточный домен мультимеризации и/или первичный сигнальный домен или область. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую трансмембранный домен, необязательно, где трансмембранный домен является человеческим или содержит последовательность белка человека. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен является или содержит трансмембранный домен, полученный из CD4, CD28 или CD8, необязательно полученный из CD4 человека, CD28 человека или CD8 человека. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен является или содержит трансмембранный домен, полученный из CD28, необязательно полученный из CD28 человека.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеотидов, кодирующая трансмембранный домен, слита с последовательностью нуклеотидов, кодирующей внеклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеотидов, кодирующая трансмембранный домен, слита с последовательностью нуклеотидов, кодирующей внутриклеточную область. В некоторых

аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая трансмембранный домен, может быть расположена 3' от последовательности нуклеотидов, кодирующей один или несколько связывающих доменов и/или спейсер в трансгене. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая трансмембранный домен, может быть расположена 5' от последовательности нуклеотидов, кодирующей внутриклеточную область, например, содержащую один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, внутриклеточный домен мультимеризации и/или первичный сигнальный домен или область, в трансгене. В некоторых аспектах, трансмембранный домен, кодированный трансгенной последовательностью, содержит любой трансмембранный домен, описанный в настоящем документе, например, в разделе III.B.1.

В некоторых вариантах осуществления, в случаях, когда кодированный рекомбинантный рецептор содержит внутриклеточную область, содержащую первичный сигнальный домен или область, но не содержит трансмембранный домен и/или внеклеточную область, трансген может содержать последовательность нуклеотидов, кодирующую мембраноассоциированный домен, такой как любые, описанные в настоящем документе, например, в Разделе III.B.

(c) *Внутриклеточная область*

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует CAR, и в некоторых аспектах, внутриклеточная область содержит одну или несколько вторичных или костимулирующих сигнальных областей. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая трансмембранный домен, может быть расположена 3' от последовательности нуклеотидов, кодирующей один или несколько связывающих доменов и/или спейсер в трансгене, в трансгене. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, может быть расположена 5' от последовательности нуклеотидов, кодирующей первичный сигнальный домен или область. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, может быть расположена 3' от последовательности нуклеотидов, кодирующей первичный сигнальный домен или область. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая внутриклеточную область, является наибольшей 3' областью в трансгене, которая затем связывается с одной из последовательностей плеч гомологии, например, 3' последовательностью плеча гомологии. В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, может быть расположена 3' от последовательности нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен, в трансгене. В некоторых аспектах, костимулирующая сигнальная область или первичный сигнальный домен или область, кодированная трансгенной последовательностью, содержат любую костимулирующую сигнальную область или любой первичный сигнальный домен или область, описанные в настоящем документе, например, в Разделе III.B.1.

(1) *Костимулирующий сигнальный домен*

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую часть внутриклеточной области, которая может включать один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточные сигнальные домены костимулирующей молекулы Т-клетки или ее сигнальной части, при этом костимулирующая молекула Т-клетки или ее сигнальная часть необязательно являются человеческими.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточные сигнальные домены костимулирующей молекулы Т-клетки или ее сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая молекула Т-клетки или ее сигнальная часть является человеческой. В некоторых вариантах осуществления, типовой костимулирующий сигнальный домен, кодированный трансгеном, содержит сигнальные области или домены от одного или нескольких костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS и/или других костимулирующих рецепторов, таких как любые, описанные в Разделе III.B настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточные сигнальные домены CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат сигнальный домен CD28 человека, 4-1BB человека, ICOS человека или их сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточные сигнальные домены 4-1BB человека.

(2) *Первичная сигнальная область или домен*

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность, кодирующая рекомбинантный рецептор, например CAR, содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую первичную сигнальную область или домен, такой как цитоплазматический домен CD3дзета (CD3ζ). В некоторых вариантах осуществления, первичная сигнальная область является или содержит сигнальный домен, который способен стимулировать и/или индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) (например, внутриклеточный сигнальный домен или область CD3-дзета (CD3ζ) цепи или ее функциональный вариант или сигнальную часть) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор может быть любым описанным в настоящем документе, например, в Разделе III.B.

В некоторых аспектах, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую первичную цитоплазматическую сигнальную область, которая регулирует первичную стимуляцию и/или активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические

сигнальные области, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащего первичные цитоплазматические сигнальные области, содержат области, полученные из TCR или CD3 дзета (CD3ζ), рецептора Fc (FcR) гамма или FcR бета. В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматические сигнальные области или домены в CAR содержат цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная (или цитоплазматическая) сигнальная область содержит CD3-цепь человека, необязательно CD3 дзета стимулирующий сигнальный домен или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3ζ человека (доступ №: P20963. 2) или CD3 дзета сигнальный домен, как описано в патенте США № 7,446,190 или патенте США № 8,911,993. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%. %, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

В некоторых аспектах, первичный сигнальный домен или область, кодированная трансгенной последовательностью, содержит любой первичный сигнальный домен или область, описанные в настоящем документе, например, в Разделе III.B.1.

(d) *Дополнительные домены, например, домены мультимеризации*

В некоторых вариантах осуществления, трансген также содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих один или несколько доменов мультимеризации, например домен димеризации. В некоторых аспектах, кодированный домен мультимеризации может быть внеклеточным или внутриклеточным. В некоторых вариантах осуществления, кодированный домен мультимеризации является внеклеточным. В некоторых вариантах осуществления, кодированный домен мультимеризации является внутриклеточным. В некоторых вариантах осуществления, часть внутриклеточной области, кодированная трансгенными последовательностями, содержит домен мультимеризации, необязательно домен димеризации. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую внеклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область содержит домен мультимеризации, необязательно, домен димеризации. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации способен к димеризации при связывании с индуктором.

В некоторых аспектах, рекомбинантным рецептором является мультицепочечный рекомбинантный рецептор, такой как мультицепочечный CAR. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько цепей мультицепочечного рекомбинантного рецептора или его часть кодированы трансгенной последовательностью. В некоторых вариантах

осуществления, одна или несколько цепей мультицепочечного рекомбинантного рецептора могут вместе образовывать функциональный или активный рекомбинантный рецептор благодаря мультимеризации домена мультимеризации, включенного в каждую цепь рекомбинантного рецептора.

В некоторых аспектах, последовательность нуклеотидов, кодирующая домен мультимеризации, расположена 5' или 3' от других доменов. Например, в некоторых вариантах осуществления, кодированный домен мультимеризации является внеклеточным, и последовательность, кодирующая домен мультимеризации, расположена 5' от последовательности, кодирующей спейсер. В некоторых вариантах осуществления, кодированный домен мультимеризации является внутриклеточным, и последовательность, кодирующая домен мультимеризации, расположена 5' от последовательности, кодирующей первичную сигнальную область или домен. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации является внутриклеточным, и последовательность, кодирующая домен мультимеризации, расположена 5' или 3' от последовательности, кодирующей один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления, кодированный домен мультимеризации может мультимеризоваться (например, димеризоваться) при связывании индуктора. Типовой кодированный домен мультимеризации включает любой домен мультимеризации, описанный в настоящем документе, например, в разделе III.B настоящего документа.

(iii) *Типовые последовательности, кодирующие Т-клеточный рецептор (TCR)*

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором, кодированным трансгенными последовательностями, является рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых аспектах, трансгенная последовательность может кодировать весь или часть рекомбинантного TCR. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько цепей, областей или доменов рекомбинантного TCR. Типовые рекомбинантные TCR, кодируемые трансгенными последовательностями, описаны ниже и также могут включать любые цепи, область или домен типовых рекомбинантных TCR, описанных в Разделах B.4 ниже.

В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит две или несколько отдельных полипептидных цепей, таких как цепи TCR альфа (TCRα) и TCR бета (TCRβ). В некоторых аспектах, трансгенная последовательность может кодировать одну или несколько цепей рекомбинантного TCR, таких как TCRα или TCRβ, или обе. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность может кодировать цепи как TCRα, так и TCRβ. В некоторых аспектах, последовательности, кодирующие TCRα и TCRβ, необязательно разделены мультицистронным элементом, таким как элемент 2A.

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, представляющий собой рекомбинантный TCR или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность может кодировать цепь рекомбинантного TCR,

содержащую вариабельный домен и константный домен. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность кодирует цепь рекомбинантного TCR, которая содержит один или несколько вариабельных доменов и один или несколько константных доменов. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность, кодирующую цепи TCRα и TCRβ.

В некоторых вариантах осуществления, кодированная цепь TCRα и цепь TCRβ разделены линкерной областью. В некоторых вариантах осуществления, включена линкерная последовательность, которая связывает цепи TCRα и TCRβ с образованием единой полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет достаточную длину, чтобы охватить расстояние между С-концом α-цепи и N-концом β-цепи, или наоборот, при этом гарантируя, что длина линкера не настолько велика, чтобы он блокировал или снижал связывание с комплексом пептид-мишень-MHC. В некоторых вариантах осуществления, линкер может быть любым линкером, способным образовывать одну полипептидную цепь, сохраняя при этом специфичность связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать от точно или примерно 10 до 45 аминокислот, например, от 10 до 30 аминокислот или от 26 до 41 аминокислотных остатков, например 29, 30, 31 или 32 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет формулу -PGGG-(SGGGG)n-P-, где n равно 5 или 6, и P является пролином, G является глицином и S является серином (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления, линкер между цепью TCRα или ее частью и цепью TCRβ или ее частью, который распознается и/или может расщепляться протеазой. В некоторых вариантах осуществления, линкер между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь TCRα или ее часть, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь TCRβ или ее часть, содержит мультицистронный элемент.

В некоторых вариантах осуществления, трансген является или содержит последовательность нуклеотидов, которая является или содержит структуру [цепь TCRβ]-[линкер или мультицистронный элемент]-[цепь TCRα]. В конкретных вариантах осуществления, трансген является или содержит последовательность нуклеотидов, которая является или содержит структуру [цепь TCRα]-[линкер или мультицистронный элемент]-[цепь TCRβ]. В некоторых аспектах, мультицистронный элемент содержит элемент проскока рибосомы/элемент саморасщепления (например, элемент 2A) или внутренний участок посадки рибосомы (IRES), такой как любой из описанных в настоящем документе.

(iv) *Дополнительные молекулы, например маркеры*

В некоторых вариантах осуществления, трансген также содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих одну или несколько дополнительных молекул, таких как антитело, антиген, дополнительные химерные или дополнительные полипептидные цепи мультицепочечного рекомбинантного рецептора (например, мультицепочечный CAR, химерный костимулирующий рецептор, ингибирующий

рецептор, индуцибельный химерный антигенный рецептор или другие компоненты мультицепочечных рекомбинантных рецепторных систем, описанных в настоящем документе, например, в Разделе III.B.2, или рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), описанный в Разделе III.B.3), маркер трансдукции или суррогатный маркер (например, усеченный маркер клеточной поверхности), фермент, факторы, фактор транскрипции, ингибирующий пептид, фактор роста, ядерный рецептор, гормон, лимфокин, цитокин., хемокин, растворимый рецептор, растворимый цитокиновый рецептор, растворимый хемокиновый рецептор, репортер, функциональные фрагменты или функциональные варианты любого из вышеперечисленных и комбинации вышеперечисленных. В некоторых аспектах, такая последовательность нуклеотидов, кодирующая одну или несколько дополнительных молекул, может быть расположена 5' от последовательности нуклеотидов, кодирующих области или домены рекомбинантного рецептора. В некоторых аспектах, последовательности, кодирующие одну или несколько других молекул, и последовательность нуклеотидов, кодирующая области или домены рекомбинантного рецептора, разделены регуляторными последовательностями, такими как элемент проскока рибосомы 2A и/или промоторные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, трансген также содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько дополнительных молекул. В некоторых аспектах, одна или несколько дополнительных молекул содержат один или несколько маркеров. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько маркеров содержат маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или маркер отбора. В некоторых вариантах осуществления, трансген также содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые могут улучшать эффективность терапии, например, путем стимулирования жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; последовательности нуклеиновых кислот для обеспечения генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например для оценки выживаемости или локализации *in vivo;* последовательности нуклеиновых кислот для улучшения безопасности, например, которые делают клетку восприимчивой к негативной селекции in vivo, как описано Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.,* 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); см. также WO 1992008796 и WO 1994028143, описывающие использование бифункциональных селектируемых слитых генов, полученных в результате слияния доминантно-положительного селектируемого маркера с негативным селектируемым маркером, и патент США № 6,040,177. В некоторых аспектах, маркеры включают любые маркеры, описанные в настоящем документе, например, в этом разделе или разделах II или III.B, или любые дополнительные молекулы и/или рецепторные полипептиды, описанные в настоящем документе, например, в разделе III.B.2. В некоторых вариантах осуществления, дополнительной молекулой является суррогатный маркер, необязательно, усеченный рецептор, необязательно, где усеченный рецептор лишен внутриклеточного сигнального домена и/или не способен опосредовать внутриклеточную передачу сигналов при связывании своим лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, маркером является маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер можно использовать для обнаружения клеток, которые были введен с полинуклеотидом, например полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, маркер трансдукции может указывать или подтверждать модификацию клетки. В некоторых вариантах осуществления, суррогатным маркером является белок, который предназначен для совместной экспрессии на поверхности клетки с рекомбинантным рецептором, например TCR или CAR. В конкретных вариантах осуществления, таким суррогатным маркером является поверхностный белок, который был модифицирован так, чтобы иметь небольшую активность или ее отсутствие. В некоторых вариантах осуществления, суррогатный маркер кодирован тем же полинуклеотидом, который кодирует рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, необязательно разделенной внутренним участком посадки рибосомы (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, такой как последовательность 2A, такая как T2A, P2A, E2A или F2A. Гены внешних маркеров могут в некоторых случаях использоваться в связи со сконструированной клеткой, чтобы позволить обнаружение или отбор клеток и, в некоторых случаях, также способствовать элиминации клетки и/или самоубийству клетки.

Типовые суррогатные маркеры могут включать усеченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как усеченные формы, которые являются не функциональными и не трансдуцируют или не способны трансдуцировать сигнал или сигнал, обычно трансдуцируемый полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не способны к интернализации. Типовые усеченные полипептиды клеточной поверхности, включая усеченные формы факторов роста или других рецепторов, такие как усеченный рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (tHER2), усеченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, типовая последовательность tEGFR приведена в SEQ ID NO: 7 или 16.) или простат-специфический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированная форма. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (Erbitux®) или другим терапевтическим анти-EGFR антителом или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или отбора клеток, которые были сконструированы с использованием конструкции tEGFR и кодируемого экзогенного белка, и/или для элиминации или отделения клеток, экспрессирующих кодированный экзогенный белок. См. патент США № 8,802,374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). В некоторых аспектах, маркер, *например* суррогатный маркер, содержит весь или часть (*например,* усеченную форму) CD34, NGFR, CD19 или усеченный CD19, например усеченный не человеческий CD19, или рецептор эпидермального фактора роста (*например,* tEGFR).

В некоторых вариантах осуществления, маркер является или содержит

определяемый белок, такой как флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсвернутый GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), усиленный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP), а также их варианты, включая варианты видов, мономерные варианты, кодон-оптимизированные, стабилизированные и/или усиленные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления, маркер является или содержит фермент, такой как люцифераза, ген lacZ из *E. coli,* щелочную фосфатазу, секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). Примеры светоизлучающих репортерных генов включают люциферазу (luc), β-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β-глюкуронидазу (GUS) или их варианты. В некоторых аспектах, экспрессия фермента может быть определена путем добавления субстрата, который может быть определен по экспрессии и функциональной активности фермента.

В некоторых вариантах осуществления, маркером является маркер отбора. В некоторых вариантах осуществления, маркер отбора является или содержит полипептид, который придает резистентность к экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркером отбора является ген резистентности к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления, маркером отбора является ген резистентности к антибиотикам, придающий резистентность к антибиотику клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, маркер отбора является или содержит ген резистентности к пуромицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к бластицидину, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к генетицину или ген резистентности к зеоцину, или их модифицированную форму.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой является «не своя» молекула, например, «не свой» белок, т.е. белок, который не распознается как «свой» иммунной системой хозяина, которому адоптивно переносят клетки.

В некоторых вариантах осуществления, маркер не выполняет терапевтических функций и/или не производит никакого эффекта, кроме использования в качестве маркера для генной инженерии, например, для отбора успешно сконструированных клеток. В других вариантах осуществления, маркером может быть терапевтическая молекула или молекула, иным образом оказывающая некоторый желаемый эффект, такая как лиганд для клетки, встречающейся in vivo, такая, как костимулирующаая молекула или молекула иммунной контрольной точки для усиления и/или подавления ответов клеток при адоптивном переносе и встрече с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательности, кодирующие одну или несколько дополнительных молекул, которые являются иммуномодулирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующая молекула выбрана из модулятора иммунных контрольных точек,

ингибитора иммунных контрольных точек, цитокина или хемокина. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующим агентом является ингибитор иммунной контрольной точки, способный ингибировать или блокировать функцию молекулы иммунной контрольной точки или сигнальный путь, включающий молекулу иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления, молекула иммунной контрольной точки выбрана из PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, LAG-3, TIM3, VISTA, рецептора аденозина или внеклеточного аденозина, необязательно, рецептора аденозина 2A (A2AR) или рецептора аденозина 2B (A2BR), или аденозина, или пути, включающего любую из вышеперечисленных. Другие типовые дополнительные молекулы содержат эпитопные метки, определяемые молекулы, такие как флуоресцентные или люминесцентные белки, или молекулы, которые опосредуют усиленный рост клеток и/или амплификацию гена (например, дигидрофолатредуктаза). Эпитопные метки содержат, например, одну или несколько копий FLAG, His, myc, Tap, HA или любую определяемую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные молекулы могут включать не кодирующие последовательности, ингибирующие последовательности нуклеиновых кислот, такие как антисмысловые РНК, РНКи, кшРНК и микроРНК (миРНК) или последовательности распознавания нуклеаз.

В некоторых аспектах, дополнительная молекула может включать любые дополнительные рецепторные полипептиды, описанные в настоящем документе, такие как любая дополнительная полипептидная цепь мультицепочечного рекомбинантного рецептора, например, как описано в разделе III.B.2.

(v) *Мультицистронные элементы и регуляторные или контрольные элементы*

В некоторых вариантах осуществления, трансген (например, последовательности экзогенной нуклеиновой кислоты) также содержит один или несколько гетерологичных или экзогенных регуляторных или контрольных элементов, например цис-регуляторных элементов, которые не являются или отличаются от регуляторных или контрольных элементов эндогенного локуса *TGFBR2*. В некоторых аспектах, гетерологичные регуляторные или контрольные элементы содержат, например, промотор, энхансер, интрон, инсулятор, сигнал полиаденилирования, последовательность терминации транскрипции, консенсусную последовательность Козака, мультицистронный элемент (например, внутренние участки посадки рибосомы (IRES), последовательность 2A), последовательности, соответствующие нетранслируемым областям (UTR) информационной РНК (иРНК), и последовательности акцептора или донора сплайсинга, такие как те, которые не отличаются или отличаются от регуляторного или контрольного элемента в локусе *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичные регуляторные или контрольные элементы содержат промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусную последовательность Козака, последовательность акцептора сплайсинга и/или последовательность донора сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит промотор, который является гетерологичным и/или обычно не присутствует на или рядом с сайтом-мишенью. В некоторых аспектах,

регуляторный или контрольный элемент содержит элементы, необходимые для регуляции или контроля экспрессии рекомбинантного рецептора, когда он интегрирован в локус *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, трансгенные последовательности содержат последовательности, соответствующие 5' и/или 3' нетранслируемым областям (UTR) гетерологичного гена или локуса. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность может включать любые регуляторные или контрольные элементы, описанные в настоящем документе, включая элементы, описанные в этом разделе и разделе II.

Трансген, включая трансген, кодирующий одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его часть, может быть вставлен так, чтобы его экспрессия управлялась эндогенным промотором в сайте интеграции, а именно промотором, который управляет экспрессией эндогенного гена *TGFBR2*.. В некоторых вариантах осуществления, в которых последовательности, кодирующие полипептид, не имеют промотор, экспрессия интегрированного трансгена затем обеспечивается транскрипцией, управляемой эндогенным промотором или другим контрольным элементом в представляющей интерес области. Например, трансген, кодирующий часть рекомбинантного рецептора, может быть вставлен без промотора, но внутри рамки с кодирующей последовательностью эндогенного локуса *TGFBR2,* так что экспрессия интегрированного трансгена контролируется транскрипцией эндогенного промотора и/или другими регуляторными элементами на сайте интеграции. В некоторых вариантах осуществления, мультицистронный элемент, такой как элемент проскока рибосомы/элемент саморасщепления (например, элемент 2A или внутренний участок посадки рибосомы (IRES)), размещают перед трансгеном, кодирующим часть рекомбинантного рецептора так, что мультицистронный элемент расположен в рамке считывания с одним или несколькими экзонами эндогенной открытой рамки считывания на локусе *TGFBR2,* так, что экспрессия трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор, функционально связана с эндогенным промотором *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность не содержит последовательность, кодирующую 3' UTR. В некоторых вариантах осуществления, после интеграции трансгена в эндогенный локус *TGFBR2,* трансген интегрируется выше 3' UTR эндогенного локуса *TGFBR2,* так что сообщение, кодирующее рекомбинантный рецептор, содержит 3' UTR эндогенного локуса *TGFBR2,* например, из открытой рамки считывания или ее частичной последовательности эндогенного локуса *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания или ее частичная последовательность, кодирующая оставшуюся часть рекомбинантного рецептора, содержит 3' UTR эндогенного локуса *TGFBR2*.

В некоторых вариантах осуществления, «тандемную» кассету интегрируют в выбранный сайт. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько «тандемных» кассет кодируют один или несколько полипептидов или факторов, каждый из которых независимо контролируется регуляторным элементом или все контролируются как мультицистронная система экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, таких как

те, в которых полинуклеотид содержит первую и вторую последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности, кодирующие каждую из различных полипептидных цепей, могут быть функционально связаны с промотором, который может быть одинаковым или разным. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты может содержать промотор, который управляет экспрессией двух или нескольких различных полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления, такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть полицистронными (бицистронными или трицистронными, см., *например,* патент США № 6,060,273). В некоторых вариантах осуществления, единицы транскрипции могут быть сконструированы как бицистронные единицы, содержащие IRES (внутренний участок посадки рибосомы), который позволяет коэкспрессию генных продуктов посредством сообщения от одного промотора. Альтернативно, в некоторых случаях, один промотор может управлять экспрессией РНК, которая содержит в одной открытой рамке считывания (ORF), два или три полипептида, отделенных друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (*например,* последовательностями 2A) или сайт распознавания протеазы (*например,* фурин), как описано в настоящем документе. Таким образом, ORF кодирует один полипептид, который либо во время (в случае 2A), либо после трансляции процессируется в отдельные белки. В некоторых вариантах осуществления, «тандемная кассета» содержит первый компонент кассеты, содержащий последовательность без промотора, за которой следует последовательность терминации транскрипции, и вторую последовательность, кодирующую кассету автономной экспрессии или последовательность мультицистронной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, тандемная кассета кодирует два или несколько разных полипептидов или факторов, например, две или несколько цепей или доменов рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие две или несколько цепей или доменов рекомбинантного рецептора, вводят в виде тандемных кассет экспрессии или би- или мультицистронных кассет в один сайт интеграции ДНК-мишени.

В некоторых случаях мультицистронный элемент, такой как T2A, может вызывать проскок рибосомой (проскок рибосомы) синтеза пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и следующим ниже пептидом (*см.,* например, de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) и de Felipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004); также называемым элементом самоотщепления). Это позволяет контролировать встроенный трансген с помощью транскрипции эндогенного промотора в сайте интеграции, таком как промотор *TGFBR2.* Типовой мультицистронный элемент содержит последовательности 2A вируса ящура (F2A, *например,* SEQ ID NO: 21), вируса ринита A лошадей (E2A, *например,* SEQ ID NO: 20), вируса Thosea asigna (T2A, *например,* SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1 свиньи (P2A, *например,* SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в патентной публикации США. № 20070116690. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит элемент проскока рибосомы P2A (последовательность, представленная в SEQ ID NO: 18 или 19) выше трансгена, например

нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть.

В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его части и/или последовательности, кодирующие дополнительную молекулу, независимо содержат один или несколько мультицистронных элементов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько мультицистронных элементов расположены выше последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ее рекомбинантную рецепторную часть, и/или последовательностей, кодирующих дополнительную молекулу. В некоторых вариантах осуществления, мультицистронный элемент расположен между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ее часть рекомбинантного рецептора, и/или последовательностями, кодирующими дополнительную молекулу. В некоторых вариантах осуществления, мультицистронный элемент расположен между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей части или цепи рекомбинантного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный регуляторный или контрольный элемент содержит гетерологичный промотор. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный промотор выбран из конститутивного промотора, индуцибельного промотора, репрессируемого промотора и/или тканеспецифического промотора. В некоторых вариантах осуществления, регуляторным или контрольным элементом является промотор и/или энхансер, например конститутивный промотор или индуцибельный или тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор выбран из промотора pol I, pol II или pol III РНК. В некоторых вариантах осуществления, промотор распознается РНК-полимеразой II (например, CMV, ранней областью SV40 или главным поздним промотором аденовируса). В некоторых вариантах осуществления, промотор распознается РНК-полимеразой III (например, промотором U6 или H1). В некоторых вариантах осуществления, промотор является или содержит конститутивный промотор. Примеры конститутивных промоторов включают, например, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина C человека (UBC), промотор фактора элонгации 1α (EF1α), промотор фосфоглицераткиназы 1 мыши (PGK) и промотор β-актина курицы, связанный с ранним энхансером CMV (CAGG). В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный промотор является или содержит промотор фактора элонгации 1 альфа (EF1α) или промотор MND, или его вариант.

В некоторых вариантах осуществления, промотором является регулируемый промотор (например, индуцибельный промотор). В некоторых вариантах осуществления, промотором является индуцибельный промотор или репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор содержит последовательность оператора Lac, последовательность оператора тетрациклина, последовательность оператора галактозы, последовательность оператора доксициклина или элемент, чувствительный к трансформирующему фактору роста бета (TGFβ), или является его аналогом или может связываться с или распознаваться репрессором Lac, или репрессором тетрациклина, или

фактором транскрипции, чувствительным к TGFβ, или их аналогом. Типовые чувствительные к TGFβ элементы включают элементы, описанные, например, в Mostert et al., (2001) Eur. J. Biochem 268:6176-6181; Denissova et al., (2000) Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6397-402; Riccio et al., (1992) Mol. Cel. Boil. 12(4):1846-1855; и Boon et al., (2007) Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27:532-539. В некоторых вариантах осуществления, промотором является тканеспецифический промотор. В некоторых случаях, промотор экспрессируется только в конкретном типе клеток (например, промотор, специфичный для Т-клеток, В-клеток или NK-клеток).

В некоторых вариантах осуществления, промотор является или содержит конститутивный промотор. Примеры конститутивных промоторов включают, например, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина С человека (UBC), промотор фактора элонгации 1α (EF1α), промотор фосфоглицераткиназы 1 мыши (PGK). и промотор β-актина курицы, связанный с ранним энхансером CMV (CAGG). В некоторых вариантах осуществления, конститутивным промотором является синтетический или модифицированный промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор является или содержит промотор MND, синтетический промотор, который содержит область U3 модифицированного LTR MoMuLV с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы (см. Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755). В некоторых вариантах осуществления, промотором является тканеспецифический промотор. В некоторых случаях промотор управляет экспрессией только в конкретном типе клеток (например, промотор, специфичный для Т-клеток, В-клеток или NK-клеток).

В некоторых вариантах осуществления, промотором является вирусный промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотором является не вирусный промотор. В некоторых случаях промотор выбирают из промотора фактора элонгации 1 альфа (EF1α) (например, указанного в SEQ ID NO: 77 или 118) или его модифицированной формы (промотора EF1α с энхансером HTLV1; например, указанного в SEQ ID NO: 119) или промотора MND (например, указанного в SEQ ID NO: 186). В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид не содержит гетерологичный или экзогенный регуляторный элемент, например, промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотором является двунаправленный промотор (см., например, WO2016/022994).

В некоторых вариантах осуществления, трансгенные последовательности могут также включать последовательности акцептора сплайсинга. Примеры известных последовательностей акцептора сайта сплайсинга содержат, например, CTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAG (SEQ ID NO: 78) (из гена HBB человека) и TTTCTCTCCACAG (SEQ ID NO: 79) (из гена IgG человека).

В некоторых вариантах осуществления, трансгенные последовательности могут также включать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и/или сигнала полиаденилирования. В некоторых аспектах, типовой сигнал полиаденилирования выбран из последовательности терминации транскрипции SV40, hGH, BGH и rbGlob и/или

сигнала полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит сигнал полиаденилирования SV40. В некоторых вариантах осуществления, если они присутствуют в трансгене, последовательностью терминации транскрипции и/или сигналом полиаденилирования обычно является наибольшая 3' последовательность в трансгене, и она связана с одним из плеч гомологии. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность не содержит последовательность, кодирующую 3' UTR или терминатор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления, после интеграции трансгена в эндогенный локус *TGFBR2,* трансген интегрируется выше 3 'UTR и/или терминатора транскрипции эндогенного локуса *TGFBR2,* так что сообщение, кодирующее рекомбинантный рецептор, содержит 3' UTR эндогенного локуса *TGFBR2,* например, из открытой рамки считывания или ее частичной последовательности эндогенного локуса *TGFBR2.* Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, после интеграции трансгенных последовательностей, кодирующих часть рекомбинантного рецептора, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, функционально связаны, чтобы находиться под контролем 3 'UTR, терминатора транскрипции и/или других регуляторных элементов эндогенного локуса *TGFBR2.*

(vi) *Типовые трансгенные последовательности*

В некоторых вариантах осуществления, типовой трансген содержит в порядке от 5’ до 3' последовательность нуклеотидов, кодирующую каждое кодирование: трансмембранный домен (или мембраноассоциированный домен) и внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, типовой трансген содержит в порядке от 5’ до 3' последовательность нуклеотидов, кодирующую каждое кодирование: внеклеточную область, трансмембранный домен и внутриклеточную область.

В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является CAR, и типовая трансгенная последовательность содержит в направлении от 5’ до 3' последовательность нуклеотидов, каждая из которых кодирует: сигнальный пептид, внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную область, содержащую первичный сигнальный домен или область и/или костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, типовая трансгенная последовательность содержит в направлении от 5’ до 3' последовательность нуклеотидов, каждая из которых кодирует: сигнальный пептид, внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления, типовая трансгенная последовательность содержит в направлении от 5’ до 3' последовательность нуклеотидов, каждая из которых кодирует: сигнальный пептид, внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и первичный сигнальный домен или область.

В некоторых вариантах осуществления, типовая трансгенная последовательность содержит в направлении от 5’ до 3' последовательность нуклеотидов, каждая из которых кодирует: трансмембранный домен (или мембраноассоциированный домен),

внутриклеточный домен мультимеризации, необязательно один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и первичный сигнальный домен или область. В некоторых вариантах осуществления, типовая трансгенная последовательность содержит в направлении от 5’ до 3' последовательность нуклеотидов, каждая из которых кодирует: внеклеточный домен мультимеризации, трансмембранный домен, необязательно один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и первичный сигнальный домен или область.

В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность содержит, в порядке последовательности нуклеотидов, кодирующей внеклеточный связывающий домен, необязательно, scFv; спейсер, необязательно содержащий последовательность из шарнира иммуноглобулина человека, необязательно, из IgG1, IgG2 или IgG4 или их модифицированной версии, необязательно, дополнительно включающий область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, необязательно из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, необязательно из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, необязательно цепь CD3ζ или ее часть. В некоторых вариантах осуществления, кодированная внутриклеточная область рекомбинантного рецептора содержит, от своего N-конца к С-концу в следующем порядке: один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и первичный сигнальный домен или область, например, содержащую CD3дзета или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, типовой трансген содержит в порядке от 5’ до 3' последовательность нуклеотидов, кодирующую каждое кодирование: трансмембранный домен (или мембраноассоциированный домен) и внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, типовой трансген содержит в порядке от 5’ до 3' последовательность нуклеотидов, кодирующую каждое кодирование: внеклеточную область, трансмембранный домен и внутриклеточную область.

В некоторых вариантах осуществления, типовая трансгенная последовательность кодирует всю или часть цепи TCRα. В некоторых вариантах осуществления, типовая трансгенная последовательность кодирует всю или часть цепи TCRβ. В некоторых вариантах осуществления, типовая трансгенная последовательность кодирует всю или часть как цепи TCRα, так и цепи TCRβ. В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), и типовой трансген содержит в порядке от 5’ до 3' [цепь TCRβ]-[линкер или мультицистронный элемент]-[цепь TCRα]. В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, и типовой трансген содержит в порядке от 5’ до 3' [цепь TCRα]-[линкер или мультицистронный элемент]-[цепь TCRβ].

В некоторых вариантах осуществления, типовые трансгенные последовательности также могут содержать мультицистронный элемент, например, элемент 2A или внутренний участок посадки рибосомы (IRES), и/или регуляторный или контрольный элемент, например промотор, расположенный 5' от последовательности, кодирующей сигнальный

пептид и/или внеклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, типовые трансгенные последовательности также могут содержать дополнительные последовательности, например последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько дополнительных молекул, таких как маркер, дополнительный рекомбинантный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, иммуномодулирующая молекула, лиганд, цитокин или хемокин. В некоторых аспектах, последовательности, кодирующие одну или несколько других молекул, и последовательность нуклеотидов, кодирующая области или домены рекомбинантного рецептора, разделены регуляторными последовательностями, такими как элемент проскока рибосомы 2A и/или промоторные последовательности. В некоторых аспектах, в типовом трансгене, последовательность нуклеотидов, кодирующая одну или несколько дополнительных молекул, расположена 5’ от последовательностей, кодирующих сигнальный пептид и/или внеклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеотидов, кодирующая одну или несколько дополнительных молекул, помещена между мультицистронным элементом и/или регуляторным или контрольным элементом и последовательностью нуклеотидов, кодирующей области или домены рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеотидов, кодирующая одну или несколько дополнительных молекул, расположена между двумя элементами и/или регуляторными или контрольными элементами. В некоторых вариантах осуществления, типовая трансгенная последовательность содержит в направлении от 5’ до 3': мультицистронный элемент и/или регуляторный элемент, последовательность нуклеотидов, кодирующую дополнительную молекулу, мультицистронный элемент и/или регуляторный элемент, сигнальный пептид., последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую области или домены рекомбинантного рецептора (например, внеклеточную область, трансмембранный домен, внутриклеточную область).

b. Плечи гомологии

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит одну или несколько последовательностей гомологии (также называемых «плечами гомологии») на 5' и/или 3' концах, связанных с или окружающих трансгенные последовательности, кодирующие одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или их часть. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько плеч гомологии содержат 5’ и/или 3' плечи гомологии. Плечи гомологии позволяют механизмам репарации ДНК, например, механизму гомологичной рекомбинации, распознавать гомологию и использовать матричный полинуклеотид в качестве матрицы для репарации, и последовательность нуклеиновой кислоты между плечами гомологии копируется в ДНК, подлежащую репарации, эффективно вставляя или интегрируя трансгенные последовательности в сайт-мишень интеграции в геноме между локациями гомологии.

В некоторых аспектах, при интеграции трансгенных последовательностей, весь рекомбинантный рецептор кодирован трансгенными последовательностями, и вся кодирующая последовательность или часть кодирующих последовательностей эндогенного

локуса *TGFBR2* удаляется. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, которая находится внутри рамки с одним или несколькими экзонами открытой рамки считывания локуса *TGFBR2,* содержащегося в одном или нескольких плечах гомологии. В некоторых аспектах, весь рекомбинантный рецептор кодирован трансгенными последовательностями, и только часть локуса *TGFBR2* удалена, и оставшаяся часть эндогенного локуса *TGFBR2* экспрессируется. В некоторых аспектах, оставшаяся часть локуса *TGFBR2,* которая экспрессируется, в некоторых случаях, кодирует доминантно-негативную форму TGFBRII.

В некоторых вариантах осуществления, последовательности плеч гомологии содержат последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, окружающим генетическое разрушение, например, сайт-мишень в локусе *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит следующие компоненты: [5’ плечо гомологии]-[трансгенные последовательности (экзогенные или гетерологичные последовательности нуклеиновых кислот, например, кодирующие одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его часть)]-[3’ плечо гомологии]. В некоторых вариантах осуществления, 5' последовательности плеч гомологии содержат непрерывные последовательности, которые гомологичны последовательностям, расположенным рядом с генетическим разрушением на 5' стороне. В некоторых вариантах осуществления, 3' последовательности плеч гомологии содержат непрерывные последовательности, которые гомологичны последовательностям, расположенным рядом с генетическим нарушением на 3' стороне. В некоторых аспектах, сайт-мишень определяют путем таргетирования одного или нескольких агентов, способных вносить генетическое разрушение, например, Cas9 и нРНК, направленных на конкретный сайт в локусе *TGFBR2.*

В некоторых аспектах, трансгенные последовательности в матричном полинуклеотиде можно использовать для определения местоположения сайтов-мишеней и/или плеч гомологии. В некоторых аспектах, сайт-мишень генетического разрушения может использоваться в качестве руководства для создания матричных полинуклеотидов и/или плеч гомологии, используемых для HDR. В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение может быть направлено на желаемый сайт таргетной интеграции трансгенных последовательностей. В некоторых аспектах, плечи гомологии предназначены для таргетирования интеграции внутри экзона открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2,* и последовательности плеч гомологии определяют на основе желаемой локации интеграции, окружающей генетическое разрушение, включая последовательности экзона и интрона, окружающие генетические разрушения. В некоторых вариантах осуществления, локация сайта-мишени, относительная локация одного или нескольких плеч гомологии и трансгена (экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты) для вставки может быть создана в зависимости от требований к эффективному таргетированию и длины матричного полинуклеотида или вектора, который можно использовать. В некоторых аспектах, плечи гомологии предназначены для таргетирования интеграции в интроне открытой рамки считывания локуса *TGFBR2.* В некоторых аспектах, плечи

гомологии предназначены для таргетирования интеграции внутри экзона открытой рамки считывания локуса *TGFBR2*.

В некоторых аспектах, сайт-мишень интеграции (сайт таргетной интеграции) в локусе *TGFBR2* расположен в пределах открытой рамки считывания в эндогенном локусе *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень интеграции находится на или рядом с любым из сайтов-мишеней, описанных в настоящем документе, например, в разделе I.A. В некоторых аспектах, локация-мишень для интеграции находится на или вокруг сайта-мишени для генетического разрушения, например, в пределах менее чем 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по от сайта-мишени для генетического разрушения.

В некоторых аспектах, сайт-мишень интеграции находится внутри экзона открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*. В некоторых аспектах, сайт-мишень интеграции находится внутри интрона открытой рамки считывания локуса *TGFBR2*. В некоторых аспектах, сайт-мишень интеграции находится внутри регуляторного или контрольного элемента, например промотора, локуса *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, сайт-мишень интеграции находится внутри или в непосредственной близости от экзонов, соответствующих ранней кодирующей области, например экзона 1, 2, 3, 4 или 5 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2,* или содержит последовательность, непосредственно следующую за сайтом начала транскрипции внутри экзона 1, 2, 3, 4 или 5 (например, как описано в **Таблице 1** или **2** в настоящем документе) или в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по от экзона 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления, интеграция направлена на или рядом с экзоном 2 эндогенного локуса *TGFBR2* или в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по от экзона 2. В некоторых аспектах, сайт-мишень интеграции находится на или рядом с экзоном 1 эндогенного локуса *TGFBR2,* например, в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по от экзона 1. В некоторых вариантах осуществления, сайт интеграции-мишени находится в или рядом с экзоном 2 эндогенного локуса *TGFBR2* или в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по от экзона 2. В некоторых аспектах, сайт-мишень интеграции находится на или рядом с экзоном 3 эндогенного локуса *TGFBR2,* например, в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по от экзона 3. В некоторых аспектах, сайт-мишень интеграции находится на или рядом с экзоном 4 эндогенного локуса *TGFBR2,* например, в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по от экзона 4. В некоторых аспектах, сайт-мишень интеграции цели находится на или рядом с экзоном 5 эндогенного *TGFBR2* локуса, например, в пределах менее 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 по от экзона 5. В некоторых аспектах, сайт-мишень интеграции находится внутри регуляторного или контрольного элемента, например промотора, локуса *TGFBR2*.

В некоторых вариантах осуществления, 5' последовательности плеч гомологии содержат непрерывные последовательности из приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 или 5000 пар оснований 5’

сайта-мишени для генетического разрушения, начиная с сайта-мишени в эндогенном локусе *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, 3' последовательности плеч гомологии содержат смежные последовательности из приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 или 5000 пар оснований 3’ от сайта-мишени для генетического нарушения, начиная с сайта-мишени в эндогенном локусе *TGFBR2*. Таким образом, после интеграции посредством HDR трансгенная последовательность направлена на интеграцию на или рядом с сайтом-мишенью для генетического разрушения, например, сайтом-мишенью в экзоне или интроне эндогенного локуса *TGFBR2*.

В некоторых аспектах, плечи гомологии содержат последовательности, которые гомологичны части последовательности открытой рамки считывания на эндогенном локусе *TGFBR2*. В некоторых аспектах, последовательности плеч гомологии содержат последовательности, гомологичные непрерывной части последовательности открытой рамки считывания, включая экзоны и интроны, в эндогенном локусе *TGFBR2*. В некоторых аспектах, плечо гомологии содержит последовательности, которые идентичны непрерывной части последовательности открытой рамки считывания, включая экзоны и интроны, в эндогенном локусе *TGFBR2*.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит плечи гомологии для таргетной интеграции трансгенных последовательностей в эндогенный локус *TGFBR2* (типовая последовательность геномного локуса описана в **таблицах 1** или **2 в** настоящем документе; типовая последовательность иРНК TGFBRII человека приведена в SEQ ID NO: 61, NCBI Эталонная последовательность: NM_003242.5 или SEQ ID NO: 62, Эталонная последовательность NCBI: NM_001024847.2). В некоторых вариантах осуществления, генетическое разрушение вводят с использованием любого из агентов генетического разрушения, например таргетных нуклеаз и/или нРНК, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит от примерно 500 до 1000, например, от 500 до 900 или от 600 до 700 пар оснований гомологии по обе стороны от генетического разрушения, введенного таргетными нуклеазами и/или нРНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит примерно 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 пар оснований 5' последовательностей плеч гомологии, которые гомологичны 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 парам оснований последовательностей 5' генетического разрушения в локусе *TGFBR2,* трансгене, и примерно 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 пар оснований 3' последовательностей плеч гомологии, которые гомологичны 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 парам оснований последовательностей 3’ генетического разрушения в локусе *TGFBR2*.

В некоторых аспектах, граница между трансгеном и одной или несколькими последовательностями плеч гомологии сконструирована таким образом, что после HDR и таргетной интеграции трансгенных последовательностей, последовательности внутри трансгена, которые кодируют один или несколько полипептидов, например, цепи, домены

или области рекомбинантного рецептора, интегрируются внутри рамки с одним или несколькими экзонами последовательности открытой рамки считывания в эндогенном локусе *TGFBR2* и/или генерирует слияние внутри рамки трансгена, который кодирует полипептид и один или несколько экзонов последовательности открытой рамки считывания в эндогенном локусе *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, доминантно-негативная (DN) форма полипептида TGFBRII, кодированная последовательностями нуклеиновой кислоты эндогенной открытой рамки считывания, и полипептид рекомбинантного рецептора или его часть, кодированный интегрированными трансгенными последовательностями, необязательно, разделены мультицистронным элементом, например элементом 2A.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько последовательностей плеч гомологии содержат последовательности, которые являются гомологичными, по существу идентичными или идентичными последовательностям, которые окружают или фланкируют сайт-мишень, который находится в последовательности открытой рамки считывания в эндогенном локусе *TGFBR2*. В некоторых аспектах, одна или несколько последовательностей плеч гомологии содержат интроны и экзоны частичной последовательности открытой рамки считывания в эндогенном локусе *TGFBR2*. В некоторых аспектах, граница 5' последовательности плеча гомологии и трансгена такова, что в случае трансгена, который не содержит гетерологичный промотор, кодирующая часть трансгенной последовательности сливается внутри рамки с вышестоящим экзоном или его частью, например экзоном 1, 2, 3, 4 или 5, в зависимости от места таргетной интеграции, открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*.

В некоторых аспектах, граница 5' последовательности плеча гомологии и трансгена такова, что расположенные выше экзоны или их часть, например экзоны 1, 2, 3, 4 или 5, открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2* слиты внутри рамки с кодирующими частями трансгенной последовательности. Таким образом, при таргетной интеграции, транскрипции и трансляции, кодированный рекомбинантный рецептор, которым является непрерывный полипептид, продуцируется из слитой последовательности ДНК последовательности открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2* и трансгена. В некоторых аспектах, вышестоящие экзоны или их часть кодируют доминантно-негативную форму полипептида TGFBRII. В некоторых аспектах, при таргетной интеграции, мультицистронный элемент, например, элемент 2A или внутренний участок посадки рибосомы (IRES) разделяет последовательность открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2* и трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, при экспрессии и трансляции из модифицированного локуса *TGFBR2* полипептид расщепляется с образованием доминантно-негативной формы полипептида TGFBRII и рекомбинантного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, типовое 5’ плечо гомологии для таргетной интеграции в эндогенный локус *TGFBR2* содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 69-71, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%,

88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 69-71 или ее частичной последовательностью. В некоторых аспектах, типовое 5’ плечо гомологии для таргетной интеграции трансгена в эндогенный локус *TGFBR2* и создания модифицированного локуса *TGFBR2,* кодирующего доминантно-негативный TGFBRII, содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 70, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 70 или ее частичной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления, типовое 3' плечо гомологии для таргетной интеграции в эндогенный локус *TGFBR2* содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 72, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%., 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72 или ее частичной последовательностью.

В некоторых аспектах, сайт-мишень может определять относительную локацию и последовательности плеч гомологии. Плечо гомологии обычно может простираться, по меньшей мере, до области, в которой может произойти конечная резекция с помощью механизма репарации ДНК после введения генетического разрушения, например, DSB, например, чтобы позволить иссеченному одноцепочечному «липкому» концу найти комплементарный участок в матричном полинуклеотиде. Общая длина может быть ограничена такими параметрами, как размер плазмиды, пределы упаковки вируса или предел размера конструкции.

В некоторых вариантах осуществления, плечо гомологии содержит от примерно 500 до 1000, например, от 600 до 900 или от 700 до 800 пар оснований гомологии по обе стороны от сайта-мишени в эндогенном гене. В некоторых вариантах осуществления, плечо гомологии содержит, по меньшей мере, или менее или примерно 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 пар оснований, гомологию 5’ сайта-мишени, 3' сайта-мишени, или обоих 5’ и 3' сайта-мишени в локусе *TGFBR2.*

В некоторых вариантах осуществления, плечо гомологии содержит точно или примерно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 или 5000 пар оснований гомологии 3’ сайта-мишени в локусе *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, плечо гомологии содержит точно или примерно от 100 до 500, от 200 до 400 или от 250 до 350 пар оснований гомологии 3’ трансгена и/или сайта-мишени в локусе *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, плечо гомологии содержит менее чем примерно 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15 или 10 пар оснований гомологии 5’ сайта-мишени в локусе *TGFBR2.*

В некоторых вариантах осуществления, плечо гомологии содержит точно или примерно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 или 5000 пар оснований гомологии 5’ сайта-мишени в локусе *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, плечо гомологии содержит точно или примерно от 100 до 500, от 200 до 400 или от 250 до 350 пар оснований гомологии 5’ трансгена и/или сайта-мишени

в локусе *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, плечо гомологии содержит менее чем примерно 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15 или 10 пар оснований гомологии 3' сайта-мишени в локусе *TGFBR2*.

В некоторых вариантах осуществления, 3' конец 5' плеча гомологии находится рядом с 5' концом трансгена. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии может простираться, по меньшей мере, на точно или примерно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 или 5000 нуклеотидов 5' от 5' конца трансгена.

В некоторых вариантах осуществления, 5' конец 3' плеча гомологии находится рядом с 3' концом трансгена. В некоторых вариантах осуществления, 3' плечо гомологии может простираться, по меньшей мере, на точно или примерно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 или 5000 нуклеотидов 3' от 3' конца трансгена.

В некоторых вариантах осуществления, для таргетной вставки, плечи гомологии, например, 5' и 3' плечи гомологии, каждое может содержать примерно 1000 пар оснований (по) последовательности, фланкирующей наиболее дистальные сайты-мишени (например, 1000 по последовательности по обе стороны от мутации).

Типовые длины плеч гомологии составляют, по меньшей мере, точно или примерно 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, длина плеча гомологии составляет точно или примерно 50-100, 100-250, 250-500, 500-750, 750-1000, 1000-2000, 2000-3000, 3000-4000 или 4000-5000 нуклеотидов. Типовые длины плеч гомологии включают менее чем или менее чем примерно или составляют или составляют примерно 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, длина плеча гомологии составляет точно или примерно 50-100, 100-250, 250-500, 500-750, 750-1000, 1000-2000, 2000-3000, 3000-4000 или 4000-5000 нуклеотидов. Типовые длины плеч гомологии составляют от точно или примерно 100 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 200 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 750 нуклеотидов от точно или примерно 200 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно или примерно 300 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно или от

точно или примерно 400 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 750 нуклеотидов или от 750 до точно или примерно 1000 нуклеотидов.

В некоторых из таких вариантов осуществления, трансген интегрирован с помощью матричного полинуклеотида, введенного в каждую из множества Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит структуру [5' плечо гомологии]-[трансген]-[3' плечо гомологии]. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии содержат последовательности нуклеиновой кислоты, гомологичные последовательностям нуклеиновой кислоты, окружающим, по меньшей мере, один или примерно один сайт-мишень. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии содержит последовательности нуклеиновой кислоты, которые гомологичны последовательностям нуклеиновой кислоты 5’ сайта-мишени. В конкретных вариантах осуществления, 3' плечо гомологии содержит последовательности нуклеиновой кислоты, которые гомологичны последовательностям нуклеиновой кислоты 3’ сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, 5’ плечо гомологии и плечо гомологии 3' независимо содержат, по меньшей мере, точно или примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 нуклеотидов, или менее чем или менее чем примерно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо расположены между точно или примерно 50 и точно или примерно 100, 100 и точно или примерно 250, 250 и точно или примерно 500, 500 и точно или примерно 750, 750 и точно или примерно 1000, 1000 и точно или примерно 2000 нуклеотидов. В некоторых из таких вариантов осуществления, 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину от точно или примерно 50 до точно или примерно 100 нуклеотидов, длину от точно или примерно 100 до точно или примерно 250 нуклеотидов, длину от точно или примерно 250 до точно или примерно 500 нуклеотидов, длину от точно или примерно 500 до точно или примерно 750 нуклеотидов, длину от точно или примерно 750 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, или длину от точно или примерно 1000 до точно или примерно 2000 нуклеотидов.

В конкретных вариантах осуществления, 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо состоят из от точно или примерно 100 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 200 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 1000 нуклеотидов от точно или примерно 200 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно

400 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 750 нуклеотидов, из от точно или примерно 400 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 750 нуклеотидов или от точно или примерно 750 до точно или примерно 1000 нуклеотидов. В конкретных вариантах осуществления, 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину от точно или примерно 100 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 200 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 750 нуклеотидов или от точно или примерно 750 до точно или примерно 1000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии и 3' плечо независимо имеют длину примерно 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 нуклеотидов или любое значение между любыми из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии и 3' плечо независимо имеют длину более точно или примерно 300 нуклеотидов, необязательно, где 5' плечо гомологии и 3' плечо независимо имеют длину точно или примерно 400, 500 или 600 нуклеотидов или любое значение между любыми из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, 5' плечо гомологии и 3' плечо независимо имеют длину более чем точно или примерно 300 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько плеч гомологии содержат последовательность нуклеотидов, гомологичную последовательностям, кодирующим TGFBRII или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько плеч гомологии соединены или связаны в рамке с трансгенными последовательностями, кодирующими рекомбинантный рецептор или его часть.

В некоторых вариантах осуществления, используют альтернативную HDR. В некоторых вариантах осуществления, альтернативная HDR проходит более эффективно, когда матричный полинуклеотид имеет расширенную гомологию 5’ до сайта-мишени (т.е. в 5' направлении цепи сайта-мишени). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид имеет более длинное плечо гомологии и более короткое плечо гомологии, где более длинное плечо гомологии может отжигать 5’ сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, плечо, которое может отжигать 5’ к сайту-мишени, находится, по меньшей мере, в 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000., 1500, 2000, 3000, 4000 или 5000 нуклеотидах от сайта-мишени или 5’ или 3' конца трансгена. В некоторых вариантах осуществления, плечо, которое может отжигать 5’ к сайту-мишени, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% длиннее, чем плечо, которое может отжигать 3' к сайту-мишени. В некоторых вариантах осуществления, плечо, которое может отжигать 5’ к сайту-мишени, по меньшей мере, в 2, 3, 4 или 5 раз длиннее, чем плечо, которое может отжигать 3' к сайту-мишени. В зависимости от того, может ли матрица оцДНК отжигаться до интактной цепи или таргетной цепью, плечо гомологии, которое отжигает 5’ до сайта-мишени, может находиться на 5' конце матрицы оцДНК или 3' конце матрицы оцДНК, соответственно.

Аналогично, в некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид имеет 5' плечо гомологии, трансген и 3' плечо гомологии, так что матричный полинуклеотид имеет расширенную гомологию с 5’ сайта-мишени. Например, 5’ плечо гомологии и плечо гомологии 3' могут иметь по существу одинаковую длину, но трансген может простираться дальше 5’ сайта-мишени, чем 3’ сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, плечо гомологии простирается, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 2x, 3x, 4x или 5x дальше до 5’ конца сайта-мишени, чем 3' конца сайта-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, альтернативная HDR проходит более эффективно, когда матричный полинуклеотид центрирован на сайте-мишени. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид имеет два плеча гомологии, которые по существу имеют одинаковый размер. В некоторых вариантах осуществления, первое плечо гомологии (например, 5' плечо гомологии) матричного полинуклеотида может иметь длину в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%., 2% или 1% второго плеча гомологии (например, 3' плеча гомологии) матричного полинуклеотида.

Аналогично, в некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид имеет 5' плечо гомологии, трансген и 3' плечо гомологии, так что матричный полинуклеотид простирается по существу на одинаковое расстояние с обеих сторон от сайта-мишени. Например, плечи гомологии могут иметь разную длину, но трансген может быть выбран для компенсации этого. Например, трансген может простираться дальше 5’ сайта-мишени, чем 3' сайта-мишени, но, для компенсации, 5’ плечо гомологии сайта-мишени короче, чем 3' плечо гомологии сайта-мишени. Возможно и обратное, например, трансген может простираться дальше 3’ сайта-мишени, чем 5' сайта-мишени, но, для

компенсации, 3’ плечо гомологии сайта-мишени короче, чем 5' плечо гомологии сайта-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, длина матричного полинуклеотида, включая трансгенную последовательность и одно или несколько плеч гомологии, составляет от точно или примерно 1000 до точно или примерно 20000 пар оснований, например примерно 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000 или 20000 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления, длина матричного полинуклеотида ограничена максимальной длиной полинуклеотида, который может быть получен, синтезирован или собран и/или введен в клетку, или емкостью вирусного вектора, а также типом полинуклеотида или вектора. В некоторых аспектах, ограниченная емкость матричного полинуклеотида может определять длину трансгенных последовательностей и/или одного или нескольких плеч гомологии. В некоторых аспектах, объединенная общая длина трансгенных последовательностей и одного или нескольких плеч гомологии должна находиться в пределах максимальной длины или емкости полинуклеотида или вектора. Например, в некоторых аспектах, трансгенная часть матричного полинуклеотида составляет примерно 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 или 4000 пар оснований, и если максимальная длина матричного полинуклеотида составляет примерно 5000 пар оснований, оставшуюся часть последовательности можно разделить между одним или несколькими плечами гомологии, например, так, чтобы 3’ или 5' плечи гомологии могли составлять приблизительно 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 или 2000 пар оснований.

3. Доставка матричных полинуклеотидов

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, например, полинуклеотид, такой как матричный полинуклеотид, содержащий трансгенные последовательности, кодирующие одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора (например, описанного в Разделе I.B.2 настоящего документа), вводят в клетки в нуклеотидной форме, например, в виде полинуклеотида или вектора. В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид содержит трансген, который кодирует одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его часть и одно или несколько плеч гомологии, и может быть введен в клетку для опосредованной репарацией направляемой гомологией (HDR) интеграции трансгенных последовательностей.

В некоторых аспектах, представлены варианты осуществления генной инженерии клеток, путем введения одного или нескольких агентов или их компонентов, способных индуцировать генетические разрушения, для индуцирования HDR и таргетной интеграции трансгенных последовательностей. В некоторых аспектах, один или несколько агентов и матричный полинуклеотид доставляют одновременно. В некоторых аспектах, один или несколько агентов и матричный полинуклеотид доставляют последовательно. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов доставляют до доставки полинуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид вводят в клетку

для конструирования, в дополнение к агентам, способным индуцировать таргетное генетическое разрушение, например, нуклеазе и/или нРНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид может быть доставлен до, одновременно или после введения в клетку одного или нескольких компонентов агентов, способных вызывать таргетное генетическое разрушение. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды доставляют одновременно с агентами. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды доставляют до агентов, например, от секунд до часов или дней до матричных полинуклеотидов, включая, но не ограничиваясь ими, от 1 до 60 минут (или любое время между ними) до агентов, от 1 до 24 часа (или в любое время между ними) до агентов или более чем за 24 часа до агентов. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды доставляют после агентов, от секунд до часов или дней после матричных полинуклеотидов, включая сразу после доставки агента, например, от 30 секунд до 4 часов, например через примерно 30 секунд, 1 минуту, 2 минуты, 3 минуты, 4 минуты, 5 минут, 6 минут, 6 минут, 8 минут, 9 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 30 минут, 40 минут, 50 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа или 4 часа после доставки агентов, и/или, предпочтительно, в течение 4 часов после доставки агентов. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид доставляют более чем через 4 часа после доставки агентов.

В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды можно доставлять с использованием тех же систем доставки, что и агенты, способные вызывать таргетное генетическое разрушение, например нуклеазу и/или нРНК. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды могут быть доставлены с использованием тех же систем доставки, что и агенты, способные вызывать таргетное генетическое разрушение, например нуклеазу и/или нРНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид доставляют одновременно с агентами. В других вариантах осуществления, матричный полинуклеотид доставляют в другое время, до или после доставки агентов. Любой из способов доставки, описанных в настоящем документе в разделе I.A.3 (например, в **таблицах 4** и **5)** для доставки нуклеиновых кислот в агентах, способных индуцировать таргетное генетическое разрушение, например, нуклеазе и/или нРНК, можно использовать для доставки матричного полинуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов и матричный полинуклеотид доставляют в одном и том же формате или способе. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов и матричный полинуклеотид содержатся в векторе, например вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид кодирован на том же скелете вектора, например геноме AAV, плазмидной ДНК, что и Cas9 и нРНК. В некоторых аспектах, один или несколько агентов и матричный полинуклеотид находятся в разных форматах, например, комплекс рибонуклеиновая кислота-белок (RNP) для агента Cas9-нРНК и линейная ДНК для матричного полинуклеотида, но их доставляют используя один и тот же способ.

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид является

линейной или кольцевой молекулой нуклеиновой кислоты, такой как линейная или кольцевая ДНК или линейная РНК, и может быть доставлен с использованием любого из способов, описанных в разделе I.A.3 настоящего документа (например, в **таблицах 4** и **5** в настоящем документе) для доставки молекул нуклеиновой кислоты в клетку.

В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид, например матричный полинуклеотид, вводят в клетки в нуклеотидной форме, например, в виде не вирусного вектора или внутри него. В некоторых вариантах осуществления, не вирусный вектор является или содержит полинуклеотид, например, полинуклеотид ДНК или РНК, который подходит для трансдукции и/или трансфекции любым подходящим и/или известным не вирусным способом доставки гена, таким как, но не ограничиваясь ими, микроинъекцией, электропорацией, временным сжатием или сдавливанием клеток (например, описанным в Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27), опосредованной жиром трансфекцией, опосредованной пептидами доставкой, например, проникающими в клетки пептидами, или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления, не вирусный полинуклеотид доставляют в клетку не вирусным способом, описанным в настоящем документе, таким как не вирусный способ, указанный в **таблице 5** в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность матричного полинуклеотида может содержаться в векторной молекуле, содержащей последовательности, которые не гомологичны вызывающей интерес области в геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, вирусом является ДНК вирус (например, вирус дцДНК или оцДНК). В некоторых вариантах осуществления, вирусом является РНК вирус (например, оцРНК вирус). Типовые вирусные векторы/вирусы включают, например, ретровирусы, лентивирусы, аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирусы коровьей оспы, вирусы оспы и вирусы простого герпеса или любые из вирусов, описанных в другом месте в настоящем документе. Полинуклеотид может быть введен в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие резистентность к антибиотикам. Более того, матричные полинуклеотиды могут быть введены в виде голой нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты с такими материалами, как липосома, наночастица или полоксамер, или могут быть доставлены с помощью вирусов (например, аденовируса, AAV, вируса герпеса, ретровируса, лентивируса и лентивируса с дефектом по интегразе (IDLV)).

В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид может быть перенесен в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93;

Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557) или лентивирусных векторов, происходящих из HIV-1.

В других аспектах, матричный полинуклеотид доставляют вирусными и/или не вирусными способами переноса гена. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид доставляют в клетку через аденоассоциированный вирус (AAV). Можно использовать любой вектор AAV, включая, помимо прочего, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 и их комбинации. В некоторых случаях, AAV содержит LTR, которые относятся к гетерологичному серотипу по сравнению с серотипом капсида (например, ITR AAV2 с капсидами AAV5, AAV6 или AAV8). Матричный полинуклеотид может быть доставлен с использованием той же системы переноса генов, которая используется для доставки нуклеазы (в том числе, в том же векторе), или может быть доставлен с использованием другой системы доставки, которая используется для нуклеазы. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид доставляют с использованием вирусного вектора (например, AAV), и нуклеазы доставляют в форме иРНК. Клетка также может быть обработана одной или несколькими молекулами, которые ингибируют связывание вирусного вектора с рецептором клеточной поверхности, как описано в настоящем документе, до, одновременно и/или после доставки вирусного вектора (например, несущих нуклеазы и/или матричный полинуклеотид).

В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор имеет последовательность длинного концевого повтора (LTR), например, рекомбинантный ретровирусный вектор, полученный из вируса лейкоза Молони мыши (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) или вируса некроза селезенки (SFFV). Большинство ретровирусных векторов получают из ретровирусов мышей. В некоторых вариантах осуществления, ретровирусы включают такие, которые происходят из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы обычно амфотропны, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления, экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Был описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109).

В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды доставляют с использованием вектора AAV, и агенты, способные вызывать таргетное генетическое разрушение, такие как нуклеаза и/или нРНК, доставляют в другой форме, такой как иРНК, кодирующие нуклеазы и/или нРНК. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды и нуклеазы доставляются использованием одного и того же типа способа, такого как вирусный вектор, но в отдельных векторах. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды доставляют в другой системе доставки, чем

агенты, способные вызывать генетические нарушения, такие как нуклеазы и/или нРНК. Типы нуклеиновых кислот и векторов для доставки включают любые из тех, что описаны в разделе III настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды и нуклеазы могут находиться в одном и том же векторе, например, векторе AAV (таком как AAV6). В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды доставляют с использованием вектора AAV, и агенты, способные вызывать таргетное генетическое разрушение, такие как нуклеаза и/или нРНК, доставляют в другой форме, такой как иРНК, кодирующие нуклеазы и/или нРНК. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды и нуклеазы доставляют с использованием одного и того же типа способа, такого как вирусный вектор, но в отдельных векторах. В некоторых вариантах осуществления, матричные полинуклеотиды доставляют в другой системе доставки, чем агенты, способные вызывать генетические нарушения, такие как нуклеазы и/или нРНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид вырезают из скелета вектора in vivo так, чтобы он был фланкирован последовательностями распознавания нРНК. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид находится на отдельной полинуклеотидной молекуле, такой как Cas9 и нРНК. В некоторых вариантах осуществления, Cas9 и нРНК вводят в форме комплекса рибонуклеопротеина (RNP), и матричный полинуклеотид вводят в виде полинуклеотидной молекулы, такой как вектор или линейная молекула нуклеиновой кислоты, например линейная ДНК. Типы нуклеиновых кислот и векторов для доставки содержат любые из тех, которые описаны в разделе II настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления, матричным полинуклеотидом является аденовирусный вектор, например, вектор AAV, например, молекула оцДНК, длина и последовательность которых позволяют упаковывать ее в капсид AAV. Вектор может иметь размер, например, менее 5 тн и может содержать последовательность ITR, которая способствует упаковке в капсид. Вектор может быть не способен к интеграции. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит от примерно 150 до 1000 нуклеотидов гомологии по обе стороны от трансгена и/или сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит примерно 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 нуклеотидов 5’ сайта-мишени или трансгена, 3' сайта-мишени или трансгена, или оба 5’ и 3' сайта-мишени или трансгена. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит, по меньшей мере, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 нуклеотидов 5’ сайта-мишени или трансгена, 3' сайта-мишени или трансгена, или оба 5’ и 3' сайта-мишени или трансгена. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит не более 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 нуклеотидов 5’ сайта-мишени или трансгена, 3' сайта-мишени или трансгена, или оба 5’ и 3' сайта-мишени или трансгена.

В некоторых вариантах осуществления, матричным полинуклеотидом является

лентивирусный вектор, например IDLV (лентивирус, не способный к интеграции). В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит от примерно 500 до 1000 пар оснований гомологии по обе стороны от трансгена и/или сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит примерно 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 пар оснований гомологии 5' сайта-мишени или трансгена, 3' сайта-мишени или трансгена, или оба 5' и 3' сайта-мишени или трансгена. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит, по меньшей мере, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 пар оснований с гомологией 5' сайта-мишени или трансгена, 3' сайта-мишени или трансгена, или оба 5' и 3' сайта-мишени или трансгена. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит не более 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 пар оснований с гомологией 5' сайта-мишени или трансгена, 3' сайта-мишени или трансгена, или оба 5' и 3' сайта-мишени или трансгена. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит одну или несколько мутаций, например, молчащие мутации, которые не позволяют Cas9 распознавать и расщеплять матричный полинуклеотид. Матричный полинуклеотид может содержать, например, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 или 30 молчащих мутаций относительно соответствующей последовательности в геноме изменяемой клетки. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит не более 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 или 50 молчащих мутаций относительно соответствующей последовательности в геноме изменяемой клетки. В некоторых вариантах осуществления, кДНК содержит одну или несколько мутаций, например молчащие мутации, которые не позволяют Cas9 распознавать и расщеплять матричный полинуклеотид. Матричный полинуклеотид может содержать, например, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 или 30 молчащих мутаций относительно соответствующей последовательности в геноме изменяемой клетки. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит не более 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 или 50 молчащих мутаций относительно соответствующей последовательности в геноме изменяемой клетки.

Двухцепочечные матричные полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, могут включать одно или несколько неприродных оснований и/или скелетов. В частности, вставка матричного полинуклеотида с метилированными цитозинами может проводиться с использованием описанных в настоящем документе способов для достижения состояния транскрипционного покоя в вызывающей интерес области.

II. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ВЕКТОРЫ И ДОСТАВКА

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, такой как полинуклеотид, такой как матричный полинуклеотид, кодирующий одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его часть, вводят в клетки в нуклеотидной форме, такой как полинуклеотид или вектор. В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид содержит трансген, который кодирует рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов или их компонентов для генетического разрушения вводят в клетки в форме нуклеиновой кислоты, такой как

полинуклеотиды и/или векторы. В некоторых вариантах осуществления, компоненты для конструирования могут быть доставлены в различных формах с использованием различных способов доставки, включая любые подходящие способы, используемые для доставки агентов, как описано в разделе I.A.3 и **таблицах 4** и **5** настоящего документа. Также представлены один или несколько полинуклеотидов (таких как молекулы нуклеиновой кислоты), кодирующих один или несколько компонентов одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение (например, любого, описанного в Разделе I.A в настоящем документе). Также представлены один или несколько матричных полинуклеотидов, содержащих трансген (например, любой, описанный в разделе I.B.2 в настоящем документе), и векторы для генетически сконструированных клеток для таргетной интеграции трансгена, такого как матричный полинуклеотид или полинуклеотид, кодирующий один или несколько компонентов одного или нескольких агентов, способных вызвать генетическое разрушение.

В некоторых вариантах осуществления, представлены полинуклеотиды, такие как матричные полинуклеотиды, для таргетирования трансгена в конкретную локацию-мишень генома, например в локус *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, представлены любые матричные полинуклеотиды, описанные в разделе I.B настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид содержит трансген, который содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют рекомбинантный рецептор или его часть, или другие полипептиды и/или факторы, а также плечи гомологии для таргетной интеграции. В некоторых вариантах осуществления, матричный полинуклеотид может содержаться в векторе.

В некоторых вариантах осуществления, агенты, способные вызывать генетические нарушения, могут быть кодированы одним или несколькими полинуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, компонент агентов, такой как молекула Cas9 и/или молекула нРНК, может быть кодирован одним или несколькими полинуклеотидами и введен в клетки. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий один или несколько компонентов агентов, может быть включен в вектор.

В некоторых вариантах осуществления, вектор может содержать последовательность, кодирующую молекулу Cas9, и/или молекулу нРНК, и/или матричные полинуклеотиды. Вектор также может содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид (например, для ядерной локализации, ядрышковой локализации, митохондриальной локализации), слитый, например, с последовательностью молекулы Cas9. Например, вектор может содержать последовательность ядерной локализации (например, из SV40), слитую с последовательностью, кодирующей молекулу Cas9. В некоторых вариантах осуществления, представлены векторы для генной инженерии клеток для таргетной интеграции трансгенных последовательностей, содержащихся в полинуклеотидах, таких как матричные полинуклеотиды, описанные в Разделе I.B.2.

В конкретных вариантах осуществления, один или несколько регуляторных/контрольных элементов, таких как промотор, энхансер, интрон, сигнал

полиаденилирования, консенсусная последовательность Козака, внутренние участки посадки рибосомы (IRES), последовательность 2A и акцептор или донор сплайсинга, могут быть включены в векторы. В некоторых вариантах осуществления, промотор выбран из промотора pol I, pol II или pol III РНК. В некоторых вариантах осуществления, промотор распознается РНК-полимеразой II (например, CMV, ранней областью SV40 или главным поздним промотором аденовируса). В другом варианте, промотор распознается РНК-полимеразой III (например, промотором U6 или H1).

В некоторых вариантах осуществления, промотором является регулируемый промотор (такой как индуцибельный промотор). В некоторых вариантах осуществления, промотором является индуцибельный промотор или репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор содержит последовательность оператора Lac, последовательность оператора тетрациклина, последовательность оператора галактозы или последовательность оператора доксициклина, или является их аналогом, или способен связываться или распознаваться репрессором Lac или репрессором тетрациклина, или его аналогом.

В некоторых вариантах осуществления, промотор является или содержит конститутивный промотор. Примеры конститутивных промоторов включают, например, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина C человека (UBC), промотор фактора элонгации 1α (EF1α), промотор фосфоглицераткиназы 1 мыши (PGK). и промотор β-актина курицы, связанный с ранним энхансером CMV (CAGG). В некоторых вариантах осуществления, конститутивным промотором является синтетический или модифицированный промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор является или содержит промотор MND, синтетический промотор, который содержит область U3 модифицированного LTR MoMuLV с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы (последовательность указана в SEQ ID NO: 186; см. Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755). В некоторых вариантах осуществления, промотором является тканеспецифический промотор. В другом варианте осуществления, промотором является вирусный промотор. В другом варианте осуществления, промотором является не вирусный промотор. В некоторых вариантах осуществления, типовые промоторы могут включать, но не ограничиваются ими, промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α) (например, указанный в SEQ ID NO: 77 или 118) или его модифицированную форму (промотор EF1α с энхансером HTLV1; например, указанный в SEQ ID NO: 119) или промотор MND (например, указанный в SEQ ID NO: 186). В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид и/или вектор не содержит регуляторный элемент, например промотор.

В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид, например полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть, вводят в клетки в нуклеотидной форме, например, в виде не вирусного вектора или внутри него. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидом является полинуклеотид ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидом является двухцепочечный или

одноцепочечный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, невирусный вектор является или содержит полинуклеотид, например, полинуклеотид ДНК или РНК, который подходит для трансдукции и/или трансфекции любым подходящим и/или известным не вирусным способом доставки гена, например, но не ограничиваясь ими, микроинъекцией, электропорацией, временным сжатием или сдавливанием клеток (например, описанным в Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27), опосредованной жиром трансфекцией, опосредованной пептидом доставкой или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления, не вирусный полинуклеотид доставляют в клетку не вирусным способом, описанным в настоящем документе, таким как не вирусный способ, указанный в **таблице 5.**

В некоторых вариантах осуществления, вектором или средством доставки является вирусный вектор (например, для создания рекомбинантных вирусов). В некоторых вариантах осуществления, вирусом является ДНК-вирус (например, вирус дцДНК или оцДНК). В некоторых вариантах осуществления, вирусом является РНК-вирус (например, оцРНК-вирус). Типовые вирусные векторы/вирусы включают, например, ретровирусы, лентивирусы, аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирусы коровьей оспы, вирусы оспы и вирусы простого герпеса или любые из вирусов, описанных в другом месте в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, вирус инфицирует делящиеся клетки. В другом варианте осуществления, вирус инфицирует не делящиеся клетки. В другом варианте осуществления, вирус инфицирует как делящиеся, так и не делящиеся клетки. В другом варианте осуществления, вирус может интегрироваться в геном хозяина. В другом варианте осуществления, вирус сконструирован так, чтобы обладать пониженным иммунитетом, например, у человека. В другом варианте осуществления, вирус является способным к репликации. В другом варианте осуществления, вирус является не способным к репликации, например, в нем одна или несколько кодирующих областей для генов, необходимых для дополнительных раундов репликации и/или упаковки вириона, заменены другими генами или удалены. В другом варианте осуществления, вирус вызывает временную экспрессию молекулы Cas9 и/или молекулы нРНК в целях временной индукции генетического разрушения. В другом варианте осуществления, вирус вызывает длительную, например, по меньшей мере, 1 неделю, 2 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год, 2 года, или постоянную экспрессию молекулы Cas9. и/или молекулы нРНК. Упаковочная способность вирусов может варьироваться, например, от, по меньшей мере, примерно 4 тн до, по меньшей мере, примерно 30 тн, например, по меньшей мере, примерно 5 тн, 10 тн, 15 тн, 20 тн, 25 тн, 30 тн, 35 тн, 40 тн, 45 тн или 50 тн.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий агент и/или матричный полинуклеотид, доставляют рекомбинантным ретровирусом. В другом варианте осуществления, ретровирус (например, вирус мышиного лейкоза Молони) содержит обратную транскриптазу, например, которая обеспечивает интеграцию в геном хозяина. В некоторых вариантах осуществления, ретровирус является способным к репликации. В

другом варианте осуществления, ретровирус является не способным к репликации, например, в нем одна или несколько кодирующих областей для генов, необходимых для дополнительных раундов репликации и упаковки вириона, заменены другими генами или удалены.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий агент и/или матричный полинуклеотид, доставляют рекомбинантным лентивирусом. Например, лентивирус является неспособным к репликации, например, не содержит один или несколько генов, необходимых для репликации вируса.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий агент и/или матричный полинуклеотид, доставляют рекомбинантным аденовирусом. В другом варианте осуществления, аденовирус сконструирован таким образом, чтобы у человека был снижен иммунитет.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий агент и/или матричный полинуклеотид, доставляют рекомбинантным AAV. В некоторых вариантах осуществления, AAV может включать свой геном в геном клетки-хозяина, например, клетки-мишени, как описано в настоящем документе. В другом варианте осуществления, AAV является самокомплементарным аденоассоциированным вирусом (scAAV), например, scAAV, который упаковывает обе цепи, которые отжигаются вместе с образованием двухцепочечной ДНК. Серотипы AAV, которые могут использоваться в описанных способах, включают AAV1, AAV2, модифицированный AAV2 (например, модификации на Y444F, Y500F, Y730F и/или S662V), AAV3, модифицированный AAV3 (например, модификации на Y705F, Y731F и/или T492V), AAV4, AAV5, AAV6, модифицированный AAV6 (например, модификации на S663V и/или T492V), AAV7, AAV8, AAV 8.2, AAV9, AAV.rh10, модифицированный AAV.rh10, AAV.rh32/33, модифицированный AAV.rh32/33, AAV.rh43, модифицированный AAV.rh43, AAV.rh64R1, модифицированный AAV.rh64R1 и псевдотипированный AAV, такой как AAV2/8, AAV2/5 и AAV2/6, также могут быть использованы в описанных способах.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий агент и/или матричный полинуклеотид, доставляется гибридным вирусом, например гибридом одного или нескольких вирусов, описанных в настоящем документе.

Упаковочную клетку используют для образования вирусной частицы, способной инфицировать клетку-мишень. Такая клетка содержит клетку 293, которая может упаковывать аденовирус, и клетку ψ2 или клетку PA317, которая может упаковывать ретровирус. Вирусный вектор, используемый в генной терапии, обычно создается линией клеток-продуцентов, которая упаковывает вектор нуклеиновой кислоты в вирусную частицу. Вектор обычно содержит минимальные вирусные последовательности, необходимые для упаковки и последующей интеграции в клетку-хозяина или клетку-мишень (если применимо), при этом другие вирусные последовательности заменяются кассетой экспрессии, кодирующей экспрессируемый белок, например Cas9. Например, вектор AAV, используемый в генной терапии, обычно содержит только

последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) из генома AAV, которые необходимы для упаковки и экспрессии гена в клетке-хозяине или клетке-мишени. Недостающие вирусные функции передаются *в пути* упаковочной клеточной линией. Отныне вирусная ДНК упакована в клеточную линию, которая содержит плазмиду-помощник, кодирующую другие гены AAV, а именно rep и cap, но без последовательностей ITR. Клеточная линия также инфицирована аденовирусом в качестве помощника. Вирус-помощник способствует репликации вектора AAV и экспрессии генов AAV из плазмиды-помощника. Плазмида-помощник не упакована в значительных количествах из-за отсутствия последовательностей ITR. Загрязнение аденовирусом можно уменьшить, например, с помощью тепловой обработки, к которой аденовирус более чувствителен, чем AAV.

В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор обладает способностью распознавать тип клеток. Например, вирусный вектор может быть псевдотипирован другим/альтернативным гликопротеином вирусной оболочки; сконструирован с рецептором, специфичным для определенного типа клетки (например, генетической модификацией гликопротеинов вирусной оболочки для включения таргетирующих лигандов, таких как пептидный лиганд, одноцепочечное антитело, фактор роста); и/или сконструирован так, чтобы иметь молекулярный мост с двойной специфичностью, где один конец распознает вирусный гликопротеин, а другой конец распознает часть поверхности клетки-мишени (например, лиганд-рецептор, моноклональное антитело, авидин-биотин и химическая конъюгация).

В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор обеспечивает экспрессию, специфичную для клеточного типа. Например, тканеспецифический промотор может быть сконструирован для ограничения экспрессии агента, способного вводить генетические разрушения (например, Cas9 и нРНК) только в конкретную клетку-мишень. Специфичность вектора также может быть опосредована микроРНК-зависимым контролем экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор имеет повышенную эффективность слияния вирусного вектора и мембраны клетки-мишени. Например, слитый белок, такой как способный к слиянию гемагглютинин (HA), может быть включен для увеличения захвата вируса клетками. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор обладает способностью к ядерной локализации. Например, вирус, который требует разрушения ядерной мембраны (во время деления клетки) и, следовательно, не будет инфицировать не делящуюся клетку, может быть изменен для включения пептида ядерной локализации в матричный белок вируса, тем самым позволяя трансдукцию не пролиферирующих клеток.

III. СКОНСТРУИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, И КЛЕТОЧНЫЕ КОМПОЗИЦИИ.

В настоящем документе представлены генетически сконструированные клетки, содержащие модифицированный локус *TGFBR2,* который содержит последовательности нуклеиновых кислот, такие как трансген, кодирующий одну или несколько цепей

рекомбинантного рецептора, такого как химерный антигенный рецептор (CAR), или его часть. В некоторых аспектах, модифицированный локус *TGFBR2* в генетически сконструированной клетке содержит последовательности экзогенных нуклеиновых кислот (например, трансгенные последовательности), кодирующие одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его части, интегрированные в эндогенный локус *TGFBR2*. В некоторых аспектах, полученные сконструированные клетки получают с использованием способов, описанных в настоящем документе, например, включающих репарацию, направляемую гомологией (HDR) с использованием агентов для индукции генетического разрушения (например, как описано в Разделе I.A) и матричных полинуклеотидов, содержащих трансгенные последовательности для репарации (например, описанные в разделе I.B). В некоторых аспектах, часть, например непрерывный сегмент представленных полинуклеотидов, таких как любые матричные полинуклеотиды, описанные в Разделе I.B, может таргетировать интеграцию в эндогенный локус *TGFBR2,* чтобы создать клетку, содержащую модифицированный локус *TGFBR2,* содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, такую как трансген, кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, часть матричного полинуклеотида, которая интегрирована с помощью HDR в эндогенный локус *TGFBR2,* содержит часть трансгенной последовательности, такой как любая из описанных в настоящем документе, например, в Разделе I.B, матричного полинуклеотида.

В некоторых аспектах, клетки сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора, такого как CAR, или рекомбинантного Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор кодируется последовательностями нуклеиновой кислоты, присутствующими в модифицированном локусе *TGFBR2* в сконструированных клетках. В некоторых аспектах, клетки получают путем интеграции трансгенных последовательностей, кодирующих весь рекомбинантный рецептор или его часть, посредством HDR. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор содержит связывающий домен, который связывается или распознает лиганд или антиген, например антиген, связанный с заболеванием или нарушением.

В некоторых аспектах, сконструированные клетки представляют собой иммунные клетки, такие как Т-клетки. В некоторых аспектах, иммунные клетки сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора, например химерного антигенного рецептора или модифицированных рекомбинантных рецепторов, таких как любые описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, способы, композиции, готовые изделия и/или наборы, представленные в настоящем документе, полезны для создания, производства или продуцирования генетически сконструированных клеток, например, генетически сконструированных иммунных клеток и/или Т-клеток, которые имеют или содержат модифицированный локус *TGFBR2*. В конкретных вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, приводят к получению генетически сконструированных клеток, которые имеют или содержат модифицированный локус

TGFBR2. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус является или содержит трансгенную последовательность, например трансгенную последовательность, описанную в Разделе I.B, интегрированную в открытую рамку считывания эндогенного гена *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, трансген вставлен внутри рамки в открытую рамку считывания эндогенного гена *TGFBR2*, что приводит к изменению локуса *TGFBR2*, который кодирует частичный полипептид TGFBRII и рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, частичный полипептид TGFBRII, кодированный модифицированным локусом, является доминантно-негативной формой полипептида TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых аспектах, рекомбинантным рецептором является рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR).

В некоторых случаях клетка сконструирована для экспрессии одной или нескольких дополнительных молекул, например, дополнительных факторов и/или вспомогательной молекулы, такой как любые дополнительные молекулы, включая терапевтические молекулы, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные молекулы могут включать маркер, дополнительную полипептидную цепь рекомбинантного рецептора, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, иммуномодулирующую молекулу, лиганд, цитокин или хемокин. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные факторы представляют собой растворимую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные факторы представляют собой мембраносвязанную молекулу. В некоторых аспектах, дополнительные факторы могут использоваться для преодоления или противодействия эффекту иммунодепрессивной среды, такой как микроокружение опухоли (TME). В некоторых аспектах, типовая дополнительная молекула содержит цитокин, рецептор цитокина, химерный костимулирующий рецептор, костимулирующий лиганд и другие модуляторы функции или активности Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные молекулы, экспрессируемые сконструированной клеткой, включают IL-7, IL-12, IL-15, лиганд CD40 (CD40L) и лиганд 4-1BB (4-1BBL). В некоторых аспектах, дополнительной молекулой является дополнительный рецептор, например мембранно-связанный рецептор, который связывает другую молекулу. Например, в некоторых вариантах осуществления, дополнительной молекулой является рецептор цитокина или рецептор хемокина, например рецептор IL-4 или рецептор CCL2. В некоторых случаях, сконструированные клетки называют «бронированными CAR» или Т-клетками, перенаправленными для универсального уничтожения цитокинов (TRUCK).

Также представлены композиции, содержащие множество сконструированных клеток. В некоторых аспектах, композиции, содержащие сконструированные клетки, демонстрируют улучшенную, однородную, гомогенную и/или стабильную экспрессию и/или связывание антигена рекомбинантным рецептором по сравнению с клетками или клеточными композициями, созданными с использованием других способов конструирования, таких как способы, в которых рекомбинантный рецептор случайным

образом вводят в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки или композиция, содержащая сконструированные клетки, может использоваться в терапии, например, адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, представленные клетки или клеточные композиции можно использовать в любом из способов лечения, описанных в настоящем документе, или для терапевтических применений, описанных в настоящем документе.

А. Модифицированный локус *TGFBR2*

В некоторых аспектах, представлены генетически сконструированные клетки, содержащие модифицированный локус *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты содержит трансгенную последовательность, кодирующую одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора или его часть, где трансгенная последовательность интегрирована в эндогенный локус *TGFBR2*, необязательно, посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). В некоторых аспектах, модифицированный локус *TGFBR2* может кодировать любой один или несколько рекомбинантных рецепторов, описанных в настоящем документе, например, в разделе III.B, или их часть, такую как их домен или область, или одну или несколько цепей мультицепочечного рекомбинантного рецептора, описанного в настоящем документе.

В некоторых аспектах, модифицированный локус *TGFBR2* создается в результате генетического разрушения и интеграции трансгенных последовательностей (например, экзогенных или гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот), которые содержат последовательность нуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть, например, с помощью способов HDR. В некоторых аспектах, последовательность нуклеиновой кислоты, присутствующая в модифицированном локусе *TGFBR2*, содержит последовательность трансгена, такую как экзогенная последовательность, интегрированная в область в эндогенном локусе *TGFBR2*, которая обычно содержит открытую рамку считывания, кодирующую полноразмерный TGFBRII. В некоторых аспектах, при таргетной интеграции трансгена с помощью HDR геном клетки содержит модифицированный локус *TGFBR2*, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, и лишенный всего или по меньшей мере части эндогенного генома, кодирующего полноразмерный TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, после таргетной интеграции модифицированный локус *TGFBR2* содержит трансген, интегрированный в сайт в пределах открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*, так что рекомбинантный рецептор экспрессируется из сконструированной клетки, а в некоторых случаях также часть TGFBRII, например частичный или усеченный TGFBRII.

В некоторых вариантах осуществления, после интеграции трансгенных последовательностей, эндогенные последовательности локуса *TGFBR2* содержат генетическое разрушение, такое как делеция последовательностей нуклеиновых кислот,

кодирующих одну или несколько аминокислот, и/или мутация, вводящая стоп-кодон. В некоторых вариантах осуществления, при интеграции трансгенных последовательностей, эндогенные последовательности локуса *TGFBR2* не кодируют функциональный полипептид TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, после интеграции трансгенных последовательностей, эндогенные последовательности локуса *TGFBR2* кодируют частичный полипептид TGFBRII или усеченный полипептид TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, частичный или усеченный полипептид TGFBRII, кодированный эндогенными последовательностями локуса *TGFBR2,* является доминантно-негативной (DN) формой полипептида TGFBRII. В некоторых аспектах, доминантно-негативная форма *TGFBR2* содержит вариант *TGFBR2,* который при экспрессии в клетке может ингибировать, снижать или препятствовать передаче сигнала рецепторным комплексом TGFβ. В некоторых аспектах, типовая доминантно-негативная форма TGFBRII содержит усеченный TGFBRII, такой как TGFBRII, в котором отсутствует весь или часть цитоплазматического домена. В некоторых вариантах осуществления, доминантно-негативный TGFBRII включает такие, которые описаны, например, в Wieser et al., (1993) Mol. Cell Biol. 13(12): 7239-7247; Brand et al., (1995) JBC 270: 8274-8284; Bottinger et al., (1997) EMBO J 16(10): 2621-2633; Shah et al., (2002) Cancer Res 62:7135-7138; Bollard et al. (2002) Gene Therapy 99(9): 3179-87; и Zhang et al., (2013) *Gene Therapy* 20: 575-580; и Pang et al. (2013) Cancer Discov. 3(8): 936-951.

В некоторых вариантах осуществления, иРНК, транскрибированная из модифицированного локуса, содержит 3'UTR, который кодирован эндогенным локусом *TGFBR2* и/или идентичен 3'UTR иРНК, которая транскрибируется из эндогенного локуса *TGFBR2.* В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит элемент проскока рибосомы перед, например, непосредственно перед последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующих часть CAR. В некоторых вариантах осуществления, иРНК, кодирующая CAR, содержит 5'UTR, который кодирован эндогенным локусом *TGFBR2* и/или идентичен 5'UTR иРНК, которая транскрибируется из эндогенного локуса *TGFBR2.*

В некоторых аспектах, типовая доминантно-негативная форма TGFBRII содержит TGFBRII, содержащий делецию одного или нескольких аминокислотных остатков, необязательно одного или нескольких непрерывных аминокислотных остатков, во внутриклеточной области *TGFBR2,* например, включая аминокислотные остатки 188-567 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 1), указанной в SEQ ID NO: 59, или аминокислотных остатков 213-592 последовательности предшественника TGFBRII человека (изоформа 2), указанной в SEQ ID NO: 60. В некоторых аспектах, типовая доминантно-негативная форма TGFBRII содержит аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-191 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 59, или аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-216 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 60, или последовательности, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% или 99% идентичность к последовательности его или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует рекомбинантный рецептор и вставлен в рамку эндогенной открытой рамки считывания локуса *TGFBR2*. В конкретных вариантах осуществления, транскрипция модифицированного локуса дает иРНК, которая кодирует рекомбинантный рецептор, такой как CAR. В некоторых аспектах, последовательность нуклеиновой кислоты, присутствующая в открытой рамке считывания эндогенного локуса *TGFBR2*, может кодировать частичный или усеченный полипептид TGFBRII, например доминантно-негативную форму TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, трансген интегрирован в сайт-мишень непосредственно ниже и внутри рамки с одним или несколькими экзонами открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, трансгенные последовательности интегрированы или вставлены ниже экзона 1, 2, 3 или 4 и выше экзона 6, 7 или 8 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2* (например, как описано в **таблицах 1** и **2** настоящего документа). В некоторых вариантах осуществления, трансгенные последовательности интегрированы или вставлены ниже экзона 1, 2, 3 или 4 и выше экзона 6 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2* (например, как описано в **таблицах 1** и **2** в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность находится ниже экзона 1 и выше экзона 6 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность находится ниже экзона 3 и выше экзона 5 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, трансгенная последовательность расположена ниже экзона 4 и выше экзона 6 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, кодированный из модифицированного локуса *TGFBR2*, является CAR. В некоторых вариантах осуществления, CAR, кодированный модифицированным локусом *TGFBR2*, связывается и/или способен связываться с антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень связан с, специфичен и/или экспрессируется на клетке или ткани, которая связана с заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления, CAR способен стимулировать и/или индуцировать сигнал первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента рецептора Т-клетки (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), например, через внутриклеточный сигнальный домен или область CD3-дзета (CD3ζ) цепи или ее функциональный вариант или сигнальную часть.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, кодированный из модифицированного локуса *TGFBR2*, является рекомбинантным TCR. В некоторых аспектах, рекомбинантный TCR содержит две полипептидные цепи, например, цепь TCR-альфа (TCRα) и TCR-бета (TCRβ); или цепь TCR гамма (TCRγ) и TCR дельта (TCRδ). В некоторых аспектах, модифицированный локус *TGFBR2* кодирует одну или несколько цепей рекомбинантного TCR. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный

локус *TGFBR2* кодирует TCRα. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* кодирует TCRβ. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный локус *TGFBR2* кодирует TCRα и TCRβ, необязательно разделенные мультицистронным элементом, таким как элемент 2A.

B. Кодированные рекомбинантные рецепторы

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, кодированный сконструированными клетками, например, в модифицированном локусе *TGFBR2,* как описано в настоящем документе, или сконструированными клетками, созданными согласно способам, представленным в настоящем документе, содержит химерный антигенный рецептор (CAR) или его часть, или рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или его часть. Рекомбинантные рецепторы включают химерные рецепторы, антигенные рецепторы и рецепторы, содержащие один или несколько компонентов химерных рецепторов или антигенных рецепторов. Рекомбинантные рецепторы могут включать рецепторы, содержащие лиганд-связывающие домены или их связывающие фрагменты, а также внутриклеточные сигнальные домены или области. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные рецепторы, кодированные сконструированными клетками, содержат не-TCR функциональные антигенные рецепторы, химерные антигенные рецепторы (CAR), химерный рецептор аутоантитела (CAAR), рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (TCR) и области, цепи, домены или компоненты любого из вышеперечисленных. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор или его часть кодированы трансгенными последовательностями, присутствующими в полинуклеотидах, представленных в настоящем документе, таких как любые матричные полинуклеотиды, описанные в разделе I.B.2 выше. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть, содержащаяся в полинуклеотидах, интегрирована в эндогенный локус *TGFBR2* сконструированной клетки, для получения модифицированного локуса *TGFBR2,* который кодирует рекомбинантный рецептор или его часть, такой как любой рекомбинантный рецептор, описанный в настоящем документе, включая одну или несколько полипептидных цепей мультицепочечного рекомбинантного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, иллюстративные рекомбинантные рецепторы, экспрессируемые из сконструированной клетки, содержат мультицепочечные рецепторы, которые содержат два или несколько рецепторных полипептида, которые в некоторых случаях содержат разные компоненты, домены или области. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор содержит два или несколько полипептидов, которые вместе составляют функциональный рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, мультицепочечным рецептором является двухцепочечный рецептор, содержащий два полипептида, которые вместе составляют функциональный рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор является TCR, содержащим два разных рецепторных полипептида, например, цепь TCR альфа (TCRα) и TCR бета (TCRβ); или цепь TCR гамма (TCRγ) и TCR дельта (TCRδ). В некоторых

вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является мультицепочечный рецептор, в котором один или несколько полипептидов регулируют, модифицируют или контролируют экспрессию, активность или функцию другого рецепторного полипептида. В некоторых аспектах, мультицепочечные рецепторы обеспечивают пространственную или временную регуляцию или контроль специфичности, активности, связывания антигена (или лиганда), функционирования и/или экспрессии рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, кодированный в генетически сконструированных клетках, представленных в настоящем документе, содержит трансмембранный домен или мембраноассоциированный домен. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор также содержит внеклеточную область. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор также содержит внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, кодированный в генетически сконструированных клетках, представленных в настоящем документе, содержит различные области или домены, такие как одна или несколько внеклеточных областей (например, содержащих один или несколько внеклеточных связывающих доменов и/или спейсеров), трансмембранный домен и внутриклеточную область (например, содержащую внутриклеточную сигнальную область и/или один или несколько костимулирующих сигнальных доменов). В некоторых аспектах, кодированный рекомбинантный рецептор дополнительно содержит другие домены, такие как домены мультимеризации, линкеры и/или регуляторные элементы.

В некоторых вариантах осуществления, типовой кодированный рекомбинантный рецептор содержит, по порядку от N- до С-конца: трансмембранный домен (или мембраноассоциированный домен) и внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, типовой кодированный рекомбинантный рецептор содержит по порядку от N- до С-конца: внеклеточную область, трансмембранный домен и внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область является или содержит внеклеточный связывающий домен, и в некоторых аспектах, кодированный рекомбинантный рецептор содержит по порядку от N- до С-конца: внеклеточный связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточную область. В некоторых случаях спейсер, который разделяет или расположен между внеклеточной областью, например внеклеточным связывающим доменом, и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор содержит, по порядку от N- до С-конца: внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область, присутствующая в рекомбинантном рецепторе, содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) и/или один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, таких как один, два или три костимулирующих сигнальных домена.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор содержит домен мультимеризации, который в некоторых аспектах, способен влиять на образование его

мультицепочечного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, типовой кодированный рекомбинантный рецептор содержит по порядку от N- до С-конца: трансмембранный домен (или мембраноассоциированный домен), внутриклеточный домен мультимеризации, необязательно, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, типовой полипептид рекомбинантного рецептора содержит по порядку от N- до С-конца: внеклеточный домен мультимеризации, трансмембранный домен, необязательно один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и внутриклеточную сигнальную область.

В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным рецептором является химерный рецептор, такой как CAR. Типовая кодируемая последовательность CAR содержит: внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную область, содержащую первичный сигнальный домен или область и один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления, типовая кодируемая последовательность CAR содержит: внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и первичный сигнальный домен или область.

В некоторых вариантах осуществления, типовой кодированный полипептид, такой как полипептидная цепь мультицепочечного CAR, последовательность содержит: трансмембранный домен (или мембраноассоциированный домен), внутриклеточный домен мультимеризации, необязательно, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. и первичный сигнальный домен или область. В некоторых вариантах осуществления, типовой кодированный полипептид, такой как полипептидная цепь мультицепочечного CAR, последовательность содержит: внеклеточный домен мультимеризации, трансмембранный домен, необязательно, один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и первичный сигнальный домен или область.

В некоторых вариантах осуществления, типовая кодированная последовательность CAR содержит, по порядку, последовательность нуклеотидов, кодирующую внеклеточный связывающий домен, необязательно, scFv; спейсер, необязательно содержащий последовательность из шарнира иммуноглобулина человека, необязательно из IgG1, IgG2 или IgG4 или их модифицированной версии, необязательно, дополнительно включающий область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, необязательно из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, необязательно из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, необязательно цепь CD3ζ или ее часть. В некоторых вариантах осуществления, кодированная внутриклеточная область рекомбинантного рецептора содержит, от его N-конца до С-конца в следующем порядке: один или несколько костимулирующих сигнальных доменов и первичный сигнальный домен или область, например, содержащий цепь CD3дзета или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным

рецептором является рекомбинантный TCR, и типовой кодированный TCR содержит цепь TCRα или цепь TCRβ, или обе. В некоторых вариантах осуществления, типовой кодированный полипептид, такой как полипептид рекомбинантного рецептора, содержит всю или часть цепи TCRα. В некоторых вариантах осуществления, типовой кодированный полипептид, такой как полипептид рекомбинантного рецептора, содержит всю или часть цепи TCRβ. В некоторых аспектах, типовым кодированным рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, содержащий цепь TCRα и цепь TCRβ.

1. Химерные антигенные рецепторы (CAR)

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором, кодированным модифицированным локусом *TGFBR2,* является химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как CAR, со специфичностью для конкретного антигена (или маркера или лиганда), такого как антиген, экспрессированный на поверхности определенного типа клеток. В некоторых аспектах, по меньшей мере, часть любого из CAR, описанных в настоящем документе, включая мультицепочечный или индуцибельный CAR, кодирована в трансгенных последовательностях. В некоторых аспектах, трансгенными последовательностями, кодирующими CAR, описанные в настоящем документе, или их часть, могут быть любые, описанные в разделе I.B.2. В некоторых аспектах, после интеграции трансгенных последовательностей через HDR полученный модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR, такие как любой CAR, описанный в настоящем документе, включая мультицепочечный или индуцибельный CAR.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, например CAR, кодированный модифицированным локусом *TGFBR2,* содержит одну или несколько внеклеточных областей (например, содержащих один или несколько внеклеточных связывающих доменов и/или спейсеров), трансмембранный домен и/или внутриклеточную область (например, содержащую первичную сигнальную область или домен и/или один или несколько костимулирующих сигнальных доменов). В некоторых аспектах, кодированный рекомбинантный рецептор дополнительно содержит другие домены, такие как домены мультимеризации. В некоторых аспектах, модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательности, кодирующие линкеры и/или регуляторные элементы. В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор содержит по порядку от N- до С-конца: внеклеточный связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточную область, например, содержащую первичную сигнальную область или домен или их часть, и/или костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор содержит по порядку от N- до С-конца: внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную область, например, содержащую первичную сигнальную область или домен или их часть и/или костимулирующий сигнальный домен.

а. Связывающий домен

В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область кодируемого рекомбинантного рецептора содержит связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, связывающим доменом является внеклеточный связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен является или содержит полипептид, лиганд, рецептор, лиганд-связывающий домен, рецептор-связывающий домен, антиген, эпитоп, антитело, антигенсвязывающий домен, эпитоп-связывающий домен, антитело-связывающий домен, метка-связывающий домен или фрагмент любого из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, связывающим доменом является лиганд- или антигенсвязывающий домен.

В некоторых аспектах, внеклеточный связывающий домен, такой как лиганд- (например, антиген-) связывающая область или домены, и внутриклеточная область или домены связаны или соединены через один или несколько линкеров и/или трансмембранные домены. В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточной областью и внутриклеточной областью.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном, например антигеном, который связывает связывающий домен рекомбинантного рецептора, является полипептид. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является углевод или другая молекула. В некоторых вариантах осуществления, антиген селективно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания, нарушения или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями, например, в здоровых клетках или тканях. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием, нарушением или состоянием является инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления, антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, например CAR, содержит одну или несколько областей или доменов, выбранных из связывания внеклеточного лиганд- (например, антиген-) связывающей области или доменов, например, любого из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, и внутриклеточную область. В некоторых вариантах осуществления, лиганд- (например, антиген-) связывающая область или домен является или содержит scFv или однодоменное V_H антитело, и внутриклеточная область содержит внутриклеточную сигнальную область или домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

Типовые кодированные рекомбинантные рецепторы, включая CAR, включают рецепторы, описанные, например, в публикациях международной патентной заявки №№ WO2000/14257, WO2013/126726, WO2012/129514, WO2014/031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях заявки на патент США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191,

8,324,353 и 8,479,118 и заявке на европейский патент № EP2537416 и/или описанные в Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; и Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75. В некоторых аспектах, антигенные рецепторы содержат CAR, как описано в патенте США № 7,446,190, и рецепторы, описанные в публикации международной заявки на патент № WO 2014/055668. Примеры CAR содержат CAR, как описано в любой из вышеупомянутых ссылок, таких как WO2014/031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, US 7,446,190, US 8,389,282, Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; и Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177).

В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор, например антигенный рецептор, содержит внеклеточный связывающий домен, такой как антиген- или лиганд-связывающий домен, который связывается, например, специфически связывается, с антигеном, лигандом и/или маркером. Среди антигенных рецепторов есть функциональные не-TCR антигенные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR). В некоторых вариантах осуществления, антигенным рецептором является CAR, который содержит внеклеточный домен распознавания антигена, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, CAR сконструирован со специфичностью к конкретному антигену, маркеру или лиганду, например антигену, экспрессированному в конкретном типе клеток, на который направлена адоптивная терапия, *например,* онкомаркеру, и/или антигену, предназначенному для индукции ослабленного ответа, такому как антиген, экспрессированный на нормальных или здоровых клетках. Таким образом, CAR обычно содержит в своей внеклеточной части одну или несколько лиганд- (например, антиген-) связывающих молекул, таких как один или несколько антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или несколько вариабельных доменов антитела, и/или молекул антитела. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такие как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), полученный из вариабельной тяжелой (V_H) и вариабельной легкой (V_L) цепей моноклонального антитела (mAb) или однодоменного антитела (sdAb), такого как sdFv, нанотело, V_HH и V_{NAR}. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельные области антитела, соединенные гибким линкером.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный CAR содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент (*например,* scFv), который специфически распознает антиген или лиганд, такой как интактный антиген, экспрессированный на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления, антигеном или лигандом является белок, экспрессированный на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, антигеном или лигандом является полипептид. В некоторых вариантах осуществления, он является углеводом или другой молекулой. В некоторых вариантах осуществления, антиген или лиганд избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках

заболевания или состояния, *например* опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

В некоторых вариантах осуществления, антигены, таргетированные рекомбинантными рецепторами, включают антигены, экспрессированные в контексте заболевания, состояния или типа клеток, на которые направлена адоптивная клеточная терапия. Заболевания и состояния включают пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и нарушения, включая рак и опухоли, включая гематологические злокачественные новообразования, рак иммунной системы, такой как лимфомы, лейкозы и/или миеломы, такие как B, T и миелоидные лейкозы, лимфомы и множественные миеломы.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном или лигандом является опухолевый антиген или онкомаркер. В некоторых вариантах осуществления, антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, является или содержит интегрин αvβ6 (интегрин avb6), антиген созревания B-клетки (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково/тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, C-C мотив хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутацию рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфринB2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, рецептор Fc подобный 5 (FCRL5; также известный как гомолог рецептора Fc 5 или FCRH5), фетальный ацетилхолиновый рецептор (фетальный AchR), фолат-связывающий белок (FBP), рецептор фолиевой кислоты альфа, ганглиозид GD2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), сопряженный с G белком рецептор класса C группы 5 член D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторную тирозинкиназу erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита B, лейкоцитарный антиген человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2), рецептор IL-22 альфа (IL-22Rα), рецептор IL-13 альфа 2 (IL-13Rα2), рецептор со встроенным киназным доменом (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 L1- CAM, богатый лейцином повтор, содержащий 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), c-Met, цитомегаловирус мыши (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды естественных киллеров группы 2, член D (NKG2D), мелан A (MART-1), молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальный антиген, преимущественно экспрессированный антиген меланомы (PRAME), рецептор

прогестерона, простат-специфический антиген, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфический мембранный антиген (PSMA), орфанный рецептор подобный рецепторной тирозинкиназе 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобласта (TPBG, также известный как 5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), родственный тирозиназе белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), родственный тирозиназе белок 2 (TRP2, также известный как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоль Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессированный антиген, или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другие патогены. Антигены, таргетированные рецепторами, в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные со злокачественными новообразованиями B-клеток, такие как любой из ряда известных маркеров B-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген является или содержит CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30.

В некоторых вариантах осуществления, антиген является или содержит патоген-специфический или патоген-экспрессируемый антиген. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является вирусный антиген (такой как вирусный антиген из HIV, HCV, HBV и т.д.), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент (*например,* scFv или домен V_H) специфически распознает антиген, такой как CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент получен из антитела или антигенсвязывающего фрагмента или является вариантом антител или антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с CD19.

В некоторых вариантах осуществления, scFv получают из FMC63. FMC63 обычно относится к моноклональному антителу IgG1 мыши, индуцированному против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III.* 302*)*. В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 содержит CDR-H1 и CDR-H2, указанные в SEQ ID NO: 38 и 39, соответственно, и CDR-H3, указанные в SEQ ID NO: 40 или 54; и CDR-L1, указанный в SEQ ID NO: 35, и CDR-L2, указанный в SEQ ID NO: 36 или 55, и CDR-L3, указанный в SEQ ID NO: 37 или 56. В некоторых вариантах осуществления, FMC63 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 из SEQ ID NO: 35, последовательность CDR-L2 из SEQ ID NO: 36 и последовательность CDR-L3 из SEQ ID NO: 37 и/или вариабельную

тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 из SEQ ID NO: 38, последовательность CDR-H2 из SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR-H3 из SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 41, и вариабельную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, вариабельные тяжелые и вариабельные легкие цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления, настоящего изобретения ScFv содержит, по порядку, V_H, линкер и V_L. В некоторых вариантах осуществления, ScFv содержит, по порядку, V_L, линкер и V_H. В некоторых вариантах осуществления, scFv кодирован последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO: 57, или последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 43, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления, scFv получен из SJ25C1. SJ25C1 является моноклональным антителом IgG1 мыши, индуцированным против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III.* 302*)*. В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 последовательность, указанную в SEQ ID NOS: 47-49, соответственно, и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 последовательность, указанную в SEQ ID NOS: 44-46, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

[0652]В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 из SEQ ID NO: 44, последовательность CDR-L2 из SEQ ID NO: 45 и последовательность CDR-L3 из SEQ ID NO: 46 и/или вариабельную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 из SEQ ID NO: 47, последовательность CDR-H2 из SEQ ID NO: 48 и последовательность CDR-H3 из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная тяжелая и вариабельная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления, ScFv содержит, по порядку, V_H, линкер и V_L. В некоторых вариантах осуществления, ScFv содержит, по порядку, V_L, линкер и V_H. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 53, или последовательность,

которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 53.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является CD20. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD20. В некоторых вариантах осуществления, антителом или фрагментом антитела, который связывает CD20, является антитело, которое является или получено из ритуксимаба, например, scFv ритуксимаба.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является CD22. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD22. В некоторых вариантах осуществления, антителом или фрагментом антитела, который связывает CD22, является антитело, которое является или получено из m971, например scFv m971.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является BCMA. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к BCMA. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, который связывает BCMA, является или содержит V_H и V_L из антитела или фрагмента антитела, описанных в публикациях международных патентных заявок № WO 2016/090327 и WO 2016/090320.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, который связывает GPRC5D, является или содержит V_H и V_L из антитела или фрагмента антитела, описанных в публикациях международных патентных заявок № WO 2016/090329 и WO 2016/090312.

В некоторых аспектах, кодированный CAR содержит лиганд- (например, антиген-) связывающий домен, который связывает или распознает, например, специфически связывает универсальную метку или универсальный эпитоп. В некоторых аспектах, связывающий домен может связывать молекулу, метку, полипептид и/или эпитоп, которые могут быть связаны с другой связывающей молекулой (например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом), которая распознает антиген, связанный с заболеванием или нарушением. Типовая метка или эпитоп содержит краситель (например, изотиоцианат флуоресцеина) или биотин. В некоторых аспектах, связывающая молекула (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент) связана с меткой, которая распознает антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, например опухолевый антиген, со сконструированной клеткой, экспрессирующей CAR, специфичный для метки, для воздействия на цитотоксичность или другую эффекторную функцию сконструированной клетки. В некоторых аспектах, специфичность CAR к антигену, ассоциированному с заболеванием или нарушением, обеспечивается меченой связывающей молекулой (например, антителом), и разные меченые связывающие молекулы могут использоваться для таргетирования различных антигенов. Типовые CAR, специфичные для

универсальной метки или универсального эпитопа, включают описанные, например, в U.S. 9,233,125, WO 2016/030414, Urbanska et al., (2012) Cancer Res 72: 1844-1852, и Tamada et al., (2012) Clin Cancer Res 18:6436-6445.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный CAR содержит TCR-подобное антитело, такое как антитело или антигенсвязывающий фрагмент (*например,* scFv), который специфически распознает внутриклеточный антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, представленный на поверхности клетки в виде комплекса главный комплекса гистосовместимости (MHC)-пептид. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть, которая распознает комплекс MHC-пептид, может быть экспрессирована на клетках как часть рекомбинантного рецептора, такого как антигенный рецептор. Антигенные рецепторы включают функциональные не Т-клеточные рецепторы (TCR) антигенные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR). В некоторых вариантах осуществления, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который имеет TCR-подобную специфичность, направленную против комплексов пептид-MHC, также может называться TCR-подобным CAR. В некоторых вариантах осуществления, CAR является TCR-подобный CAR, а антигеном является процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, подобно TCR, распознается на поверхности клетки в контексте молекулы MHC. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для комплекса MHC-пептид TCR-подобного CAR, связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах, через линкеры и/или трансмембранные домены. В некоторых вариантах осуществления, такие молекулы обычно могут имитировать или приближать сигнал через рецептор природного антигена, такой как TCR, и, необязательно, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором.

В некоторых вариантах осуществления, главный комплекс гистосовместимости (MHC) содержит белок, обычно гликопротеин, который содержит сайт связывания полиморфного пептида или полость связывания, которая в некоторых случаях может образовывать комплекс с пептидными антигенами полипептидов, включая пептидные антигены, процессируемые клеточным механизмом. В некоторых случаях, молекулы MHC могут экспонироваться или экспрессироваться на поверхности клетки, в том числе в виде комплекса с пептидом, *т. е.* комплекса MHC-пептид, для презентации антигена в конформации, распознаваемой рецептором антигена на Т-клетках, таким как TCR или TCR-подобное антитело. Как правило, молекулы MHC класса I являются гетеродимерами, имеющими мембрану, охватывающую α-цепь, в некоторых случаях с тремя α-доменами, и нековалентно связанный β2-микроглобулин. Как правило, молекулы MHC класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β, оба из которых обычно охватывают мембрану. Молекула MHC может включать эффективную часть MHC, которая содержит антигенсвязывающий сайт или сайты для связывания пептида, и последовательности, необходимые для распознавания подходящим антигенным рецептором. В некоторых

вариантах осуществления, молекулы MHC класса I доставляют пептиды, происходящие из цитозоля, на поверхность клетки, где комплекс MHC-пептид распознается Т-клетками, такими как обычно CD8+ Т-клетки, но в некоторых случаях CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, молекулы MHC класса II доставляют пептиды, происходящие из везикулярной системы, на поверхность клетки, где они обычно распознаются CD4+ Т-клетками. Как правило, молекулы MHC кодируются группой связанных локусов, которые в совокупности называются H-2 у мышей и человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA) у людей. Следовательно, обычно человеческий MHC также может называться человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA).

Термин «комплекс MHC-пептид» или «комплекс пептид-MHC» или их варианты относится к комплексу или ассоциации пептидного антигена и молекулы MHC, например, как правило, посредством нековалентных взаимодействий пептида в полости связывания или щели молекулы MHC. В некоторых вариантах осуществления, комплекс MHC-пептид присутствует или экспонируется на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, комплекс MHC-пептид может специфически распознаваться антигенным рецептором, таким как TCR, TCR-подобный CAR или их антигенсвязывающие части.

В некоторых вариантах осуществления, пептид, такой как пептидный антиген или эпитоп, полипептида может связываться с молекулой MHC, например, для распознавания антигенным рецептором. Обычно пептид получают из или на основе фрагмента более длинной биологической молекулы, такой как полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления, пептид обычно имеет длину от примерно 8 до примерно 24 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептид имеет длину от примерно 9 до 22 аминокислот для распознавания в комплексе MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления, пептид имеет длину от точно или примерно 8 до 13 аминокислот для распознавания в комплексе MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления, после распознавания пептида в контексте молекулы MHC, такой как комплекс MHC-пептид, антигенный рецептор, такой как TCR или TCR-подобный CAR, продуцирует или запускает сигнал активации для Т-клетки, который индуцирует Т-клеточный ответ, такой как пролиферация Т-клеток, продукция цитокинов, цитотоксический Т-клеточный ответ или другой ответ.

В некоторых вариантах осуществления, TCR-подобное антитело или антигенсвязывающая часть известны или могут быть получены известными способами (см., например, публикации патентных заявок США №№ US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; и международную публикацию № WO 03/068201).

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть, которая специфически связывается с комплексом MHC-пептид, может быть получена путем иммунизации хозяина эффективным количеством иммуногена, содержащего специфический комплекс MHC-пептид. В некоторых случаях, пептидом комплекса MHC-пептид является эпитоп антигена, способного связываться с MHC, такого как опухолевый

антиген, например универсальный опухолевый антиген, миеломный антиген или другой антиген, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество иммуногена затем вводят хозяину для индукции иммунного ответа, где иммуноген сохраняет свою трехмерную форму в течение периода времени, достаточного для того, чтобы вызвать иммунный ответ против трехмерного представления пептида в полости связывания молекулы MHC. Затем сыворотку, собранную у хозяина, анализируют, чтобы определить, продуцируются ли желаемые антитела, которые распознают трехмерное представление пептида в полости связывания молекулы MHC. В некоторых вариантах осуществления, полученные антитела можно оценивать для подтверждения того, что антитело может дифференцировать комплекс MHC-пептид от молекулы MHC, представляющего интерес пептида и комплекса MHC и нерелевантного пептида. Затем желаемые антитела могут быть выделены.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть, которая специфически связывается с комплексом MHC-пептид, может быть получена с использованием способов дисплея библиотеки антител, таких как библиотеки фаговых антител. В некоторых вариантах осуществления, могут быть созданы библиотеки фагового дисплея мутантных Fab, scFv или других форм антител, например, в которых члены библиотеки мутированы на одном или нескольким остатках CDR или CDR. См., *например,* публикацию заявки на патент США № US20020150914, US20140294841; и Cohen CJ. *et al.* (2003) *J Mol. Recogn.* 16:324-332.

Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле и содержит поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая фрагменты антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, фрагменты $F(ab')_2$, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), вариабельные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), и однодоменные антитела (*например,* sdAb, sdFv, нанотело, V_HH или V_{NAR}) или фрагменты. Термин охватывает генетически сконструированные и/или модифицированные иным образом формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, *например,* биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетратела, тандем ди-scFv, тандем три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как охватывающий функциональные фрагменты антитела. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и их подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD. В некоторых аспектах, CAR является биспецифическим CAR, например, содержащим два антигенсвязывающих домена с разными специфичностями.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают антиген полноразмерного

антитела. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая и легкая цепи антитела могут быть полноразмерными или могут представлять собой антигенсвязывающую часть (Fab, F(ab')2, Fv или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv)). В других вариантах осуществления, константная область тяжелой цепи антитела выбрана, *например,* из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбрана из, *например,* IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, IgG1 (*например,* IgG1 человека). В некоторых вариантах осуществления, константная область легкой цепи антитела выбрана, *например,* из каппа или лямбда, особенно из каппа.

Связывающие домены кодированных рекомбинантных рецепторов включают фрагменты антител. «Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; диатела; линейные антитела; области вариабельной тяжелой цепи (V_H), молекулы одноцепочечных антител, такие как scFv, и однодоменные V_H одиночные антитела; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления, антителами являются одноцепочечные фрагменты антител, содержащие вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, такие как scFvs.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L, соответственно) нативного антитела обычно имеют сходные структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR. (См., *например,* Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Одного домена V_H или V_L может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарности V_H или V_L доменов, соответственно. См., *например,* Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

Однодоменные антитела (sdAb) являются фрагментами антител, содержащими весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи или весь или часть вариабельного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменным антителом является однодоменное антитело человека. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывает антиген, такой как онкомаркер или антиген клеточной поверхности таргетируемой клетки или заболевания, например опухолевой клетки или раковой клетки, такой как любой из антигенов-мишеней, описанных в настоящем документе или известных. Типовые однодоменные антитела включают sdFv, нанотело, V_HH или V_{NAR}.

Фрагменты антител можно получить различными методами, включая, но не ограничиваясь ими, протеолитический перевар интактного антитела, а также

продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления, антителами являются рекомбинантно полученные фрагменты, такие как фрагменты, содержащие структуры, которые не встречаются в природе, например, с двумя или несколькими областями или цепями антитела, соединенными синтетическими линкерами, *например,* пептидными линкерами, и/или которые не могут быть получены ферментным перевароом интактных антител, существующих в природе. В некоторых вариантах осуществления, фрагментами антител являются scFv.

«Гуманизированным» антителом является антитело, в котором все или практически все аминокислотные остатки CDR происходят из нечеловеческих CDR, и все или практически все аминокислотные остатки FR происходят из FR человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать, по меньшей мере, часть константной области антитела, полученной из антитела человека. «Гуманизированная форма» не человеческого антитела относится к варианту не человеческого антитела, которое подверглось гуманизации, как правило, для снижения иммуногенности для человека, при сохранении специфичности и аффинности родительского не человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления, некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (*например,* антитела, из которого получены остатки CDR), *например,* для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, кодированный химерный антигенный рецептор, включая TCR-подобные CAR, содержит внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент содержит scFv. В некоторых аспектах, антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно получить путем скрининга множества, например библиотеки, антигенсвязывающих фрагментов или молекул, например, путем скрининга библиотеки scFv на связывание со специфическим антигеном или лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный CAR является мультиспецифическим CAR, например, содержит множество лиганд- (например, антиген-) связывающих доменов, которые могут связываться и/или распознавать, например, специфически связываться, множество различных антигенов. В некоторых аспектах, кодированным CAR является биспецифический CAR, например, таргетирующий два антигена, например, содержащий два антигенсвязывающих домена с различной специфичностью. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит биспецифический связывающий домен, например биспецифическое антитело или его фрагмент, содержащее, по меньшей мере, один антигенсвязывающий домен, связывающийся с различными поверхностными антигенами на клетке-мишени, например, выбранными из любого из перечисленных антигенов, как описано в настоящем документе, *например,* CD19 и CD22 или CD19 и CD20. В некоторых вариантах осуществления, связывание биспецифического связывающего домена с каждым из его эпитопов или антигенов может приводить к стимулированию функции, активности и/или ответов Т-клетки, *например,* цитотоксической

активности и последующего лизиса клетки-мишени. Такие типовые биспецифические связывающие домены включают тандемные молекулы scFv, в некоторых случаях слитые друг с другом через, *например,* гибкий линкер; диатела и их производные, включая тандемные диатела (Holliger et al, Prot Eng 9, 299-305 (1996); Kipriyanov et al, J Mol Biol 293, 41-66 (1999)); перенацеливающие молекулы с двойной аффинностью (DART), которые могут включать формат диатела с С-концевым дисульфидным мостиком; молекулы биспецифического рекрутера Т-клеток (BiTE), которые содержат тандемные молекулы scFv, слитые гибким линкером (см., *например,* Nagorsen and Bauerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011); или триомабы, которые содержат цельные гибридные молекулы IgG мыши/крысы (Seimetz et al, Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010). Любой из таких связывающих доменов может содержаться в любом из CAR, описанных в настоящем документе.

b. Спейсер и трансмембранный домен

В некоторых аспектах, кодированный рекомбинантный рецептор, например химерный антигенный рецептор (CAR), содержит внеклеточную часть, содержащую один или несколько лиганд- (например, антиген-) связывающих доменов, таких как антитело или его фрагмент, и одну или несколько внутриклеточных сигнальных областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическим сигнальным доменом или областью). В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, например CAR, дополнительно содержит спейсер и/или трансмембранный домен или часть. В некоторых аспектах, спейсерный и/или трансмембранный домен может связывать внеклеточную часть, содержащую лиганд- (например, антиген-) связывающий домен, и внутриклеточные сигнальные области или домены.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор, такой как CAR, дополнительно содержит спейсер, который может быть или включать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина или ее варианта или модифицированной версии, например, шарнирной области, например шарнирной области IgG4 и/или области C_H1/C_L и/или Fc. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть принадлежит IgG человека, такому как IgG4, IgG2 или IgG1. В некоторых аспектах, часть константной области служит спейсерной областью между антигенраспознающим компонентом, например scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает повышенную чувствительность клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. В некоторых примерах, спейсер имеет длину точно или примерно 12 аминокислот или не более 12 аминокислот в длину. Типовые спейсеры включают спейсеры, содержащие, по меньшей мере, от примерно 10 до 229 аминокислот, от примерно 10 до 200 аминокислот, от примерно 10 до 175 аминокислот, от примерно 10 до 150 аминокислот, от примерно 10 до 125 аминокислот, от примерно 10 до 100 аминокислот, от примерно 10 до 75 аминокислот, от примерно 10 до 50 аминокислот, от

примерно 10 до 40 аминокислот, от примерно 10 до 30 аминокислот, от примерно 10 до 20 аминокислот или от примерно 10 до 15 аминокислот, включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления, спейсерная область содержит примерно 12 аминокислот или менее, примерно 119 аминокислот или менее, или примерно 229 аминокислот или менее. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет длину менее 250 аминокислот, длину менее 200 аминокислот, длину менее 150 аминокислот, длину менее 100 аминокислот, длину менее 75 аминокислот, длину менее 50 аминокислот, длину менее 25 аминокислот, длину менее 20 аминокислот, длину менее 15 аминокислот, длину менее 12 аминокислот или длину менее 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет длину от точно или примерно 10 до 250 аминокислот, длину от 10 до 150 аминокислот, длину от 10 до 100 аминокислот, длину от 10 до 50 аминокислот, длину от 10 до 25 аминокислот, длину от 10 до 15 аминокислот, длину от 15 до 250 аминокислот, длину от 15 до 150 аминокислот, длину от 15 до 100 аминокислот, длину от 15 до 50 аминокислот, длину от 15 до 25 аминокислот, длину 25 до 250 аминокислот, длину от 25 до 100 аминокислот, длину от 25 до 50 аминокислот, длину от 50 до 250 аминокислот, длину от 50 до 150 аминокислот, длину от 50 до 100 аминокислот, длину от 100 до 250 аминокислот, длину от 100 до 150 аминокислот или длину от 150 до 250 аминокислот. Типовые спейсеры включают шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3 или шарнир IgG4, связанный с доменом C_H3. Типовые спейсеры включают, но не ограничиваются ими, те, которые описаны в Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135 или публикации международной заявки на патент № WO2014031687.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер может быть получен полностью или частично из IgG4 и/или IgG2. В некоторых вариантах осуществления, спейсером может быть химерный полипептид, содержащий одну или несколько шарнирных последовательностей, последовательностей C_H2 и/или C_H3, полученных из IgG4, IgG2 и/или IgG2 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, спейсер может содержать мутации, такие как одна или несколько мутаций одной аминокислоты в одном или нескольких доменах. В некоторых примерах, модификацией аминокислоты является замена пролина (P) на серин (S) в шарнирной области IgG4. В некоторых вариантах осуществления, модификацией аминокислоты является замена глутамина (Q) на аспарагин (N) для уменьшения гетерогенности гликозилирования, например замена N на Q в положении, соответствующем положению 177 в области C_H2 последовательности константной области тяжелой цепи IgG4, указанной в SEQ ID NO: 184 (номер доступа Uniprot P01861; положение, соответствующее положению 297 по нумерации EC, и положение 79 последовательности спейсера шарнир-C_H2-C_H3, указанной в SEQ ID NO: 4) или замена N на Q в положении, соответствующем положению 176 в области C_H2 последовательности константной области тяжелой цепи IgG2, указанной в SEQ ID NO: 183 (номер доступа Uniprot P01859; положение, соответствующее положению 297 по нумерации EC).

В некоторых аспектах, спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнир IgG4, IgG2 или IgG1, такой как только шарнирный спейсер, указанный в SEQ ID NO: 1, и кодирован последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления, спейсером является шарнир Ig, например, и шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и/или C_H3. В некоторых вариантах осуществления, спейсером является шарнир Ig, например шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, как указано в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, спейсером является шарнир Ig, например шарнир IgG4, связанный только с доменом C_H3, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, спейсер является или содержит последовательность, богатую глицином-серином, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры. В некоторых вариантах осуществления, константной областью или частью является IgD. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5.

В некоторых аспектах, спейсером является полипептидный спейсер, такой как один или несколько, выбранных из: (a) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, (b) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, шарнира IgG4, или его модифицированной версии и/или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, или (c) имеет длину примерно 12 аминокислот и/или содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, IgG4, или его модифицированной версии; или (d) состоит или содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NOS: 1, 3-5 или 27-34, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ними, или (e) содержит или состоит из формулы X_1PPX_2P, где X_1 является глицином, цистеином или аргинином, и X_2 является цистеином или треонином.

Типовые спейсеры включают такие, которые содержат части константной области иммуноглобулина, например, содержат шарнирный домен Ig, такой как шарнирный домен IgG. В некоторых аспектах, спейсер содержит только шарнир IgG, шарнир IgG, связанный с одним или несколькими доменами C_H2 и C_H3, или шарнир IgG, связанный с доменом C_H3. В некоторых вариантах осуществления, шарнир IgG, C_H2 и/или C_H3 могут быть получены полностью или частично из IgG4 или IgG2. В некоторых вариантах осуществления, спейсером может быть химерный полипептид, содержащий одну или несколько шарнирных последовательностей, последовательностей C_H2 и/или C_H3, полученных из IgG4, IgG2 и/или

IgG2 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, шарнирная область содержит всю или часть шарнирной области IgG4 и/или шарнирной области IgG2, где шарнирная область IgG4 необязательно является шарнирной областью IgG4 человека, и шарнирная область IgG2 необязательно является шарнирной областью IgG2 человека; C_H2 область содержит всю или часть C_H2 области IgG4 и/или C_H2 области IgG2, где C_H2 областью IgG4 является необязательно C_H2 область IgG4 человека, и C_H2 областью IgG2 необязательно является C_H2 область IgG2 человека; и/или C_H3 область содержит всю или часть C_H3 области IgG4 и/или C_H3 области IgG2, где C_H3 областью IgG4 необязательно является C_H3 область IgG4 человека, и C_H3 областью IgG2 необязательно является C_H3 область IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления, шарнир, C_H2 и C_H3 содержат всю или часть каждой из шарнирной области, C_H2 и C_H3 из IgG4. В некоторых вариантах осуществления, шарнирная область является химерной и содержит шарнирную область из IgG4 человека и IgG2 человека; C_H2 область является химерной и содержит C_H2 область из IgG4 человека и IgG2 человека; и/или C_H3 область является химерной и содержит C_H3 область из IgG4 человека и IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4, содержащий, по меньшей мере, одну замену аминокислоты по сравнению с шарнирной областью IgG4 человека; химерную C_H2 область IgG2/4 человека; и C_H3 область IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер может быть получен полностью или частично из IgG4 и/или IgG2 и может содержать мутации, такие как одна или несколько мутаций одной аминокислоты в одном или нескольких доменах. В некоторых примерах, модификацией аминокислоты является замена пролина (P) на серин (S) в шарнирной области IgG4. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотной модификацией является замена глутамина (Q) на аспарагин (N) для уменьшения гетерогенности гликозилирования, такая как мутация N177Q в положении 177 в области C_H2 полноразмерной Fc последовательности IgG4, указанной в SEQ ID NO: 184, или N176Q в положении 176 в области C_H2 полноразмерной Fc последовательности IgG2, указанной в SEQ ID NO: 183. В некоторых вариантах осуществления, спейсер является или содержит химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, которая необязательно имеет длину примерно 228 аминокислот; или спейсер, указанный в SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления, лиганд- (например, антиген-) связывающий или распознающий домен CAR связан с внутриклеточной областью, например, содержащей один или несколько компонентов внутриклеточной передачи сигналов, таких как внутриклеточная сигнальная область или домен, и/или сигнальных компонентов, которые имитируют активацию через комплекс антигенного рецептора, такой как комплекс TCR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область, например, содержащая связывающий домен, такой как антигенсвязывающий компонент (например, антитело), связана с одной или несколькими трансмембранными и внутриклеточными областями или доменами. В некоторых вариантах

осуществления, трансмембранный домен слит с внеклеточной областью. В некоторых вариантах осуществления, используют трансмембранный домен, который в природе связан с одним из рецепторных доменов, например, CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают или модифицируют путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами того же или других поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления получают либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен в некоторых аспектах, получают из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают такие, которые получают из (т.е. содержат, по меньшей мере, трансмембранные области) альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB) или CD154. Альтернативно трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления, является синтетическим. В некоторых аспектах, синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах, триплет фенилаланина, триптофана и валина будет найден на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, связь осуществляется линкерами, спейсерами и/или трансмембранными доменами. В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28 или его варианта. Внеклеточная область и трансмембрана могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная область и трансмембрана связаны спейсером, таким как любой из описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранным доменом рецептора, например, CAR является трансмембранный домен CD28 человека или его вариант, например, трансмембранный домен из 27 аминокислот CD28 человека (номер доступа: P10747.1), или является трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8; в некоторых вариантах осуществления, часть рекомбинантного рецептора, содержащая трансмембранный домен, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, имеющую, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей.

c. Внутриклеточная область

В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, например CAR, кодированный в модифицированном локусе *TGFBR2,* содержит внутриклеточную область (также

называемую цитоплазматической областью), которая содержит сигнальную область или домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит внутриклеточную сигнальную область или домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область или домен является или содержит первичную сигнальную область, сигнальный домен, который способен стимулировать и/или индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) (например, внутриклеточный сигнальный домен или область CD3-дзета (CD3ζ) цепи или ее функциональный вариант или сигнальная часть) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, например CAR, содержит, по меньшей мере, один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты, такие как внутриклеточная сигнальная область или домен. Внутриклеточные сигнальные области включают такие, которые имитируют или приближают сигнал через рецептор природного антигена, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления, присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, например линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий глицины и серины, например дублет глицин-серин, и образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

В некоторых вариантах осуществления, после лигирования CAR, цитоплазматический (или внутриклеточный) домен или области, например, внутриклеточная сигнальная область CAR, стимулирует и/или активирует, по меньшей мере, одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например, Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых случаях, CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, такая как секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления, усеченная часть внутриклеточной сигнальной области или домена компонента антигенного рецептора или костимулирующей молекулы используют вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, содержат цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), и в некоторых аспектах, также последовательности корецепторов, которые в природном контексте действуют совместно с такими рецепторами, чтобы инициировать передачу сигнала после взаимодействия с антигенным рецептором, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, которая имеет такую же функциональную способность. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, содержат цитоплазматические последовательности области или домена, которые

вовлечены в обеспечение костимулирующего сигнала.

(i) *Костимулирующий сигнальный домен*

В некоторых вариантах осуществления, чтобы способствовать полной стимуляции и/или активации, в кодированный CAR включают один или несколько компонентов для генерации вторичного или костимулирующего сигнала. В других вариантах осуществления, кодированный CAR не содержит компонент для генерации костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах, дополнительный рецепторный полипептид или его часть экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный CAR содержит сигнальную область и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS и/или другие костимулирующие рецепторы. В некоторых аспектах, один и тот же CAR содержит как первичную цитоплазматическую сигнальную область, так и костимулирующие сигнальные компоненты.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько различных рекомбинантных рецепторов могут содержать одну или несколько различных внутриклеточных сигнальных областей или доменов. В некоторых вариантах осуществления, первичная цитоплазматическая сигнальная область включена в один кодированный CAR, тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим рецептором, например, другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, кодированные CAR содержат активирующие или стимулирующие CAR и костимулирующие CAR, оба экспрессируются на одной и той же клетке (*см.* WO2014/055668).

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит CD28 трансмембранный и сигнальный домен, связанный с CD3 (например, CD3ζ) внутриклеточной областью или доменом. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит химерные CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9) костимулирующие домены, связанные с CD3ζ внутриклеточной областью или доменом.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный CAR содержит один или несколько, например, два или несколько костимулирующих доменов и первичную цитоплазматическую сигнальную область в цитоплазматической части. Типовые CAR содержат внутриклеточные компоненты, такие как внутриклеточные сигнальные области или домены CD3-дзета, CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточную сигнальную область или домен костимулирующей молекулы Т-клетки, например, из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS, в некоторых случаях, между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью или доменом. В некоторых аспектах, костимулирующей молекулой Т-клетки является одна или несколько из CD28, CD137 (4-

1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующей молекулой является костимулирующая молекула человека.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область или домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, такой как его домен из 41 аминокислоты и/или такой домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен может содержать последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%., 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен или область CD137 (4-1BB) или его функциональный вариант или часть, такой как цитоплазматический домен из 42 аминокислот 4-1BB человека (номер доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такой как последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

В некоторых случаях кодированные CAR называют CAR первого, второго, третьего или четвертого поколения. В некоторых аспектах, CAR первого поколения является CAR, который обеспечивает только первичный сигнал стимуляции или активации, например, через сигнал, индуцированный CD3 цепью, при связывании антигена; в некоторых аспектах, CAR второго поколения является такой, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, например, такой, который содержит внутриклеточные сигнальные области или домены из одного или нескольких костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS и/или другие костимулирующие рецепторы; в некоторых аспектах, CAR третьего поколения содержит несколько костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов, например, выбранных из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS и/или других костимулирующих рецепторов; в некоторых аспектах, CAR четвертого поколения содержит три или несколько костимулирующих домена различных костимулирующих рецепторов, например, выбранных из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS и/или других костимулирующих рецепторов.

(ii) *Первичная сигнальная область, например, CD3ζ цепь*

В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор, например CAR, содержит внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как CD3 цепь TCR, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например, CD3 дзета

цепь. Таким образом, в некоторых аспектах, антигенсвязывающий домен или домен распознавания антигена связан с одним или несколькими модулями клеточной передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, модули клеточной передачи сигнала содержат CD3 трансмембранный домен, CD3 внутриклеточные сигнальные домены и/или другие CD трансмембранные домены. В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор, например CAR, дополнительно содержит одну или несколько дополнительных молекул, таких как Fc рецептор гамма (FcRγ), CD8 альфа, CD8 бета, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR содержит химерную молекулу между CD3 дзета (CD3ζ) и одним или несколькими из CD8 альфа, CD8 бета, CD4, CD25 или CD16.

В контексте природного TCR, полная стимуляция обычно требует не только передачи сигналов через TCR, но и костимулирующего сигнала. Стимуляция Т-клеток в некоторых аспектах, может быть опосредована двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные области или домены), и те, которые действуют антигеннезависимым способом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичные цитоплазматические сигнальные области или домены). В некоторых аспектах, CAR содержит один или оба таких компонента подачи сигналов.

В некоторых аспектах, кодированный CAR содержит внутриклеточную область, содержащую первичную цитоплазматическую сигнальную область, которая регулирует первичную стимуляцию и/или активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные области, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM, например, полученные из CD3 дзета (CD3ζ). В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит цитоплазматический сигнальный домен, его фрагмент или часть или последовательность, полученную из CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная (или цитоплазматическая) сигнальная область содержит CD3 дзета цепь человека или ее фрагмент или часть, включая внутриклеточный или цитоплазматический стимулирующий сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3ζ человека (номер доступа: P20963.2) или сигнальный домен CD3ζ, как описано в патенте США № 7,446,190 или патенте США № 8,911,993. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область кодированного рекомбинантного рецептора содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или их частичной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, типовая CD3ζ цепь или ее фрагмент, кодированный модифицированным локусом *TGFBR2,* содержит домены ITAM

CD3ζ цепи, например, аминокислотные остатки 61-89, 100-128 или 131-159 из последовательности предшественника CD3ζ цепи человека, указанной в SEQ ID NO: 188, или последовательность аминокислот, которая содержит один или несколько доменов ITAM из CD3ζ цепи и имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 188.

В некоторых вариантах осуществления, клетку, сконструированную для экспрессии одной или нескольких дополнительных молекул (например, полипептидов, таких как полипептиды дополнительных рекомбинантных рецепторов или их части), используют для регуляции, контроля или модулирования функции и/или активности кодированного CAR. Типовые мультицепочечные рекомбинантные рецепторы, такие как мультицепочечные CAR, описаны в настоящем документе, например, в разделе III.B.2.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточную сигнальную область, содержащую сигнальную часть CD28 или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления, рецептор дополнительно содержит спейсер, содержащий часть молекулы Ig, например молекулы Ig человека, такую как шарнир Ig, например шарнир IgG4, такой как только шарнирный спейсер. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор содержит CD3 дзета (CD3ζ) на С-конце рецептора.

2. Мультицепочечные CAR

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, кодированный последовательностями нуклеиновой кислоты модифицированного локуса *TGFBR2,* может быть мультицепочечным CAR. В некоторых вариантах осуществления, если мультицепочечный CAR, содержащий две или более полипептидных цепей, экспрессируется в клетке, по меньшей мере, одна из полипептидных цепей кодирована модифицированным локусом *TGFBR2.* В некоторых аспектах, полинуклеотид, используемый для введения последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих одну или несколько цепей мультицепочечного CAR, может включать любой, описанный в разделе I.B настоящего документа. В некоторых аспектах, полинуклеотид, например матричный полинуклеотид, содержит трансгенные последовательности, кодирующие, по меньшей мере, одну цепь мультицепочечного CAR или его часть, такую как, по меньшей мере, часть, по меньшей мере, одного полипептида мультицепочечного CAR. В некоторых аспектах, трансгенная последовательность также содержит последовательности,

кодирующие другой или дополнительный полипептид, например, другую или дополнительную цепь мультицепочечного CAR, или дополнительные молекулы, такие как те, которые описаны в разделе I.B.2.(iv) в настоящем документе. В некоторых аспектах, может быть введен дополнительный полинуклеотид, например дополнительный матричный полинуклеотид, который кодирует дополнительные компоненты мультицепочечного CAR. В некоторых аспектах, дополнительный полинуклеотид может быть любым полинуклеотидом, описанным в настоящем документе, например, в Разделе I.B.2, или его модифицированной формой, такой как форма, содержащая различные плечи гомологии для таргетирования нуклеиновой кислоты для интеграции в отдельный геномный локус.

В некоторых вариантах осуществления, предоставленные сконструированные клетки содержат клетки, которые экспрессируют мультицепочечные рецепторы, такие как мультицепочечные CAR. В некоторых вариантах осуществления, типовые мультицепочечные CAR могут содержать два или несколько генетически сконструированных рецепторов в клетке, которые вместе могут содержать функциональный рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, различные полипептидные цепи в комбинации могут выполнять функции или активности CAR и/или регулировать, контролировать или модулировать функцию и/или активность CAR. В некоторых аспектах, мультицепочечный CAR может содержать две или несколько полипептидных цепей, каждая из которых распознает одну и ту же цепь другого антигена и обычно каждая содержит разные области или домены, такие как другой компонент внутриклеточной передачи сигналов. В некоторых аспектах, модифицированный локус *TGFBR2* может включать последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие, по меньшей мере, одну цепь мультицепочечного рецептора, такого как мультицепочечный CAR.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является мультицепочечный CAR или двухцепочечный CAR, который содержит две или несколько полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления, мультицепочечным рецептором является индуцибельный CAR, условно активный CAR или индуцибельный CAR. В некоторых аспектах, два или несколько полипептидов рекомбинантного рецептора, такого как двухцепочечный CAR, обеспечивают пространственную или временную регуляцию или контроль специфичности, активности, связывания антигена (или лиганда), функции и/или экспрессии рекомбинантных рецепторов. В некоторых из таких вариантов осуществления, рекомбинантный рецептор, кодированный последовательностями нуклеиновой кислоты в модифицированном локусе *TGFBR2,* может включать одну или несколько цепей двухцепочечных или мультицепочечных рецепторов. В некоторых аспектах, в случаях, когда только один из двухцепочечных CAR кодирован модифицированным локусом *TGFBR2,* другая цепь может быть кодирована отдельной молекулой нуклеиновой кислоты, которая интегрирована в другом месте генома или является эписомальной.

В некоторых вариантах осуществления, мультицепочечные CAR могут включать комбинации активирующих и костимулирующих CAR. Например, в некоторых вариантах осуществления, мультицепочечный CAR может включать два полипептида, кодирующих CAR, направленные на два разных антигена, присутствующие по отдельности на клетках вне мишени, например нормальных клетках, но присутствующие вместе только на клетках заболевания или состояния, подлежащего лечению. В некоторых вариантах осуществления, мультицепочечные CAR могут включать активирующий и ингибирующий CAR, такие как те, в которых активирующий CAR связывается с одним антигеном, экспрессированным как на нормальных, так и на здоровых клетках и клетках заболевания или состояния, подлежащего лечению, и ингибирующий CAR связывается с другим антигеном, экспрессированным только на нормальных клетках или клетках, лечение которых нежелательно. В некоторых аспектах, мультицепочечные CAR могут включать один или несколько полипептидов, кодирующих CAR, которые могут регулироваться, модулироваться или контролироваться.

В некоторых вариантах осуществления, мультицепочечный CAR содержит одну или несколько полипептидных цепей, кодирующих один или несколько доменов или областей CAR. В некоторых аспектах, различные полипептидные цепи в комбинации могут содержать CAR. В некоторых вариантах осуществления, в CAR присутствует один или несколько дополнительных доменов или областей. В некоторых вариантах осуществления, различные домены или области, присутствующие в одной или нескольких полипептидных цепях мультицепочечного CAR, используют для регуляции, контроля или модуляции функции и/или активности CAR. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки экспрессируют две или более полипептидных цепей, которые содержат разные компоненты, домены или области. В некоторых аспектах, две или более полипептидных цепей обеспечивают пространственную или временную регуляцию или контроль специфичности, активности, связывания антигена (или лиганда), функции и/или экспрессии рекомбинантных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления мультицепочечного CAR, включающего более одного полипептида, например, 2 или несколько полипептидов, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая, по меньшей мере, один полипептид, направлена на интеграцию в эндогенный локус *TGFBR2*. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая дополнительную молекулу или полипептид, например дополнительную полипептидную цепь мультицепочечного CAR или дополнительную молекулу, может таргетировать тот же локус, например, посредством размещения на том же полинуклеотиде, который используется для таргетирования. В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая дополнительную молекулу или полипептид, направлена на другой локус или доставляется другими способами.

В некоторых аспектах, один или несколько доменов или областей, кодирующих полипептидную цепь, могут таргетировать один или несколько антигенов или молекул. типовые мультицепочечные CAR или другие мультитаргетные стратегии включают

стратегии, описанные, например, в публикации международной заявки на патент № WO 2014055668 или Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, Sci Transl Med. (2013) 5(215):215ra172; Sadelain, Curr Opin Immunol. (2016) 41: 68-76; Wang et al. (2017) Front. Immunol. 8:1934; Mirzaei et al. (2017) Front. Immunol. 8:1850; Marin-Acevedo et al. (2018) Journal of Hematology & Oncology 11:8; Fesnak et al. (2016) Nat Rev Cancer. 16(9): 566-581; and Abate-Daga and Davila, (2016) Molecular Therapy - Oncolytics 3, 1601.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки могут экспрессировать первую полипептидную цепь рекомбинантного рецептора, например, CAR, которая способна индуцировать активирующий или стимулирующий сигнал для клетки, как правило, при специфическом связывании с антигеном, распознаваемым первой полипептидной цепью, например, первым антигеном. В некоторых вариантах осуществления, клетка может дополнительно экспрессировать вторую полипептидную цепь рекомбинантного рецептора, например CAR, в некоторых случаях называемую химерным костимулирующим рецептором, который способен индуцировать костимулирующий сигнал для иммунной клетки, как правило, при специфическом связывании с вторым антигеном, распознаваемым второй полипептидной цепью. В некоторых вариантах осуществления, первый антиген и второй антиген одинаковы. В некоторых вариантах осуществления, первый антиген и второй антиген различны.

В некоторых вариантах осуществления, первая и/или вторая полипептидная цепь способна индуцировать активирующий или стимулирующий сигнал для клетки. В некоторых вариантах осуществления, рецептор содержит внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы. В некоторых вариантах осуществления, активация, индуцированная первой полипептидной цепью, включает передачу сигнала или изменение экспрессии белка в клетке, приводящее к инициированию иммунного ответа, такого как фосфорилирование ITAM и/или инициирование ITAM-опосредованного каскада передачи сигнала, образование иммунологического синапса и/или кластеризация молекул возле связанного рецептора (например, CD4 или CD8 и т. д.), активация одного или нескольких факторов транскрипции, таких как NF-κB и/или AP-1, и/или индукция экспрессии гена таких факторов, как цитокины, пролиферация и/или выживаемость. В некоторых вариантах осуществления, активирующий домен включен, по меньшей мере, в один из мультицепочечных CAR, таких как полипептидная цепь, кодируемая модифицированным локусом *TGFBR2,* тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим полипептидом, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки могут включать мультицепочечные CAR, включая активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, оба которых экспрессированы на одной и той же клетке (см. WO2014/055668). В некоторых аспектах, клетки экспрессируют один или несколько стимулирующих или активирующих CAR (таких, которые кодируются модифицированным локусом *TGFBR2,* как описано в настоящем документе, например, в разделе III.A) и/или костимулирующий CAR.

В некоторых вариантах осуществления, первая и/или вторая полипептидная цепь

содержит внутриклеточные сигнальные области или домены костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS и/или других костимулирующих рецепторов. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая полипептидные цепи могут содержать разные внутриклеточные сигнальные домены костимулирующего рецептора. В одном варианте осуществления, первая полипептидная цепь содержит CD28костимулирующий сигнальный домен, а вторая полипептидная цепь содержит 4-1BB костимулирующую сигнальную область, или наоборот.

В некоторых вариантах осуществления, первая и/или вторая полипептидная цепь содержит как внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM, так и ITAM-подобные мотивы, например, из CD3дзета цепи (CD3ζ) или ее фрагмента или части, например, CD3ζ внутриклеточного сигнального домена, и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, и вторая полипептидная цепь содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора. Костимулирующий сигнал в сочетании с активирующим или стимулирующим сигналом, индуцированным в той же клетке, является сигналом, который приводит к иммунному ответу, такому как устойчивый и продолжительный иммунный ответ, такой как повышенная экспрессия генов, секреция цитокинов и других факторов, а также опосредованные Т-клеткой эффекторные функции, такие как уничтожение клеток.

В некоторых вариантах осуществления, ни лигирование только первой полипептидной цепи, ни лигирование только второй полипептидной цепи не индуцируют устойчивый иммунный ответ. В некоторых аспектах, если лигирован только один рецептор, клетка становится толеризованной или нечувствительной к антигену, или ингибируется, и/или не индуцируется для пролиферации или секреции факторов или выполнения эффекторных функций. Однако в некоторых таких вариантах осуществления, когда несколько полипептидных цепей лигируются, например, при встрече с клеткой, экспрессирующей первый и второй антигены, достигается желаемый ответ, такой как полная иммунная активация или стимуляция, например, на что указывает секреция одного или нескольких цитокинов, пролиферация, жизнестойкость и/или выполнение иммунной эффекторной функции, такой как цитотоксическое уничтожение клетки-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько цепей мультицепочечного CAR могут включать ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013), такие как CAR, распознающие антиген, отличный от ассоциированного и/или специфического для заболевания или состояния, при котором активирующий сигнал поступает через таргетирующий заболевание CAR, уменьшается или ингибируется через связывание ингибирующего CAR с его лигандом, *например,* для уменьшения нецелевых эффектов. В некоторых вариантах осуществления, ингибирующий CAR может кодироваться тем же полинуклеотидом, что и стимулирующий или

активирующий CAR (например, содержащим CD3дзета (CD3ζ) цепь или ее фрагмент или часть), или другим полинуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления, две полипептидные цепи мультицепочечного CAR индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал в клетку, так что лигирование одной полипептидной цепи с ее антигеном активирует клетку или вызывает ответ, но лигирование второй полипептидной цепи, например рецептора, ингибирующего свой антиген, индуцирует сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR (iCAR). Такую стратегию можно использовать, например, для снижения вероятности нецелевых эффектов в контексте, в котором активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, а ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не на клетках болезни или состояния.

В некоторых аспектах, дополнительный рецепторный полипептид, экспрессируемый в клетке, дополнительно содержит ингибирующий CAR (например, iCAR) и содержит внутриклеточные компоненты, которые ослабляют или подавляют иммунный ответ, такой как ответ, стимулируемый ITAM и/или костимулятором в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются такие, которые обнаруживаются на молекулах иммунных контрольных точек, включая PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, рецепторы PGE2, рецепторы аденозина EP2/4, включая A2AR. В некоторых аспектах, сконструированная клетка содержит ингибирующий CAR, включающий сигнальный домен такой ингибирующей молекулы или производный от нее, так что он служит для ослабления ответа клетки, например, вызванного активирующим и/или костимулирующим CAR.

В некоторых вариантах осуществления, мультицепочечный CAR может использоваться, когда антиген, связанный с конкретным заболеванием или состоянием, экспрессируется на здоровой клетке и/или экспрессируется на самой сконструированной клетке либо временно (например, при стимуляции в ассоциации с генной инженерией) или постоянно. В таких случаях, через обязательное лигирование двух отдельных и индивидуально специфичных полипептидов, можно повысить специфичность, селективность и/или эффективность.

В некоторых вариантах осуществления, множество антигенов, например, первый и второй антигены, экспрессируются на клетке, ткани или заболевании или состоянии, являющемся мишенью, например, на раковой клетке. В некоторых аспектах, клеткой, тканью, заболеванием или состоянием является множественная миелома или клетка множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из множества антигенов обычно также экспрессируются на клетке, на которую нежелательно воздействовать с помощью клеточной терапии, такой как нормальная или здоровая клетка или ткань, и/или сами сконструированные клетки.. В таких вариантах осуществления, через

обязательное лигирование нескольких рецепторов для достижения ответа клетки, достигается специфичность и/или эффективность.

В некоторых вариантах осуществления, одна из первой и/или второй полипептидных цепей может регулировать экспрессию, связывание антигена и/или активность другой полипептидной цепи.

В некоторых аспектах, систему из двух полипептидных цепей можно использовать для регулирования экспрессии, по меньшей мере, одной из полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь содержит первый лиганд- (например, антиген-) связывающий домен, связанный с регуляторной молекулой, такой как фактор транскрипции, связанный через индуцибельный элемент расщепления. В некоторых аспектах, индуцибельный элемент расщепления получен из модифицированного рецептора Notch (например, synNotch), который способен расщеплять и высвобождать внутриклеточный домен при взаимодействии с связывающим доменом первого лиганда (например, антигена). В некоторых аспектах, вторая полипептидная цепь содержит второй лиганд- (например, антиген-) связывающий домен, связанный с внутриклеточным сигнальным компонентом, способным индуцировать активирующий или стимулирующий сигнал для клетки, такой как внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM. В некоторых аспектах, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую полипептидную цепь, функционально связана с элементами регуляции транскрипции, например промотором, который способен регулироваться конкретным фактором транскрипции, например фактором транскрипции, кодируемым первой полипептидной цепью. В некоторых аспектах, взаимодействие лиганда или антигена с первым лиганд- (например, антиген-) связывающим доменом приводит к протеолитическому высвобождению фактора транскрипции, который, в свою очередь, может индуцировать экспрессию второй полипептидной цепи (см. Roybal et al. (2016) Cell164:770-779; Morsut et al. (2016) Cell 164:780-791). В некоторых вариантах осуществления, первый антиген и второй антиген различны.

В некоторых случаях, рекомбинантный рецептор, например CAR, может регулироваться, контролироваться, индуцироваться или ингибироваться, что может быть желательно для оптимизации безопасности и эффективности терапии рекомбинантным рецептором. В некоторых вариантах осуществления, мультицепочечным CAR является индуцибельный CAR. В некоторых аспектах, в настоящем документе представлена сконструированная клетка, содержащая CAR, который может регулироваться. Рекомбинантный рецептор, который может регулироваться, также называемый в настоящем документе «индуцибельный рекомбинантный рецептор» или «индуцибельный CAR», относится к множественным полипептидам, таким как набор, по меньшей мере, из двух полипептидных цепей, которые при экспрессии в сконструированной клетке (например, сконструированной Т-клетке), обеспечивает способность сконструированной клетки генерировать внутриклеточный сигнал под контролем индуктора.

В некоторых вариантах осуществления, полипептиды индуцибельного CAR

содержат домены мультимеризации, которые способны к мультимеризации с другим доменом мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации способен к мультимеризации при связывании с индуктором. Например, домен мультимеризации может связываться с индуктором, таким как химический индуктор, что приводит к мультимеризации полипептидов индуцибельного CAR за счет мультимеризации домена мультимеризации, тем самым продуцируя индуцибельный CAR.

В некоторых вариантах осуществления, один полипептид индуцибельного CAR содержит лиганд- (например, антиген-) связывающий домен, а другой полипептид индуцибельного CAR содержит внутриклеточную сигнальную область, где мультимеризация двух полипептидов за счет мультимеризации домена мультимеризации продуцирует индуцибельный CAR, содержащий лиганд-связывающий домен и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, мультимеризация может индуцировать, модулировать, активировать, опосредовать и/или способствовать сигналам в сконструированной клетке, содержащей индуцибельный CAR. В некоторых вариантах осуществления, индуктор связывается с доменом мультимеризации, по меньшей мере, с одним полипептидом индуцибельного CAR, и вызывает конформационное изменение индуцибельного CAR, при этом конформационное изменение активирует передачу сигналов. В некоторых вариантах осуществления, связывание лиганда с такими химерными рецепторами вызывает конформационные изменения в полипептидной цепи, включая, в некоторых случаях, олигомеризацию полипептидной цепи, которая может сделать рецепторы способными к внутриклеточной передаче сигналов.

В некоторых вариантах осуществления, индуктор выполняет функцию связывания или мультимеризации (например, димеризации) набора, по меньшей мере, из двух полипептидных цепей индуцибельного CAR, экспрессируемого в сконструированной клетке, чтобы индуцибельный CAR продуцировал желаемый внутриклеточный сигнал, например, во время взаимодействия индуцибельного CAR с целевым антигеном. Связывание или мультимеризация по меньшей мере двух полипептидов индуцибельного CAR с помощью индуктора достигается при связывании индуктора с доменом мультимеризации. Например, в некоторых вариантах осуществления, первый полипептид и второй полипептид в сконструированной клетке могут каждый содержать домен мультимеризации, способный связывать индуктор. После связывания домена мультимеризации индуктором, первый полипептид и второй полипептид соединяются вместе для получения желаемого внутриклеточного сигнала. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации расположен во внутриклеточной части полипептида. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации расположен на внеклеточной части полипептида.

В некоторых вариантах осуществления, набор из, по меньшей мере, двух полипептидов индуцибельного CAR содержит два, три, четыре или пять или несколько полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, набором из, по меньшей мере, двух

полипептидов являются одинаковые полипептиды, например, два, три или несколько одинаковых полипептидов, содержащих внутриклеточную сигнальную область и домен мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления, набором, по меньшей мере, из двух полипептидов являются разные полипептиды, например, первый полипептид, содержащий лиганд- (например, антиген-) связывающий домен и домен мультимеризации, и второй полипептид, содержащий внутриклеточную сигнальную область и домен мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления, межклеточный сигнал генерируется в присутствии индуктора. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнал генерируется в отсутствие индуктора, например, индуктор препятствует мультимеризации, по меньшей мере, двух полипептидов индуцибельного CAR, тем самым предотвращая внутриклеточную передачу сигналов индуцибельным CAR.

В некоторых вариантах осуществления мультицепочечного CAR, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая, по меньшей мере, одну из полипептидных цепей, интегрирована в эндогенный локус *TGFBR2,* например, посредством HDR. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие другую из двух или нескольких отдельных полипептидных цепей, могут быть таргетированы в пределах одного и того же локуса (например, в пределах одной и той же трансгенной последовательности и могут быть размещены на 5’ или 3' последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей другую полипептидную цепь) или в другом локусе. В некоторых аспектах, введение последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих другую из двух или нескольких отдельных полипептидных цепей, может осуществляться различными способами доставки, например, способами временной доставки или в виде эписомальной молекулы нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько полипептидных цепей мультицепочечного CAR могут включать домен мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации может мультимеризоваться (например, димеризоваться) при связывании индуктора. Рассматриваемый в настоящем документе индуктор включает, но не ограничен ими, химический индуктор или белок (например, каспазу). В некоторых вариантах осуществления, индуктор выбран из эстрогена, глюкокортикоида, витамина D, стероида, тетрациклина, циклоспорина, рапамицина, кумермицина, гиббереллина, FK1012, FK506, FKCsA, римидуцида или HaXS, или их аналогов или производных. В некоторых вариантах осуществления, индуктором является AP20187 или аналог AP20187, такой как AP1510.

В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации может мультимеризоваться (например, димеризоваться) при связывании индуктора, такого как индуктор, представленный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации может быть получен из FKBP, рецептора циклофилина, рецептора стероидов, рецептора тетрациклина, рецептора эстрогена, рецептора глюкокортикоида, рецептора витамина D, кальциневрина A, CyP-Fas, домена FRB mTOR, GyrB, GAI, GID1, Snap-tag и/или HaloTag, или их частей или производных. В некоторых вариантах

осуществления, доменом мультимеризации является FK506 связывающий белок (FKBP) или его производное, или его фрагмент и/или мультимер, такой как FKBP12v36. В некоторых вариантах осуществления, FKBP содержит аминокислотную последовательность GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKMDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (SEQ ID NO:82). В некоторых вариантах осуществления, FKBP12v36 содержит аминокислотную последовательность GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (SEQ ID NO:83).

Типовые индукторы и соответствующие домены мультимеризации известны, например, как описано в публикации заявки на патент США № 2016/0046700, Clackson *et al.* (1998) Proc Natl Acad Sci U S A. 95(18):10437-42; Spencer *et al.* (1993) Science 262(5136):1019-24; Farrar *et al.* (1996) Nature 383 (6596):178-81; Miyamoto *et al.* (2012) Nature Chemical Biology 8(5): 465-70; Erhart *et al.* (2013) Chemistry and Biology 20(4): 549-57). В некоторых вариантах осуществления, индуктором является римидуцид (также известный как AP1903; наименование по каталогу CAS: 2-пиперидинкарбоновая кислота, сложный эфир 1-[(2S)-1-оксо-2-(3,4,5-триметоксифенил)бутил]-1,2-этандиилбис[имино(2-оксо-2,1-этандиил)окси-3,1-фенилен[(1R)-3-(3,4-диметоксифенил)пропилидена]], [2S-[1(R*),2R*[S*[S*[1(R*),2R]]]]]-(9Cl); регистрационный номер CAS: 195514-63-7; молекулярная формула: $C_{78}H_{98}N_4O_{20}$; молекулярная масса: 1411,65), и доменом мультимеризации является FK506 связывающий белок (FKBP).

В некоторых вариантах осуществления, клеточная мембрана сконструированной клетки непроницаема для индуктора. В некоторых вариантах осуществления, клеточная мембрана сконструированной клетки проницаема для индуктора.

В некоторых вариантах осуществления, индуцибельные CAR не являются частью мультимера или димера в отсутствие индуктора. После связывания индуктора, домены мультимеризации могут мультимеризоваться, *например* димеризоваться. В некоторых аспектах, мультимеризация домена мультимеризации приводит к мультимеризации полипептида индуцибельного CAR с другим полипептидом индуцибельного CAR, например, мультимерным комплексом, по меньшей мере, из двух полипептидов индуцибельных CAR. В некоторых вариантах осуществления, мультимеризация домена мультимеризации может индуцировать, модулировать, активировать, опосредовать и/или способствовать передаче сигнала посредством индуцирования физической близости сигнальных компонентов или образования мультимера или димера. В некоторых вариантах осуществления, после связывания индуктора, мультимеризация домена мультимеризации также индуцирует мультимеризацию сигнальных доменов, прямо или косвенно связанных с доменом мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления, мультимеризация индуцирует, модулирует, активирует, опосредует и/или способствует передаче сигналов

через домен или область передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен или область, связанная с доменом мультимеризации, является внутриклеточной сигнальной областью.

В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации является внутриклеточным или связан с клеточной мембраной на внутриклеточной или цитоплазматической стороне сконструированной клетки (например, сконструированной Т-клетки). В некоторых аспектах, внутриклеточный домен мультимеризации связан, прямо или косвенно, с мембраноассоциированным доменом (например, липид-связывающим доменом), таким как домен миристоилирования, домен пальмитоилирования, домен пренилирования или трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации является внутриклеточным и связан с внеклеточным лиганд- (например, антиген-) связывающим доменом через трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен мультимеризации связан, прямо или косвенно, с внутриклеточной сигнальной областью. В некоторых аспектах, индуцированная мультимеризация домена мультимеризации также сближает внутриклеточные сигнальные области друг с другом, чтобы сделать возможной мультимеризацию, *например,* димеризацию, и стимулировать внутриклеточную передачу сигналов. В некоторых вариантах осуществления, полипептид индуцибельного CAR содержит трансмембранный домен, одну или несколько внутриклеточных сигнальных областей и один или несколько доменов мультимеризации, каждый из которых связан прямо или косвенно.

В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации является внеклеточным или связан с клеточной мембраной на внеклеточной стороне сконструированной клетки (например, сконструированной Т-клетки). В некоторых аспектах, внеклеточный домен мультимеризации связан, прямо или косвенно, с мембраноассоциированным доменом (например, липид-связывающим доменом), таким как домен миристоилирования, домен пальмитоилирования, домен пренилирования или трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен мультимеризации связан, прямо или косвенно, с лиганд-связывающим доменом, *например,* антигенсвязывающим доменом, например, для связывания с антигеном, ассоциированным с заболеванием. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации является внеклеточным и связан с внутриклеточной сигнальной областью через трансмембранный домен.

В некоторых аспектах, мембраноассоциированный домен является трансмембранным доменом существующего трансмембранного белка. В некоторых примерах мембраноассоциированным доменом является любой из трансмембранных доменов, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах, мембраноассоциированный домен содержит мотивы взаимодействия белок-белок или трансмембранные последовательности.

В некоторых аспектах, мембраноассоциированным доменом является домен ацилирования, такой как домен миристоилирования, домен пальмитоилирования, домен

пренилирования (т.е. фарнезилирования, геранил-геранилирования, CAAX Box). Например, мембраноассоциированный домен может быть мотивом последовательности ацилирования, присутствующим на N-конце или C-конце белка. Такие домены содержат определенные мотивы последовательности, которые могут распознаваться ацилтрансферазами, которые переносят ацильные фрагменты на полипептид, который содержит домен. Например, мотивы ацилирования могут быть модифицированы одним ацильным фрагментом (в некоторых случаях за которым следуют несколько положительно заряженных остатков (например, c-Src человека: MGSNKSKPKDASQRRR (SEQ ID NO:84) для улучшения ассоциации с головными группами анионных липидов). В других аспектах, мотив ацетилирования может быть модифицирован несколькими ацильными фрагментами. Например, области двойного ацилирования расположены в N-концевых областях определенных протеинкиназ, таких как подмножество членов семейства Src (например, Yes, Fyn, Lck) и альфа-субъединицы G-белка. Примеры областей двойного ацилирования содержат мотив последовательности Met-Gly-Cys-Xaa-Cys (SEQ ID NO: 85), где Met расщепляется, Gly является N-ацилированным и один из остатков Cys является S-ацилированным, Gly часто миристоилирован, а Cys может быть пальмитоилирован.

Другие типовые области ацилирования содержат мотив последовательности Cys-Ala-Ala-Xaa (так называемые «CAAX коробки»; SEQ ID NO: 86), который можно модифицировать изопренильными фрагментами C15 или O10, и они известны (см., например, Gauthier-Campbell et al. (2004) Molecular Biology of the Cell 15:2205-2217; Glabati et al. (1994) Biochem. J. 303: 697-700 and Zlakine et al. (1997) J. Cell Science 110:673-679; ten Klooster et al. (2007) Biology of the Cell 99:1-12; Vincent et al. (2003) Nature Biotechnology 21:936-40). В некоторых вариантах осуществления, ацильным фрагментом является C1-C20 алкил, C2-C20 алкенил, C2-C20 алкинил, C3-C6 циклоалкил, C1-C4 галогеналкил, C4-C12 циклоалкилалкил, арил, замещенный арил или арил (C1-C4) алкил. В некоторых вариантах осуществления, ацилсодержащим фрагментом является жирная кислота, и примерами групп жирной кислоты являются пропил (C3), бутил (C4), пентил (C5), гексил (C6), гептил (C7), октил (C8), нонил (C9), децил (C10), ундецил (C11), лаурил (C12), миристил (C14), пальмитил (C16), стеарил (C18), арахидил (C20), бегенил (C22) и лигноцерил (C24), и каждый фрагмент может содержать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 ненасыщенных связей (т.е. двойных связей). В некоторых примерах, ацильным фрагментом является молекула жира, такая как фосфатидиллипид (например, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин), сфинголипид (например, шингомиелин, сфингозин, церамид, ганглиозид, цереброзид) или их модифицированные версии. В некоторых вариантах осуществления, одна, две, три, четыре или пять или более ацильных групп связаны с мембраноассоциированным доменом.

В некоторых аспектах, мембраноассоциированным доменом является домен, который способствует добавлению гликолипида (также известного как гликозилфосфатидилинозиты или GPI). В некоторых аспектах, молекула GPI посттрансляционно присоединяется к белковой мишени посредством реакции

трансамидирования, которая приводит к расщеплению карбокси-концевой сигнальной последовательности GPI (см., например, White et al. (2000) J. Cell Sci 113:721) и одновременному переносу уже синтезированной якорной молекулы GPI на вновь образованную карбокси-концевую аминокислоту (см., например, Varki A, et al., editors. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999. Chapter 10, Glycophospholipid Anchors. Доступно из: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20711/). В некоторых вариантах осуществления, мембраноассоциированным доменом является сигнальная последовательность GPI.

В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации, как представлено в настоящем документе, связан с внутриклеточными сигнальными областями, например, с первичной сигнальной областью и/или костимулирующими сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации является внеклеточным и связан с внутриклеточной сигнальной областью через трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации является внутриклеточным и связан с лиганд- (например, антиген-) связывающим доменом через трансмембранный домен. Лиганд-связывающий домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления, лиганд-связывающий домен и трансмембрана связаны спейсером, таким как любой из описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, доменом мультимеризации является FK506 связывающий белок (FKBP) или его производное или фрагмент, например FKBP12v36. В некоторых примерах при введении индуктора, такого как римидуцид, полипептиды индуцибельного CAR мультимеризуются, например, димеризуются, тем самым стимулируя сигнальные домены, связанные с доменом мультимеризации, и формируя мультимерный комплекс. Образование мультимерного комплекса приводит к индукции, модуляции, стимулированию, активации, опосредованию и/или продвижению сигналов через внутриклеточную сигнальную область.

В некоторых вариантах осуществления, передача сигналов через индуцибельный CAR может модулироваться условным образом посредством условной мультимеризации. Например, домен мультимеризации полипептидов индуцибельного CAR может связывать индуктор мультимеризации, и индуктор может быть предоставлен экзогенно. В некоторых аспектах, при связывании индуктора, мультимеризационный домен мультимеризует и индуцирует, модулирует, активирует, опосредует и/или способствует передаче сигналов через сигнальный домен. Например, индуктор можно вводить экзогенно, тем самым контролируя местоположение и продолжительность сигнала, подаваемого в сконструированную клетку, содержащую индуцибельный CAR. В некоторых вариантах осуществления, домен мультимеризации полипептидов индуцибельного CAR может связывать индуктор для мультимеризации, и индуктор может быть обеспечен эндогенно. Например, индуктор может быть продуцирован эндогенно сконструированной клеткой (например, сконструированной Т-клеткой) из рекомбинантного вектора экспрессии или из генома сконструированной клетки под контролем индуцибельного или условного

промотора, тем самым контролируя местоположение и продолжительность сигнала, поступающего в сконструированный элемент, содержащий индуцибельный CAR.

В некоторых вариантах осуществления, индуцибельный CAR контролируется с помощью переключателя-«самоубийцы». Типовые химерные рецепторы используют систему индуцибельной каспазы-9 (iCasp9), включающую слияние каспазы-9 человека и модифицированного FKBP домена димеризации, что делает возможной условную димеризацию при связывании с индуктором, например AP1903. После димеризации путем связывания индуктора, каспаза-9 активируется и приводит к апоптозу и гибели клеток, экспрессирующих химерный рецептор (см., например, Di Stasi et al. (2011) N. Engl. J. Med. 365:1673-1683).

В некоторых вариантах осуществления, типовой индуцибельный CAR содержит: (1) первый полипептид индуцибельного CAR, содержащий: (i) внутриклеточную сигнальную область; и (ii) по меньшей мере, один домен мультимеризации, способный связывать индуктор; и (2) второй полипептид индуцибельного CAR, содержащий: (i) лиганд- (например, антиген-) связывающий домен; (ii) трансмембранный домен; и (iii) по меньшей мере, один домен мультимеризации, способный связывать индуктор. В некоторых вариантах осуществления, типовой индуцибельный CAR содержит: (1) первый полипептид индуцибельного CAR, содержащий: (i) трансмембранный домен или домен ацилирования; (ii) внутриклеточную сигнальную область; и (iii) по меньшей мере, один домен мультимеризации, способный связывать индуктор; и (2) второй полипептид индуцибельного CAR, содержащий: (i) лиганд- (например, антиген-) связывающий домен; (ii) трансмембранный домен; и (iii) по меньшей мере, один домен мультимеризации, способный связывать индуктор. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, второй полипептид дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один домен мультимеризации на обоих полипептидах является внутриклеточным. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один домен мультимеризации на обоих полипептидах является внеклеточным.

В некоторых вариантах осуществления, типовой индуцибельный CAR содержит: (1) первый полипептид индуцибельного CAR, содержащий: (i), по меньшей мере, один внеклеточный домен мультимеризации, способный связывать индуктор; (ii) трансмембранный домен; и (iii) внутриклеточную сигнальную область; и (2) второй полипептид индуцибельного CAR, содержащий: (i) лиганд- (например, антиген-) связывающий домен; (ii) по меньшей мере, один внеклеточный домен мультимеризации, способный связывать индуктор, и (iii) трансмембранный домен, домен ацилирования или сигнальную последовательность GPI. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, второй полипептид дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления, типовой индуцибельный CAR содержит: (1) первый полипептид индуцибельного CAR, содержащий: (i) трансмембранный домен или домен ацилирования; (ii) хотя бы один костимулирующий домен; (iii) домен мультимеризации, способный связывать индуктор, и (iv) внутриклеточную сигнальную область; и (iii) по меньшей мере, один костимулирующий домен; и (2) второй полипептид индуцибельного CAR, содержащий: (i) лиганд- (например, антиген-) связывающий домен; (ii) трансмембранный домен; (iii) хотя бы один костимулирующий домен; и (iv) по меньшей мере, один внеклеточный домен мультимеризации, способный связывать индуктор.

В некоторых аспектах, любые из областей и/или доменов, описанных в типовых индуцибельных CAR, могут быть упорядочены в различных порядках. В некоторых аспектах, различные полипептиды индуцибельного CAR содержат домен мультимеризации на одной стороне клеточной мембраны, например, домен мультимеризации в двух или более полипептидах является внутриклеточным или полностью внеклеточным.

Варианты индуцибельных CAR известны, например, описаны в публикации заявки на патент США № 2014/0286987, публикации заявки на патент США № 2015/0266973, публикации международной заявки на патент № WO2014/127261 и публикации международной заявки на патент № WO2015/142675.

3. Химерный рецептор аутоантитела (CAAR)

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором, кодированным модифицированным локусом *TGFBR2,* является рецептор химерного аутоантитела (CAAR). В некоторых вариантах осуществления, CAAR связывает, например, специфически связывает или распознает аутоантитело. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CAAR, такая как Т-клетка, сконструированная для экспрессии CAAR, может использоваться для связывания и уничтожения клеток, экспрессирующих аутоантитела, но не нормальных клеток, экспрессирующих антитела. В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие CAAR, можно использовать для лечения аутоиммунного заболевания, ассоциированного с экспрессией аутоантигенов, такого как аутоиммунные заболевания. В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие CAAR, могут таргетировать В-клетки, которые в конечном итоге продуцируют аутоантитела и экспонируют аутоантитела на своей клеточной поверхности, маркируют эти В-клетки как специфичные для заболевания мишени для терапевтического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие CAAR, можно использовать для эффективного таргетирования и уничтожения патогенных В-клеток при аутоиммунных заболеваниях путем таргетирования вызывающих заболевание В-клеток с использованием антигенспецифического химерного рецептора аутоантитела. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является CAAR, такой как любой, описанный в публикации заявки на патент США. № US 2017/0051035.

В некоторых вариантах осуществления, CAAR содержит связывающий домен аутоантитела, трансмембранный домен и одну или несколько внутриклеточных сигнальных

областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическим сигнальным доменом или областью). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен является или содержит первичную сигнальную область, сигнальный домен, который способен стимулировать и/или индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) (например, внутриклеточный сигнальный домен или область CD3-дзета (CD3ζ) цепи или ее функциональный вариант или сигнальная часть), и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен аутоантитела содержит аутоантиген или его фрагмент. Выбор аутоантигена может зависеть от типа таргетируемого аутоантитела. Например, аутоантиген может быть выбран потому, что он распознает аутоантитела на клетке-мишени, такой как В-клетка, связанная с конкретным болезненным состоянием, например, аутоиммунным заболеванием, таким как аутоиммунное заболевание, опосредованное аутоантителами. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунное заболевание включает обыкновенную пузырчатку (PV). Типовые аутоантигены включают десмоглеин 1 (Dsg1) и Dsg3.

4. Т-клеточные рецепторы (TCR)

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором, кодированным модифицированным локусом *TGFBR2,* является Т-клеточный рецептор (TCR) или его часть, например рекомбинантный TCR или его антигенсвязывающая часть, который распознает внутриклеточный и/или пептидный эпитоп или Т-клеточный эпитоп полипептида-мишени, такого как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок. В некоторых аспектах, кодированный рецептор является или содержит рекомбинантный TCR. В некоторых аспектах, рекомбинантным TCR является одноцепочечный TCR или мультицепочечный TCR, такой как двухцепочечный TCR.

В некоторых вариантах осуществления, «Т-клеточный рецептор» или «TCR» является молекулой, которая содержит вариабельные α и β цепи (также известные как TCRα и TCRβ, соответственно) или вариабельные γ и δ цепи (также известные как TCRγ и TCRδ, соответственно) или их антигенсвязывающие части, и которая способна специфически связываться с пептидом, связанным с молекулой MHC. В некоторых вариантах осуществления, TCR находится в форме αβ. В некоторых вариантах осуществления, TCR, которые существуют в формах αβ и γδ, в целом структурно подобны, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь различные анатомические локации или функции. TCR можно найти на поверхности клетки или в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления, TCR является двухцепочечный TCR, содержащий TCRα и TCRβ; или TCRγ и TCRδ цепь. В некоторых аспектах, TCR найден на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC).

В некоторых вариантах осуществления, TCR охватывает полноразмерные TCR или их антигенсвязывающие части или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, TCR является интактный или полноразмерный TCR, включая TCR в αβ форме или γδ форме. В некоторых вариантах осуществления, TCR является антигенсвязывающей частью, которая меньше полноразмерного TCR, но которая связывается со специфическим пептидом, связанным в молекуле MHC, например, связывается с комплексом MHC-пептид. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR может содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но все же может связывать пептидный эпитоп, такой как комплекс MHC-пептид, с которым связывается полный TCR. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть содержит вариабельные домены в TCR, такие как вариабельная α (V_α) цепь и вариабельная β (V_β) цепь TCR, или их антигенсвязывающие фрагменты, достаточные для образования сайта связывания для связывания со специфическим комплексом MHC-пептид.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельные домены кодированного TCR содержат гипервариабельные петли или определяющие комплементарность области (CDR), которые обычно вносят основной вклад в распознавание антигена и способности связывания и специфичность. В некоторых вариантах осуществления, CDR TCR или их комбинации формируют весь или по существу весь антигенсвязывающий сайт данной молекулы TCR. Различные CDR в вариабельной области цепи TCR обычно разделены каркасными областями (FR), которые обычно демонстрируют меньшую вариабельность среди молекул TCR по сравнению с CDR (см., например, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; см. также Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления, CDR3 является основной CDR, ответственной за связывание или специфичность антигена, или является наиболее важной из трех CDR в данной вариабельной области TCR для распознавания антигена и/или для взаимодействия с процессированной пептидной частью комплекса пептид-MHC. В некоторых контекстах, CDR1 альфа-цепи может взаимодействовать с N-концевой частью определенных антигенных пептидов. В некоторых контекстах, CDR1 бета-цепи может взаимодействовать с C-концевой частью пептида. В некоторых контекстах, CDR2 вносит наибольший вклад или является первичной CDR, ответственной за взаимодействие или распознавание MHC части комплекса MHC-пептид. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область β-цепи может содержать дополнительную гипервариабельную область (CDR4 или HVR4), которая обычно вовлечена в связывании суперантигена, но не в распознавание антигена (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). В некоторых аспектах, каждая цепь TCR

может иметь один N-концевой вариабельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на С-конце. В некоторых вариантах осуществления, TCR ассоциирован с инвариантными белками комплекса CD3, вовлеченными в опосредование трансдукции сигнала.

В некоторых вариантах осуществления, кодированная цепь TCR содержит один или несколько константных доменов. Например, внеклеточная часть данной цепи TCR (например, α цепи или β цепи) может содержать два иммуноглобулиноподобных доменов, таких как переменный домен (например, Vα или Vβ; обычно аминокислоты 1-116 на основе нумерации Kabat, Kabat et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) и константный домен (например, константный домен α цепи или Cα, как правило, положения 117-259 цепи на основе нумерации Kabat, или константный домен β цепи или домен C_{β}, как правило, положения 117-295 цепи на основе Kabat), прилегающие к клеточной мембране. Например, в некоторых случаях, внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два константных домена, проксимальных к мембране и два вариабельных домена, расположенных дистально, каждый из которых содержит CDR. Константный домен TCR может содержать короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, тем самым связывая две цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR может иметь дополнительный остаток цистеина в каждой из α и β цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

В некоторых вариантах осуществления, кодированные цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен положительно заряжен. В некоторых случаях, цепь TCR содержит цитоплазматический хвост. В некоторых случаях, структура позволяет TCR ассоциироваться с другими молекулами, такими как CD3 и их субъединицы. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может заякорить белок в клеточной мембране и ассоциироваться с инвариантными субъединицами сигнального аппарата или комплекса CD3. Внутриклеточные хвосты CD3 сигнальных субъединиц (например, CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ цепи) содержат один или несколько иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые участвуют в сигнальной способности комплекса TCR.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR содержит различные домены или области. В некоторых случаях, точный домен или область могут варьироваться в зависимости от конкретного структурного или гомологического моделирования или других характеристик, используемых для описания конкретного домена. Понятно, что ссылки на аминокислоты, в том числе на конкретную последовательность, обозначенную как SEQ ID NO, используемую для описания организации домена рекомбинантного рецептора, например, TCR, предназначены для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема представленных вариантов осуществления. В некоторых случаях, конкретный домен (например, вариабельный или константный) может быть на несколько

аминокислот (например, на одну, две, три или четыре) длиннее или короче. В некоторых аспектах, остатки TCR известны или могут быть идентифицированы в соответствии с системой нумерации International Immunogenetics Information System (IMGT) (см., например, www.imgt.org; см. также Lefranc et al. (2003) Developmental and Comparative Immunology, 27;55-77; и The T Cell Factsbook 2nd Edition, Lefranc and LeFranc Academic Press 2001). При использовании этой системы, последовательности CDR1 в Vα цепях и/или Vβ цепи TCR соответствуют аминокислотам, присутствующим между числом остатков 27-38, включительно, последовательности CDR2 в Vα цепи и/или Vβ цепи TCR соответствуют аминокислотам. присутствующие между числом остатков 56-65, включительно, и последовательности CDR3 в Vα цепи и/или цепи Vβ TCR соответствуют аминокислотам, присутствующим между числом остатков 105-117, включительно.

В некоторых вариантах осуществления, каждая из α цепи и β цепи TCR дополнительно содержит константный домен. В некоторых вариантах осуществления, константный домен α цепи (Cα) и константный домен β цепи (Cβ) по отдельности принадлежит млекопитающим, например, константный домен человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, константный домен находится рядом с клеточной мембраной. Например, в некоторых случаях, внеклеточная часть кодированного TCR, образованная двумя цепями, содержит два константных домена, проксимальных к мембране, и два вариабельных домена, расположенных дистально, каждый из которых содержит CDR.

В некоторых вариантах осуществления, каждый из Cα и Cβ доменов является человеческим. В некоторых вариантах осуществления, Cα кодирован геном *TRAC* (номенклатура IMGT) или является его вариантом. В некоторых вариантах осуществления, Cβ кодирован генами *TRBC1* или *TRBC2* (IMGT номенклатура) или их вариантом. В некоторых вариантах осуществления, любой из предоставленных TCR или их антигенсвязывающих фрагментов может быть химерным TCR человека/мыши. В некоторых случаях, кодированный TCR или его антигенсвязывающий фрагмент имеет α-цепь и/или β-цепь, содержащую константную область мыши. В некоторых аспектах, Cα и/или Cβ области являются константными областями мыши. В некоторых из таких вариантов осуществления, кодированный TCR или его антигенсвязывающий фрагмент кодирован нуклеотидной последовательностью, которая была кодон-оптимизирована.

В некоторых из таких вариантов осуществления, связывающая молекула или TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент выделены, очищены или являются рекомбинантными. В некоторых из таких вариантов осуществления, связывающая молекула, или TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент являются человеческими.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR может быть гетеродимером двух цепей α и β, которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления, константный домен кодированного TCR может содержать короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, тем самым связывая две цепи

кодированного TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR может иметь дополнительный остаток цистеина в каждой из α и β цепей, так что кодированный TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах. В некоторых вариантах осуществления, каждый из константного и вариабельного доменов содержит дисульфидные связи, образованные остатками цистеина.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR может быть гетеродимером из двух цепей α и β или γ и δ, таким как двухцепочечный TCR, или он может быть конструкцией одноцепочечного TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR является гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (двухцепочечные TCR, α и β цепи или γ и δ цепи), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR может быть создан из известных последовательностей TCR, таких как последовательности Vα,β цепей, для которых по существу полноразмерная кодирующая последовательность легко доступна. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V цепи, из клеточных источников хорошо известны. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, могут быть получены из различных источников, таких как амплификация полимеразной цепной реакцией (ПЦР) нуклеиновых кислот, кодирующих TCR, в данной клетке или клетках или выделенных из них, или синтез общедоступных ДНК последовательностей TCR.

В некоторых вариантах осуществления, кодированные рекомбинантные рецепторы содержат рекомбинантные TCR и/или TCR, клонированные из существующих в природе Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, идентифицируют высокоаффинный клон Т-клетки для антигена-мишени (например, ракового антигена), выделенный у пациента, и вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления, клон TCR для антигена-мишени был получен у трансгенных мышей, введенных с использованием генов иммунной системы человека (например, антигенной системы лейкоцитов человека или HLA). См., например, опухолевые антигены (см., например, Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 и Cohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808. В некоторых вариантах осуществления, фаговый дисплей используют для выделения TCR против антигена-мишени (см., например, Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 и Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR получают из биологического источника, например, из клеток, таких как Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), Т-клеточных гибридом или другого общедоступного источника. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки могут быть получены из клеток, выделенных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, TCR является тимически выбранный TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR является неоэпитоп-рестриктированный TCR. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетками могут быть культивированная Т-клеточная гибридома или клон. В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть или его антигенсвязывающий

фрагмент могут быть получены синтетически на основе знания последовательности TCR.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR создают из TCR, идентифицированного или выбранного в результате скрининга библиотеки кандидатных TCR против полипептидного антигена-мишени, или его Т-клеточного эпитопа-мишени. Библиотеки TCR могут быть созданы амплификацией репертуара Vα и Vβ из Т-клеток, выделенных от субъекта, включая клетки, присутствующие в PBMC, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях, Т-клетки могут быть амплифицированы из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR могут быть созданы из клеток CD4+ или CD8+. В некоторых вариантах осуществления, TCR могут быть амплифицированы из источника Т-клеток нормального здорового субъекта, то есть из нормальных библиотек TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR могут быть амплифицированы из источника Т-клеток больного субъекта, то есть библиотек болезненных TCR. В некоторых вариантах осуществления, вырожденные праймеры используют для амплификации репертуара генов Vα и Vβ, например, с помощью ОТ-ПЦР в образцах, таких как Т-клетки, полученные от человека. В некоторых вариантах осуществления, библиотеки, такие как библиотеки одноцепочечных TCR (scTv), могут быть собраны из наивных библиотек Vα и Vβ, в которых амплифицированные продукты клонированы или собраны для разделения с помощью линкера. В зависимости от источника субъекта и клеток, библиотеки могут быть HLA аллель-специфичными. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR могут быть созданы путем мутагенеза или диверсификации исходной или каркасной молекулы TCR.

В некоторых аспектах, кодированные TCR подвергаются направленной эволюции, такой как мутагенез, например, α или β цепи. В некоторых аспектах, изменяют конкретные остатки в CDR TCR. В некоторых вариантах осуществления, выбранные TCR могут быть модифицированы созреванием аффинности. В некоторых вариантах осуществления, антигенспецифические Т-клетки могут быть выбраны, например, путем скрининга для оценки активности CTL против пептида. В некоторых аспектах, кодированные TCR, например, присутствующие на антигенспецифических Т-клетках, могут быть выбраны, например, по активности связывания, например, определенной аффинности или авидности к антигену.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR или его антигенсвязывающая часть является модифицированной или сконструированной. В некоторых вариантах осуществления, способы направленной эволюции используют для создания TCR с измененными свойствами, например с более высокой аффинностью к конкретному комплексу MHC-пептид. В некоторых вариантах осуществления, направленная эволюция достигается с помощью способов дисплея, включая, помимо прочего, дрожжевой дисплей (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) или Т-клеточный дисплей (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). В

некоторых вариантах осуществления, методы дисплея включают конструирование или модификацию известного, родительского или эталонного TCR. Например, в некоторых случаях, TCR дикого типа можно использовать в качестве матрицы для получения мутагенизированных TCR, в которых один или несколько остатков CDR мутированы, и выбора мутантов с желаемым измененным свойством, таким как более высокая аффинность к желаемому антигену-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является опухолевый антиген, который может быть глиома-ассоциированным антигеном, β-хорионическим гонадотропином человека, альфафетопротеином (AFP), антигеном созревания B-клеток (BCMA, BCM), рецептором фактора активации B-клеток (BAFFR, BR3) и/или трансмембранным активатором и CAML интерактором (TACI), Fc рецептора-подобного 5 (FCRL5, FcRH5), лектин-реактивного AFP, тиреоглобулина, RAGE-1, MN-CA IX, обратной транскриптазой теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), кишечной карбоксилэстеразой, mut hsp70-2, M-CSF, Меланин-A/MART-1, WT-1, S-100, MBP, CD63, MUC1 (*например,* MUC1-8), p53, Ras, циклином B1, HER-2/neu, карциноэмбриональным антигеном (CEA), gp100, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A11, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-C1, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, pl5, тирозиназы, родственного тирозиназе белка 1 (TRP-1), родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2), β-катенина, NY-ESO-1, LAGE-1a, PP1, MDM2, MDM4, EGVFvIII, Tax, SSX2, теломеразы, TARP, pp65, CDK4, виментина, S100, eIF-4A1, IFN-индуцибельного p78 и меланотрансферрина (p97), уроплакина II, простат-специфического антигена (PSA), калликреина человека (huK2), простат-специфического мембранного антигена (PSM) и кислой фосфатазы простаты (PAP), нейтрофилэластазы, эфрина B2, BA-46, бета-катенина, Bcr-abl, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, каспазы 8 или антигена B-Raf. Другие опухолевые антигены могут включать любые, полученные из FRa, CD24, CD44, CD133, CD 166, epCAM, CA-125, HE4, Oval, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, uPA, PAI-1, CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелина, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипида F77, GD-2, фактора роста инсулина (IGF)-I, IGF-II и рецептора IGF-I. Известны специфические опухолеассоциированные антигены или T-клеточные эпитопы (*см., например,* van der Bruggen *et al.* (2013) Cancer Immun, доступно на www.cancerimmunity.org/peptide/; Cheever *et al.* (2009) Clin Cancer Res, 15, 5323-37).

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является вирусный антиген. Многие мишени вирусных антигенов были идентифицированы и известны, включая пептиды, полученные из вирусных геномов HIV, HTLV и других вирусов (см., *например,* Addo *et al.* (2007) PLoS ONE, 2, e321; Tsomides *et al.* (1994) J Exp Med, 180, 1283-93; Utz *et al.* (1996) J Virol, 70, 843-51). Примеры вирусных антигенов включают, но не ограничены ими, антиген из гепатита A, гепатита B (*например,* коровые и поверхностные антигены HBV (HBVc, HBV)), гепатита C (HCV), вируса Эпштейн-Барр (*например,* EBVA), папилломавируса человека (HPV; *например,* E6 и E7), вируса иммунодефицита человека

типа 1 (HIV1), вируса герпеса саркомы Капоши (KSHV), папилломвируса человека (HPV), вируса гриппа, вируса Ласса, HTLN-1, HIN-1, HIN-II, CMN, EBN или HPN. В некоторых вариантах осуществления, белком-мишенью является бактериальный антиген или другой патогенный антиген, такой как антигены Mycobacterium tuberculosis (MT), трипаносомы, *например,* Tiypansoma cruzi (T. cruzi), антигены, такие как поверхностный антиген (TSA), или антигены малярии. Специфические вирусные антигены или эпитопы, или другие патогенные антигены или Т-клеточные эпитопы известны (см., *например,* Addo *et al.* (2007) PLoS ONE, 2:e321; Anikeeva *et al.* (2009) Clin Immunol, 130:98-109).

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является антиген, полученный из вируса, ассоциированного с раком, такого как онкогенный вирус. Например, онкогенным вирусом является вирус, при котором заражение определенными вирусами, как известно, приводит к развитию различных типов рака, например гепатит А, гепатит В (*например,* коровые и поверхностные антигены HBV (HBVc, HBV)), гепатит С (HCV), папилломавирус человека (HPV), вирусные инфекции гепатита, вирус Эпштейн-Барр (EBV), вирус герпеса человека 8 (HHV-8), вирус Т-клеточного лейкоза человека-1 (HTLV-1), вирус Т-клеточного лейкоза-2 человека (HTLV-2) или антиген цитомегаловируса (CMV).

В некоторых вариантах осуществления, вирусным антигеном является HPV антиген, который, в некоторых случаях, может привести к большему риску развития рака шейки матки. В некоторых вариантах осуществления, антигеном может быть антиген HPV-16, и антиген HPV-18, и антиген HPV-31, антиген HPV-33 или антиген HPV-35. В некоторых вариантах осуществления, вирусным антигеном является антиген HPV-16 (*например,* серореактивные области E1, E2, E6 и/или E7 белков HPV-16, см., *например,* патент США № 6,531,127) или антиген HPV-18 (*например,* серореактивные области L1 и/или L2 белков HPV-18, как описано в патенте США № 5,840,306). В некоторых вариантах осуществления, вирусным антигеном является HPV-16 антиген, который происходит из E6 и/или E7 белков HPV-16. В некоторых вариантах осуществления, TCR является TCR, направленный против E6 HPV-16 или E7 HPV-16. В некоторых вариантах осуществления, TCR является TCR, описанный, например, в WO 2015/184228, WO 2015/009604 и WO 2015/009606.

В некоторых вариантах осуществления, вирусным антигеном является антиген HBV или HCV, что, в некоторых случаях, может привести к большему риску развития рака печени, чем у субъектов, негативных по HBV или HCV. Например, в некоторых вариантах осуществления, гетерологичным антигеном является антиген HBV, такой как коровый антиген гепатита В или антиген оболочки гепатита В (US2012/0308580).

В некоторых вариантах осуществления, вирусным антигеном является антиген EBV, который, в некоторых случаях, может привести к большему риску развития лимфомы Буркитта, карциномы носоглотки и болезни Ходжкина, чем у субъектов, негативных по EBV. Например, EBV является вирусом герпеса человека, который в некоторых случаях, находится в ассоциации с многочисленными опухолями человека различного тканевого происхождения. Хотя EBV-положительные опухоли в основном обнаруживаются как бессимптомная инфекция, они могут характеризоваться активной экспрессией вирусных

генных продуктов, таких как EBNA-1, LMP-1 и LMP-2A. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичным антигеном является антиген EBV, который может включать ядерный антиген Эпштейн-Барр (EBNA)-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-лидерный белок (EBNA-LP), латентные мембранные белки LMP-1, LMP-2A и LMP-2B, EBV-EA, EBV-MA или EBV-VCA.

В некоторых вариантах осуществления, вирусным антигеном является антиген HTLV-1 или HTLV-2, что в некоторых случаях может привести к большему риску развития Т-клеточного лейкоза, чем у субъектов, негативных по HTLV-1 или HTLV-2. Например, в некоторых вариантах осуществления, гетерологичным антигеном является HTLV-антиген, такой как TAX.

В некоторых вариантах осуществления, вирусным антигеном является антиген HHV-8, который в некоторых случаях может привести к большему риску развития саркомы Капоши, чем у субъектов, негативных по HHV-8. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичным антигеном является антиген CMV, такой как pp65 или pp64 (см. патент США № 8,361,473).

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является аутоантиген, такой как антиген полипептида, ассоциированного с аутоиммунным заболеванием или нарушением. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунным заболеванием или нарушением является рассеянный склероз (MS), ревматоидный артрит (RA), синдром Шегрена, склеродермия, полимиозит, дерматомиозит, системная красная волчанка, ювенильный ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит (MG). пемфигоид (антитела к базальной мембране на дермо-эпидермальном соединении), пузырчатка (антитела к белковому комплексу мукополисахаридов или внутриклеточному цементному веществу), гломерулонефрит (антитела к базальной мембране клубочков), синдром Гудпастура, аутоиммунная гемолитическая анемия (антитела к эритроцитам) болезнь Хашимото (антитела к щитовидной железе), пернициозная анемия (антитела к внутреннему фактору), идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (антитела к тромбоцитам), болезнь Грейвса или болезнь Аддисона (антитела к тиреоглобулину). В некоторых вариантах осуществления, аутоантиген, такой как аутоантиген, аассоциированный с одним из вышеуказанных аутоиммунных заболеваний, может представлять собой коллаген, такой как коллаген типа II, микобактериальный белок теплового шока, тиреоглобулин, рецептор ацетилхолина (AcHR), основной белок миелина (MBP) или протеолипидный белок (PLP). Известны специфические аутоиммунные эпитопы или антигены (см., *например,* Bulek *et al.* (2012) Nat Immunol, 13:283-9; Harkiolaki *et al.* (2009) Immunity, 30:348-57; Skowera *et al.* (2008) J Clin Invest, 1(18): 3390-402).

В некоторых вариантах осуществления, пептиды полипептида-мишени для использования при продуцировании или генерировании представляющего интерес TCR известны или могут быть легко идентифицированы. В некоторых вариантах осуществления, пептиды, подходящие для использования в создании TCR или антигенсвязывающих частей, могут быть определены на основе присутствия HLA-

рестриктированного мотива в представляющем интерес полипептиде-мишени, таком как полипептид-мишень, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления, пептиды идентифицируют с использованием доступных компьютерных моделей прогнозирования. В некоторых примерах, HLA-A0201-связывающие мотивы и сайты расщепления протеасом и иммунных протеасом с использованием моделей компьютерного прогнозирования являются известными. В некоторых вариантах осуществления, для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, но не ограничиваются ими, ProPred1 (Singh and Raghava (2001) Bioinformatics 17(12):1236-1237, и SYFPEITHI (см. Schuler et al. (2007) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, 409(1): 75-93 2007). В некоторых вариантах осуществления, MHC-рестриктированным эпитопом является HLA-A0201, который экспрессируется приблизительно у 39-46% всех европеоидов и, следовательно, является подходящим выбором MHC антигена для использования при получении TCR или другой молекулы, связывающей MHC-пептид.

В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающей частью может быть рекомбинантно полученный природный белок или его мутированная форма, в которой было изменено одно или несколько свойств, таких как характеристика связывания. В некоторых вариантах осуществления, TCR может быть получен из одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может быть связанным с клетками или в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления, для целей представленных способов, TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессируемой на поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный TCR является полноразмерный TCR. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным TCR является антигенсвязывающей частью. В некоторых вариантах осуществления, TCR является димерный TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления, TCR является одноцепочечным TCR (scTCR). В некоторых вариантах осуществления, dTCR или scTCR имеют структуры, как описано, например, в публикации международной заявки на патент № WO 03/020763, WO 04/033685 и WO 2011/044186.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую цитоплазматическим последовательностям. В некоторых вариантах осуществления, TCR способен образовывать комплекс TCR с CD3. В некоторых вариантах осуществления, любой из рекомбинантных TCR, включая dTCR или scTCR, может быть связан с сигнальными доменами, которые дают активный TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный TCR экспрессируется на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащих введенные или сконструированные межцепочечные дисульфидные связи, нативные дисульфидные связи не присутствуют.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR содержит одну или

несколько модификаций для введения одного или нескольких остатков цистеина, которые способны образовывать один или несколько не нативных дисульфидных мостиков между TCRα цепью и TCRβ цепью. В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR содержит TCRα цепь или ее часть, содержащую константный домен TCRα, содержащий один или несколько остатков цистеина, способных образовывать не нативную дисульфидную связь с TCRβ цепью. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует TCRβ цепь или ее часть, содержащую константный домен TCRβ, содержащий один или несколько остатков цистеина, способных образовывать не нативную дисульфидную связь с TCRα цепью. В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR содержит TCRα и/или TCRβ цепь, и/или константные домены TCRα и/или TCRβ цепи, содержащие одну или несколько модификаций для введения одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует TCRα и/или TCRβ цепь, и/или TCRα и/или TCRβ с одной или несколькими модификациями для удаления или предотвращения нативной дисульфидной связи, например, между TCRα, кодированным трансгеном, и эндогенной TCRβ цепью, или между TCRβ, кодированным трансгеном, и эндогенной TCRα цепью. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько нативных цистеинов, которые образуют и/или способны образовывать природную межцепочечную дисульфидную связь, заменены другим остатком, например серином или аланином. В некоторых вариантах осуществления, цистеин вводят на одном или нескольким остатках Thr48, Thr45, Tyr10, Thr45 и Ser15 со ссылкой на нумерацию константного домена TCRα. В некоторых вариантах осуществления, цистеины могут быть введены на остатке Ser57, Ser77, Ser17, Asp59, Glu15 константного домена TCRβ цепи. Типовые не нативные дисульфидные связей TCR описаны в опубликованных международных заявках PCT № WO2006/000830, WO 2006/037960 и Kuball et al. (2007) Blood, 109:2331-2338. В некоторых вариантах осуществления, цистеины могут быть введены или заменены на остатке, соответствующем Thr48 Cα цепи и Ser57 Cβ цепи, остатке Thr45 Cα цепи и Ser77 Cβ цепи, остатке Tyr10 Cα цепи и Ser17 Cβ цепи, на остатке Thr45 Cα цепи и Asp59 Cβ цепи и/или на остатке Ser15 Cα цепи и Glu15 Cβ цепи. В некоторых вариантах осуществления, любая мутация цистеина может быть сделана в соответствующем положении в другой последовательности, например, в последовательности Cα и Cβ человека или мыши, описанной выше. Термин «соответствующий» применительно к положениям белка, например, при сообщении о том, что положения аминокислот «соответствуют» положениям аминокислот в типовых Cα и Cβ, относится к положениям аминокислот, идентифицированным при выравнивании с описанной последовательностью на основе выравнивания структурных последовательностей или при применении стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько нативных цистеинов, образующих природные межцепочечные дисульфидные связи, заменены другим остатком, таким как серин или аланин. В некоторых вариантах осуществления, введенная или

сконструированная дисульфидная связь может быть образована путем мутации не цистеиновых остатков в первом и втором сегментах до цистеина. Примеры не нативных дисульфидных связей TCR описаны в опубликованной международной заявке PCT № WO2006/000830.

В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным TCR является димерный TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления, dTCR содержит первый полипептид, в котором последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области TCRα цепи, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области TCRα цепи, и второй полипептид, в котором последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области TCRβ цепи, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области TCRβ цепи, где первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления, связь может соответствовать нативной межцепочечной дисульфидной связи, присутствующей в нативных димерных αβ TCR. В некоторых вариантах осуществления, межцепочечные дисульфидные связи не присутствуют в природном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области полипептидной пары dTCR. В некоторых случаях может быть желательна как нативная, так и не нативная дисульфидная связь. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит трансмембранную последовательность для закрепления на мембране.

В некоторых вариантах осуществления, dTCR содержит TCRα цепь, содержащую вариабельный α домен, константный α домен и первый мотив димеризации, прикрепленный к С-концу константного α домена, и TCRβ цепь, содержащую вариабельный β домен, константный β домен и первый мотив димеризации, присоединенный к С-концу константного β домена, где первый и второй мотивы димеризации взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве димеризации и аминокислотой во втором мотиве димеризации, связывающем TCRα цепь и TCRβ цепь вместе.

В некоторых вариантах осуществления, кодированным рекомбинантным TCR является одноцепочечный TCR (scTCR или scTv). Обычно scTCR можно генерировать с использованием известных способов, см., например, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); публикациях международной патентной заявки №№ WO 96/13593, WO 96/18105, WO 99/60120, WO 99/18129, WO 03/020763, WO 2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит введенную не нативную дисульфидную межцепочечную связь для облегчения ассоциации TCR цепей (см., например, публикацию международной патентной заявки № WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления, scTCR является усеченный TCR без дисульфидной связи, в котором гетерологичные лейциновые «молнии», слитые с его С-

концом, способствуют ассоциации цепи (см., например, публикацию международной патентной заявки № WO 99/60120). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит вариабельный домен TCRα, ковалентно связанный с вариабельным доменом TCRβ через пептидный линкер (см., например, публикацию международной патентной заявки № WO 99/18129).

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной области TCRα цепи, второй сегмент, образованный аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности вариабельной области TCRβ цепи, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена TCRβ цепи, и линкерную последовательность, связывающую C-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента. В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области α цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена α цепи, и второй сегмент, образованный последовательностью вариабельной области β цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной и трансмембранной последовательности β цепи и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую C-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента. В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области TCRβ цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена β цепи, и второй сегмент, образованный последовательностью вариабельной области α цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной и трансмембранной последовательности α-цепи и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую C-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых вариантах осуществления, линкер scTCR, который связывает первый и второй сегменты TCR, может быть любым линкером, способным образовывать одну полипептидную цепь, сохраняя при этом специфичность связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления, линкерная последовательность может, например, иметь формулу -P-AA-P-, где P является пролином, и AA является аминокислотной последовательностью, в которой аминокислотами являются глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй сегменты спарены так, что их последовательности вариабельной области ориентированы для такого связывания. Следовательно, в некоторых случаях, линкер имеет достаточную длину, чтобы охватить расстояние между C-концом первого сегмента и N-концом второго сегмента, или наоборот, но он не слишком длинный, чтобы блокировать или уменьшать связывание scTCR с лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать от точно или примерно 10 до 45 аминокислот, например, от 10 до 30 аминокислот или от 26 до 41 аминокислотных остатков, например, 29, 30, 31 или 32 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет формулу -PGGG-$(SGGGG)_5$-P-, где P является пролином, G является глицином и S

является серином (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO: 23).

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток иммуноглобулиновой области константного домена α цепи с остатком иммуноглобулиновой области константного домена β цепи. В некоторых вариантах осуществления, межцепочечная дисульфидная связь в нативном TCR не присутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области первого и второго сегментов полипептида scTCR. В некоторых случаях, может быть желательна как нативная, так и не нативная дисульфидная связь.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR или его антигенсвязывающий фрагмент имеет аффинность с равновесной константой диссоциации (K_D) для антигена-мишени от точно или примерно 10^{-5} до 10^{-12} М или все индивидуальные значений и диапазоны в этом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления, антигеном-мишенью является комплекс MHC-пептид или лиганд.

C. Клетки и получение клеток для генной инженерии

В некоторых вариантах осуществления, представлены сконструированные клетки, например, генетически сконструированные или модифицированные клетки, и способы конструирования клеток, включая генетически сконструированные клетки, содержащие модифицированный локус *TGFBR2,* который содержит трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, например, матричные полинуклеотиды, такие как любой из матричных полинуклеотидов, описанных в настоящем документе, например, в Разделе I.B.2, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть и/или дополнительные молекулы, вводят в одну клетку для конструирования, например, в соответствии со способами конструирования, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах, модифицированный локус *TGFBR2* сконструированной клетки содержит локусы, описанные в разделе III.A настоящего документа.

В некоторых аспектах, трансгенные последовательности (экзогенные или гетерологичные последовательности нуклеиновых кислот) в полинуклеотидах и/или их частях являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, которые, например, обычно не обнаруживаются в конструируемой клетке и/или в организме, из которого такая клетка получена. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты не встречаются в природе, например, последовательности нуклеиновой кислоты не встречаются в природе или модифицированы из последовательности нуклеиновой кислоты, встречающейся в природе, включая последовательность, содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующие различные домены из нескольких разных типов клеток.

В некоторых аспектах, представлен способ получения генетически сконструированной Т-клетки, где способ включает введение любого из представленных полинуклеотидов, например, описанных в настоящем документе в Разделе I.B.2, в Т-клетку, содержащую генетическое разрушение в локусе *TGFBR2*. В некоторых аспектах, генетическое разрушение вводят любыми агентами или способами для введения таргетного генетического разрушения, включая любые описанные в настоящем документе, например, в Разделе I.A. В некоторых аспектах, способ дает модифицированный локус *TGFBR2*, указанный модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, представлен способ получения генетически сконструированной Т-клетки, который включает введение в Т-клетку одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в эндогенном локусе *TGFBR2* Т-клетки; и введение любого из представленных полинуклеотидов, например, описанных в настоящем документе в разделе I.B.2, в Т-клетку, содержащую генетическое разрушение в локусе *TGFBR2*, где способ дает модифицированный локус *TGFBR2*, где указанный модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, такой как CAR или TCR. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты содержит трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, и трансгенная последовательность направлена на интеграцию в эндогенный локус *TGFBR2* посредством репарации, направляемой гомологией (HDR).

В некоторых вариантах осуществления, представлены способы получения генетически сконструированной Т-клетки, которые включают введение в Т-клетку полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, где указанная Т-клетка имеет генетическое разрушение в локусе *TGFBR2* Т-клетки, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть, направлена на интеграцию в эндогенный локус *TGFBR2* посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). В некоторых вариантах осуществления, способ дает модифицированный локус *TGFBR2*, где указанный модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты содержит трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, такую как любая из описанных в настоящем документе, например, в Разделе I.B.2. В некоторых вариантах осуществления, при выполнении способов, экспрессия эндогенного TGFBRII снижается или элиминируется, или экспрессируется не функциональная и/или частичная последовательность TGFBRII. В некоторых вариантах осуществления, при выполнении способов, экспрессируется доминантно-негативная (DN) форма TGFBRII.

Клетки обычно представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и обычно, клетки человека. В некоторых вариантах осуществления,

клетками, полученными из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, являются клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, *например,* миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно, Т-клетки и/или NK-клетки. Другие типовые клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетками обычно являются первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно от субъекта и/или изолированные от субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одно или несколько подмножеств Т-клеток или других типов клеток, таких как целые популяции Т-клеток, CD4+ клетки, CD8+ клетки и их субпопуляции, такие как те, которые определяются функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом для дифференциации, размножением, рециркуляцией, локализацией и/или способностью а выживанию, антигенспецифичностью, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, маркером или профилем секреции цитокинов и/или степенью дифференциации. Что касается субъекта, подлежащего лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. В число способов входят готовые способы. В некоторых аспектах, например, для готовых технологий, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, например, стволовыми клетками, такими как iPSC. В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение клеток от субъекта, их приготовление, обработку, культивирование и/или конструирование, а также повторное введение их тому же субъекту до или после криоконсервации.

Подтипы и субпопуляции Т-клеток и/или CD4+ и/или CD8+ Т-клеток включают наивные Т (T_N)-клетки, эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), Т центральной памяти (T_{-CM}), Т эффекторной памяти (T_{EM}) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, мукозные инвариантные Т-клетки (MAIT), имеющиеся в природе и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, такие как TH1 клетки, TH2 клетки, TH3 клетки, TH17 клетки, TH9 клетки, TH22 клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, клетками являются естественные киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления, клетками являются моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы. В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, которые, например, обычно не обнаруживаются в

конструируемой клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновыми кислотами являются не встречающиеся в природе, такие как нуклеиновая кислота, не встречающаяся в природе, включая нуклеиновую кислоту, содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества различных типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления, приготовление сконструированных клеток включает одну или несколько стадий культивирования и/или получения. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, например, полученный от или производный от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект, от которого выделена клетка, является субъектом, страдающим заболеванием или состоянием, или нуждающимся в клеточной терапии, или которому будет вводиться клеточная терапия. Субъектом в некоторых вариантах осуществления является человек, нуждающийся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или конструируют.

Соответственно, клетки в некоторых вариантах осуществления, являются первичными клетками, например первичными клетками человека. Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные на одной или нескольких стадиях обработки, таких как разделение, центрифугирование, генная инженерия (например, трансдукция вирусным вектором), промывка и/или инкубация. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из биологического источника, или образцом, который обработан. Биологические образцы включают, но не ограничиваются ими, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

В некоторых аспектах, образцом, из которого получены или выделены клетки, является кровь или образец, полученный из крови, или он является или получен из продукта афереза или лейкафереза. Типовые образцы включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, кишечную лимфоидную ткань, лимфоидную ткань слизистой оболочки, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почки, поджелудочную железу, грудь, кость, простату, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другой орган, и/или полученные из них клетки. В контексте клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии, образцы включают образцы из аутологичных и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления, клетки получены из клеточных линий, например, из Т-клеточных линий. В некоторых вариантах осуществления, клетки получают из ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, приматов, не относящихся к человеку, и свиней.

В некоторых вариантах осуществления, выделение клеток включает одну или

несколько стадий приготовления и/или разделения клеток на не аффинной основе. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желаемыми компонентами, лизирования или удаления клеток, чувствительных к определенным реагентам. В некоторых примерах, клетки разделяют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгезионные свойства, размер, чувствительность и/или резистентность к конкретным компонентам.

В некоторых примерах, клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, с помощью афереза или лейкафереза. В некоторых аспектах, образцы включают лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие белые клетки крови, красные клетки крови и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах, включают клетки, отличные от красных клеток крови и тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления, клетки крови, собранные у субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в промывочном растворе отсутствуют кальций и/или магний и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадию промывания выполняют на полуавтоматической «проточной» центрифуге (например, устройстве для обработки клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах, стадию промывания выполняют фильтрацией в тангенциальном потоке (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах после промывания, таких как, например, PBS, свободный от Ca^{++}/Mg^{++}. В некоторых вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение белых клеток крови из периферической крови путем лизирования красных клеток крови и центрифугирования в градиенте Перколла или Фиколла.

В некоторых вариантах осуществления, способы выделения включают разделение разных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, может применяться любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, разделением является разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, выделение, в некоторых аспектах, включает разделение клеток и клеточных популяций на основе экспрессии клетками или уровня экспрессии одного или нескольких маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию,

который специфически связывается с такими маркерами, за которой обычно следуют стадии промывания и отделения клеток, которые связывают антитело или партнер по связыванию, от клеток, не связанных с антителом или партнером по связыванию.

Такие стадии разделения могут быть основаны на положительной селекции, при которой клетки, связывающие реагенты, сохраняют для дальнейшего использования, и/или отрицательной селекции, при которой сохраняют клетки, не связанные с антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах, обе фракции сохраняют для дальнейшего использования. В некоторых аспектах, отрицательная селекция может быть особенно полезна, когда нет доступных антител, которые специфически идентифицируют тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессированных клетками, отличными от желаемой популяции.

Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной популяции клеток или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительная селекция или обогащение клеток определенного типа, таких как те, которые экспрессируют маркер, относится к увеличению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогично, отрицательная селекция, удаление или истощение клеток определенного типа, например, экспрессирующих маркер, относится к уменьшению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах проводят несколько циклов стадий разделения, где положительно или отрицательно выбранная фракция с одной стадии подвергается другой стадии разделения, например, последующему положительному или отрицательному отбору. В некоторых примерах, одна стадия разделения может истощить клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждый из которых специфичен для маркера, направленного на отрицательную селекцию. Аналогичным образом, несколько типов клеток могут быть одновременно положительно отобраны путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессированных на различных типах клеток.

Например, в некоторых аспектах, конкретные субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, $CD28^+$, $CD62L^+$, $CCR7^+$, $CD27^+$, $CD127^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$ и/или $CD45RO^+$ Т-клетки выделяют способами положительной или отрицательной селекции.

Например, $CD3^+$, $CD28^+$ Т-клетки могут быть положительно отобраны с использованием конъюгированных анти-CD3/анти-CD28 магнитных гранул (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

В некоторых вариантах осуществления, выделение проводят путем обогащения определенной популяции клеток путем положительной селекции или истощения

конкретной популяции клеток путем отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления, положительную или отрицательную селекцию проводят путем инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другим связующим агентом, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессированных или экспрессированных (маркер$^{+}$) на относительно более высоком уровне (маркер^{high}) на положительно или отрицательно выбранных клетках, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки отделяют от образца PBMC путем отрицательной селекции маркеров, экспрессированных на не-Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие белые клетки крови, такие как CD14. В некоторых аспектах, стадию селекции CD4^{+} или CD8^{+} используют для разделения CD4^{+} хелперных и CD8^{+} цитотоксических Т-клеток. Такие популяции CD4^{+} и CD8^{+} могут быть дополнительно разделены на субпопуляции путем положительной или отрицательной селекции маркеров, экспрессированных или экспрессированных до относительно более высокой степени в одной или нескольких субпопуляциях наивных, памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, CD8^{+} клетки дополнительно обогащают или истощают наивными, центральной памяти, эффекторной памяти и/или центральной памяти стволовыми клетками, например, посредством положительной или отрицательной селекции на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления, обогащение Т (T_{CM})-клетками центральной памяти проводят для повышения эффективности, например, для улучшения долгосрочной выживаемости, размножения и/или приживления после введения, что в некоторых аспектах, является особенно устойчивым в таких субпопуляциях. *См.* Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления, объединение T_{CM}-обогащенных CD8^{+} Т-клеток и CD4^{+} Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

В вариантах осуществления, Т-клетки памяти присутствуют обоих, CD62L^{+} и CD62L^{-} подмножествах CD8^{+} лимфоцитов периферической крови. PBMC могут быть обогащены или истощены фракциями CD62L^{-}CD8^{+} и/или CD62L^{+}CD8^{+}, например, с использованием анти-CD8 и анти-CD62L антител.

В некоторых вариантах осуществления, обогащение Т (T_{CM})-клетками центральной памяти основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах, оно основано на отрицательной селекции клеток, экспрессирующих или высоко экспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах, выделение популяции CD8^{+}, обогащенной T_{CM} клетками, осуществляется путем истощения клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA и положительной селекцией или обогащением клеток, экспрессирующих CD62L. В одном аспекте, обогащение Т (T_{CM}) клеток центральной памяти проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, выбранных на основе экспрессии CD4, которые подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и

положительной селекции на основе на CD62L. Такие селекции в некоторых аспектах, выполняют одновременно, и в других аспектах, выполняют последовательно в любом порядке. В некоторых аспектах, ту же стадию селекции на основе экспрессии CD4, используемую при получении популяции или субпопуляции $CD8^+$ клеток, также используют для создания популяции или субпопуляции $CD4^+$ клеток так, что как положительные, так и отрицательные фракции из разделения на основе CD4 сохраняют и используют на последующих стадиях способов, необязательно после одной или нескольких дополнительных стадий положительной или отрицательной селекции.

В конкретном примере, образец PBMC или другой образец белой клетки крови подвергают селекции $CD4^+$ клеток, при которой сохраняют как отрицательную, так и положительную фракции. Затем, отрицательную фракцию подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19, и положительной селекции на основе характеристики маркера Т-клеток центральной памяти, такого как CD62L или CCR7, где положительную и отрицательную селекцию осуществляют в любом порядке.

$CD4^+$ Т-хелперные клетки разделяют на наивные, центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. $CD4^+$ лимфоциты могут быть получены стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления, наивными $CD4^+$ Т-лимфоцитами являются $CD45RO^-$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CD4^+$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, $CD4^+$ клетками центральной памяти являются $CD62L^+$ и $CD45RO^+$. В некоторых вариантах осуществления, эффекторными $CD4^+$ клетками являются $CD62L^-$ и $CD45RO^-$.

В одном примере, для обогащения $CD4^+$ клеток путем отрицательной селекции, коктейль моноклональных антител обычно содержит антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления, антитело или связывающий партнер связывается с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитная гранула или парамагнитная гранула, чтобы обеспечить разделение клеток для положительной и/или отрицательной селекции. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки и клеточные популяции разделяют или выделяют с использованием способов иммуномагнитного (или аффинно-магнитного) разделения (обзор в Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

В некоторых аспектах, образец или композицию клеток, подлежащих разделению, инкубируют с небольшими намагничивающимися или магниточувствительными материалами, такими как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные гранулы (например, такие как гранулы Dynalbeads или MACS). Магниточувствительный материал, например, гранулу, обычно прямо или косвенно присоединяют к партнеру по связыванию, например, антителу, который специфически связывается с молекулой, например поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые желательно отделить, например, которые

желательно подвергнуть отрицательной или положительной селекции.

В некоторых вариантах осуществления, магнитная частица или гранула содержит магниточувствительный материал, связанный со специфическим связывающим элементом, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует много хорошо известных магниточувствительных материалов, используемых в способах магнитной сепарации. Подходящие магнитные частицы включают частицы, описанные в Molday, Патент США № 4,452,773 и в описании европейского патента EP 452342 B, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Коллоидные отсортированные частицы, такие как описаны в Owen Патент США № 4,795,698, и Liberti et al., Патент США № 5,200,084 являются другими примерами.

Инкубацию обычно проводят в условиях, в которых антитела или партнеры по связыванию, или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые прикреплены к магнитной частице или грануле, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

В некоторых аспектах, образец помещают в магнитное поле, и те клетки, которые имеют прикрепленные к ним магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от не меченых клеток. Для положительной селекции, сохраняют клетки, которые притягиваются к магниту; для отрицательной селекции, сохраняют клетки, которые не притягиваются (не меченые клетки). В некоторых аспектах, комбинацию положительной и отрицательной селекции выполняют на одной и той же стадии селекции, где положительные и отрицательные фракции сохраняют и далее обрабатывают или подвергают дальнейшим стадиям разделения.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы покрывают первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы прикреплены к клеткам через покрытие из первичных антител, специфичных для одного или нескольких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, клетки, а не гранулы, метят первичным антителом или партнером по связыванию, и затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфичным к типу клеток вторичным антителом или другим партнером по связыванию (например, стрептавидином). В некоторых вариантах осуществления, покрытые стрептавидином магнитные частицы используют в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые впоследствии должны быть инкубированы, культивированы и/или сконструированы; в некоторых аспектах, частицы остаются прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления, намагничивающиеся или магниточувствительные частицы удаляют из клеток. Способы удаления намагничивающихся частиц из клеток известны и включают, например, использование конкурирующих не меченых антител и намагничивающихся частиц или

антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами. В некоторых вариантах осуществления, намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления, селекцию на основе аффинности осуществляют посредством активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) способны осуществлять с высокой чистотой селекцию клеток, имеющих прикрепленные к ним намагниченные частицы. В некоторых вариантах осуществления, MACS работает в режиме, в котором частицы-не мишени и мишени последовательно элюируют после применения внешнего магнитного поля. То есть клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как не прикрепленные частицы элюируются. Затем, после завершения этой первой стадии элюирования, частицы, которые были захвачены магнитным полем и которые не могли быть элюированы, высвобождают некоторым образом, так что они могут быть элюированы и извлечены. В некоторых вариантах осуществления, клетки-не мишени помечены и истощены из гетерогенной популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выделение или разделение проводят с использованием системы, устройства или аппарата, которые выполняют одну или несколько стадий выделения, получения клеток, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или составления способов. В некоторых аспектах, систему используют для выполнения каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, для минимизации ошибок, манипуляций пользователя и/или загрязнения. В одном примере, системой является система, описанная в публикации международной заявки на патент № WO2009/072003 или US 20110003380.

В некоторых вариантах осуществления, система или аппарат выполняет одну или несколько, например, все стадии выделения, обработки, конструирования и составления в интегрированной или автономной системе, и/или в автоматическом или программируемом режиме. В некоторых аспектах, система или аппарат включает компьютер и/или компьютерную программу, обменивающуюся данными с системой или аппаратом, что позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или настраивать различные аспекты стадий обработки, выделения, конструирования и составления.

В некоторых аспектах, разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического разделения клеток на уровне клинического масштаба в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать встроенный микрокомпьютер, блок магнитной сепарации, перистальтический насос и различные запорные клапаны. Интегрированный компьютер, в некоторых аспектах, управляет всеми компонентами прибора и направляет систему на выполнение повторяющихся процедур в стандартной последовательности. Блок магнитной сепарации в некоторых аспектах, включает подвижный постоянный магнит и держатель для разделительной колонки. Перистальтический насос контролирует скорость потока по всему

набору трубок и вместе с запорными клапанами обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и постоянное суспендирование клеток.

Система CliniMACS в некоторых аспектах, использует сопряженные с антителами намагничиваемые частицы, которые поставляют в стерильном апирогенном растворе. В некоторых вариантах осуществления, после мечения клеток магнитными частицами клетки промывают для удаления лишних частиц. Затем пакет для получения клеток подсоединяют к набору трубок, который, в свою очередь, соединяется с пакетом, содержащим буфер, и пакетом для сбора клеток. Набор трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая предварительную колонку и разделительную колонку, и предназначен только для одноразового использования. После запуска программы разделения, система автоматически наносит образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки остаются в колонке, в то время как не меченые клетки удаляются серией промывок. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования с описанными в настоящем документе способами не мечены и не удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования с описанными в настоящем документе способами помечены и удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования с описанными в настоящем документе способами элюируют из колонки после снятия магнитного поля и собирают в пакет для сбора клеток.

В некоторых вариантах осуществления, разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в некоторых аспектах, оснащена блоком обработки клеток, который позволяет автоматически промывать и фракционировать клетки центрифугированием. Система CliniMACS Prodigy также может включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток, распознавая макроскопические слои источника клеточного продукта. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на эритроциты, белые клетки крови и слои плазмы. Система CliniMACS Prodigy может также включать интегрированную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы культивирования клеток, такие как, например, дифференциация и размножение клеток, загрузка антигена и длительное культивирование клеток. Входные порты позволяют стерильно удалять и пополнять среду, а клетки можно контролировать с помощью встроенного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82, and Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе популяцию клеток собирают и обогащают (или истощают) с помощью проточной цитометрии, в которой клетки, окрашенные на множественные маркеры клеточной поверхности, переносятся в жидком потоке. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе популяцию клеток собирают и обогащают (или истощают) с помощью сортировки с помощью (FACS)-сортинга в препаративном

масштабе. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе популяцию клеток собирают и обогащают (или истощают) с использованием чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой обнаружения на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376. В обоих случаях клетки могут быть помечены несколькими маркерами, что позволяет изолировать четко определенные подмножества Т-клеток с высокой степенью чистоты.

В некоторых вариантах осуществления, антитела или партнеры по связыванию мечены одним или несколькими определяемыми маркерами для облегчения разделения для положительной и/или отрицательной селекции. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно мечеными антителами. В некоторых примерах, разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных для одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, проводят в жидком потоке, например, с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), включая препаративную шкалу (FACS) и/или чипы микроэлектромеханических систем (МЭМС), например, в комбинации с проточно-цитометрической системой определения. Такие способы позволяют проводить положительную и отрицательную селекцию одновременно по нескольким маркерам.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения включают стадии замораживания, например криоконсервации клеток, либо до, либо после выделения, инкубации и/или конструирования. В некоторых вариантах осуществления, стадия замораживания и последующего размораживания удаляет гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты в популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки суспендируют в замораживающем растворе, например, после стадии промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. Может быть использован любой из множества известных замораживающих растворов и параметров, в некоторых аспектах. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% сывороточного альбумина человека (HSA), или других подходящих сред для замораживания клеток. Затем его разводят 1:1 средой так, чтобы конечная концентрация ДМСО и HSA составляла 10% и 4%, соответственно. Затем клетки обычно замораживают до -80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в паровой фазе резервуара для хранения с жидким азотом.

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генной инженерией. Стадии инкубации могут включать культуру, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. Инкубацию и/или конструирование можно проводить в культуральном сосуде, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, культуральная чашка, пакет или другой контейнер для культуры или культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, разработанные для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции,

для имитации воздействия антигена и/или для примирования клеток для генной инженерии, например для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

Условия могут включать одну или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, агентов, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, разработанные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия или агенты содержат один или несколько агентов, например лиганд, который способен стимулировать или активировать внутриклеточный сигнальный домен TCR комплекса. В некоторых аспектах, агент включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут включать антитела, такие как антитела, специфичные для TCR, например анти-CD3. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают один или несколько агентов, например лиганд, который способен стимулировать костимулирующий рецептор, например анти-CD28. В некоторых вариантах осуществления, такие агенты и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как гранула, и/или с одним или несколькими цитокинами. Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления анти-CD3 и/или анти-CD28-антитела в культуральную среду (например, в концентрации, по меньшей мере, примерно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие агенты содержат IL-2, IL-15 и/или IL-7. В некоторых аспектах, концентрация IL-2 составляет, по меньшей мере, примерно 10 единиц/мл.

В некоторых аспектах, инкубацию проводят в соответствии с методами, такими как описаны в патенте США № 6,040,177, Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82 и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножаются путем добавления к композиции, инициирующей культивирование, питающих клеток, таких как неделящиеся мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) (например, так, чтобы полученная популяция клеток содержала, по меньшей мере, примерно 5, 10, 20 или 40 или более питающих клеток PBMC для каждого Т-лимфоцита в исходной популяции, подлежащей размножению); и инкубирования культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения количества Т-клеток). В некоторых аспектах, неделящиеся питающие клетки могут включать гамма-облученные питающие клетки PBMC. В некоторых вариантах осуществления, PBMC облучают гамма-лучами в диапазоне от примерно 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах, питающие клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере, примерно 25 градусов Цельсия, обычно, по меньшей мере, примерно 30 градусов, и обычно

не менее 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне от примерно 6000 до 10000 рад. В некоторых аспектах, питающие клетки LCL представлены в любом подходящем количестве, таком как отношение питающих клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам, по меньшей мере, примерно 10:1.

В вариантах осуществления, антигенспецифические Т-клетки, такие как антигенспецифические Т-клетки CD4+ и/или CD8+, получают путем стимуляции наивных или антигенспецифических Т-лимфоцитов с антигеном. Например, антигенспецифические Т-клеточные линии или клоны могут быть созданы для антигенов цитомегаловируса путем выделения Т-клеток от инфицированных субъектов и стимуляции клеток in vitro тем же антигеном.

Известны различные способы введения генетически сконструированных компонентов, например, агентов для индукции генетического разрушения и/или нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные рецепторы, например CAR или TCR, и их можно использовать с представленными способами и композициями. Примеры способов включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды или рецепторы, в том числе с помощью вирусных векторов, например ретровирусных или лентивирусных, не вирусных векторов или транспозонов, например системы транспозонов *Sleeping Beauty.* Способы переноса гена могут включать трансдукцию, электропорацию или другой способ, который приводит к переносу гена в клетку, или любые способы доставки, описанные в разделе I.A настоящего документа. Другие подходы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, например, в WO2014055668 и патенте США № 7,446,190.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством электропорации (*см.,* например, Chicaybam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством транспозиции (см., например, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; и Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунные клетки включают трансфекцию фосфатом кальция (например, описанную в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York. N.Y.), слияние протопластов, трансфекцию, опосредованную катионными липосомами; бомбардировка микрочастицами, усиленными частицами вольфрама Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и копреципитация ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

В некоторых вариантах осуществления, перенос гена выполняют путем первой стимуляции клетки, например, путем комбинирования ее со стимулом, который вызывает ответ, такой как пролиферация, выживаемость и/или активация, например, при измерении

по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения.

В некоторых контекстах, может быть желательно защититься от потенциальной возможности того, что сверхэкспрессия стимулирующего фактора (например, лимфокина или цитокина) может потенциально привести к нежелательному исходу или снижению эффективности у субъекта, например, фактора, связанного с токсичностью у субъекта. Таким образом, в некоторых случаях сконструированные клетки содержат генные сегменты, которые вызывают чувствительность клеток к отрицательной селекции *in vivo,* например, при введении в адоптивной иммунотерапии. Например, в некоторых аспектах, клетки сконструированы таким образом, чтобы их можно было элиминировать в результате изменения *in vivo* состояния пациента, которому их вводят. Негативный селектируемый фенотип может быть результатом вставки гена, который придает чувствительность к вводимому агенту, например, соединению. Отрицательные селектируемые гены содержат ген тимидинкиназы типа I вируса простого герпеса (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 11:223, 1977), который придает чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантинфосфрибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT), бактериальную цитозиндезаминазу (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например Т-клетки, могут быть сконструированы либо во время, либо после размножения. Такое конструирование для введения гена желаемого полипептида или рецептора может быть проведено, например, с любым подходящим ретровирусным вектором. Затем генетически модифицированная клеточная популяция может быть освобождена от первоначального стимула (например, стимула CD3/CD28) и впоследствии стимулирована вторым типом стимула (например, через рецептор, введенный de novo). Такой второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/молекулы MHC, родственного (перекрестно-сшитого) лиганда генетически введенного рецептора (например, природного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который прямо связывается внутри рамки нового рецептора (например, через распознавание константных областей внутри рецептора). См., например, Cheadle et al, “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 или Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).

Дополнительные нуклеиновые кислоты, например, гены для введения, включают такие, которые улучшают эффективность терапии, например, способствуя жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены для обеспечения генетического маркера для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo;* гены для повышения безопасности, например, делая клетку восприимчивой к отрицательной селекции *in vivo,* как описано у Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.,* 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992);

см. также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 Lupton et al. описывающие использование бифункциональных селектируемых слитых генов, полученных в результате слияния доминантно-положительного селектируемого маркера с негативным селектируемым маркером. *См.*, например, Riddell et al., Патент США № 6,040,177, столбцы 14-17.

Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генной инженерией. Стадии инкубации могут включать культуру, культивирование, стимуляцию, активацию, размножение и/или замораживание для консервации, например криоконсервацию.

D. Композиция клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор

Также представлено множество или популяции сконструированных клеток, композиций, содержащих такие клетки и/или обогащенные такими клетками. В некоторых аспектах, представленные сконструированные клетки и/или композиция сконструированных клеток содержат любые, описанные в настоящем документе, например, содержащие модифицированный локус *TGFBR2,* содержащий трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, и/или полученные способами, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах, множество или популяция сконструированных клеток содержит любую из сконструированных клеток, описанных в настоящем документе, например, в разделе III.C в настоящем документе. В некоторых аспектах, представленные клетки и клеточная композиция могут быть сконструированы с использованием любого из способов, описанных в настоящем документе, например, с использованием агентов или способов для введения генетического разрушения, например, как описано в разделе I.A в настоящем документе, и/или с использованием полинуклеотидов, таких как матричный полинуклеотид, описанный в настоящем документе, например, в разделе I.B.2, посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). В некоторых аспектах, такая популяция клеток и/или композиции, представленные в настоящем документе, являются или содержатся в фармацевтической композиции или композиции для терапевтических применений или способов, например, как описано в разделе V настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления, представленная популяция клеток и/или композиции, содержащие сконструированные клетки, содержат популяцию клеток, которая демонстрирует более улучшенную, однородную, гомогенную и/или стабильную экспрессию и/или связывание антигена рекомбинантным рецептором, например, демонстрирует пониженный коэффициент вариации, по сравнению с экспрессией и/или связыванием антигена популяций клеток и/или композиций, созданных с использованием других способов. В некоторых вариантах осуществления, популяция клеток и/или композиции демонстрируют, по меньшей мере, на 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10% более низкий коэффициент вариации экспрессии рекомбинантного рецептора и/или связывания антигена рекомбинантным рецептором по сравнению с соответствующей популяцией, созданной с использованием других способов, например

случайной интеграции последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор. Коэффициент вариации определяют как стандартное отклонение экспрессии вызывающей интерес нуклеиновой кислоты (например, трансгенных последовательностей, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть) в популяции клеток, например CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, деленное на среднее значение экспрессии соответствующей представляющей интерес нуклеиновой кислоты в соответствующей популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция клеток и/или композиции демонстрируют коэффициент вариации ниже 0,70, 0,65, 0,60, 0,55, 0,50, 0,45, 0,40, 0,35 или 0,30 или менее при измерении среди популяций CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, которые были сконструированы с использованием представленных в настоящем документе способов.

В некоторых вариантах осуществления, представленная популяция клеток и/или композиции, содержащие сконструированные клетки, содержат популяцию клеток, которая демонстрирует минимальную или пониженную случайную интеграцию трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых аспектах, случайная интеграция трансгена в геном клетки может привести к побочным эффектам или гибели клетки из-за интеграции трансгена в нежелательную локацию в геноме, например, в жизненно важном гене или гене, критически важном для регуляции активности клетки и/или нерегулируемой или неконтролируемой экспрессии рецептора. В некоторых аспектах, случайная интеграция трансгена снижается на, по меньшей мере, или более чем на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более по сравнению с популяциями клеток, созданными с применением других способов.

В некоторых вариантах осуществления, представлены популяция клеток и/или композиции, которые содержат множество сконструированных иммунных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствует в локусе *TGFBR2,* например, путем интеграции трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор или его часть в локусе *TGFBR2* посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или более чем 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 90% клеток в композиция и/или клеток в композиции, которые содержат генетическое разрушение в локусе *TGFBR2,* содержат интеграцию трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор, или его часть в локусе *TGFBR2.*

В некоторых вариантах осуществления, представленные композиции, содержащие клетки, например, в которых клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, составляют, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более от общего количества клеток в композиции или клеток определенного типа, таких как Т-клетки или CD8+ или CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления, представленные композиции, содержащие клетки, например, в которых клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, составляют, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

или более от общего количества клеток в композиции, которые содержат генетическое разрушение в локусе *TGFBR2*.

IV. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

В настоящем документе представлены способы лечения, например, включающие введение любых сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, описанные в настоящем документе, например сконструированные клетки, содержащие модифицированный локус *TGFBR2*, содержащий трансген, кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых аспектах, также представлены способы введения любых сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, описанные в настоящем документе, субъекту, такому как субъект, который страдает заболеванием или нарушением. Сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), или композиции, содержащие их, описанные в настоящем документе, полезны при различных терапевтических, диагностических и профилактических показаниях. Например, сконструированные клетки или композиции, содержащие сконструированные клетки, полезны для лечения множества заболеваний и нарушений у субъекта. Такие способы и применения содержат терапевтические способы и применения, например, включающие введение сконструированных клеток или композиций, содержащих их, субъекту, страдающему заболеванием, состоянием или нарушением, таким как опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки или содержащие их композиции вводят в эффективном количестве для эффективного лечения заболевания или нарушения. Использование содержит использование сконструированных клеток или композиций в таких способах и лечениях, и при приготовлении лекарственного средства для осуществления таких терапевтических способов. В некоторых вариантах осуществления, способы осуществляю путем введения сконструированных клеток или композиций, содержащих их, субъекту, страдающему или подозреваемому в наличии заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, способы, таким образом, лечат заболевание, состояние или нарушение у субъекта. Также представлены терапевтические способы введения клеток и композиций субъектам, например пациентам.

Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут использоваться в связи с представленными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238, Gruenberg et al; патенте США № 4690915, Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). См., например, Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338.

Заболевание или состояние, которое лечат, может быть любым, при котором экспрессия антигена ассоциирована и/или вовлечена в этиологию болезненного состояния или нарушения, например, вызывает, обостряет или иным образом участвует в таком

заболевании, состоянии или нарушении. Типовые заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, связанные со злокачественностью или трансформацией клеток (например, рак), аутоиммунное или воспалительное заболевание или инфекционное заболевание, например, вызванное бактериальным, вирусным или другим патогеном. В настоящем документе описаны типовые антигены, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые можно лечить. В конкретных вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

Заболевания, состояния и нарушения включают опухоли, включая солидные опухоли, гематологические злокачественные новообразования и меланомы, и включают локализованные и метастатические опухоли, инфекционные заболевания, такие как заражение вирусом или другим патогеном, например HIV, HCV, HBV, CMV, HPV и паразитарные заболевания, а также аутоиммунные и воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием, нарушением или состоянием является опухоль, рак, злокачественное новообразование, новообразование или другое пролиферативное заболевание или нарушение. Такие заболевания включают, но не ограничены ими, лейкоз, лимфому, например, острый миелоидный (или миелогенный) лейкоз (AML), хронический миелоидный (или миелогенный) лейкоз (CML), острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ALL), хронический лимфолейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), мантийноклеточную лимфому (MCL), лимфому маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина (HL), неходжкинскую лимфому (NHL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), фолликулярную лимфому, рефрактерную фолликулярную лимфому, диффузную B-крупноклеточную лимфому (DLBCL) и множественную миелому (MM). В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является злокачественное образование из B-клеток, выбранное из острого лимфобластного лейкоза (ALL), ALL взрослых, хронического лимфобластного лейкоза (CLL), неходжкинской лимфомы (NHL) и диффузной B-крупноклеточной лимфомы (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является NHL, и NHL выбрана из группы, состоящей из агрессивной NHL, диффузной B-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), NOS (de novo и трансформированной из медленно растущей), первичной B-крупноклеточной лимфомы средостения (PMBCL), T-клеточной/богатой гистоцитами B-крупноклеточной лимфомы (TCHRBCL), лимфомы Беркитта, мантийноклеточной лимфомы (MCL) и/или фолликулярной лимфомы (FL), необязательно, фолликулярной лимфомы 3B степени (FL3B).

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является множественная миелома (MM). В некоторых вариантах осуществления, введение представленных клеток, например сконструированных клеток с модифицированным локусом *TGFBR2,* может привести к лечению и/или облегчению заболевания или состояния,

такого как ММ, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или подозревается в наличии ММ, которая ассоциирована с экспрессией опухолеассоциированного антигена, такого как антиген созревания В-клеток (BCMA).

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является хронический лимфолейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления, введение представленных клеток, например сконструированных клеток с модифицированным локусом *TGFBR2,* может привести к лечению и/или облегчению заболевания или состояния, такого как CLL, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или подозревается в наличии CLL, ассоциированном с экспрессией опухолеассоциированного антигена, такого как орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1).

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является солидная опухоль или рак, ассоциированный с не гематологической опухолью. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является солидная опухоль или рак, ассоциированный с солидной опухолью. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак груди, рак простаты, рак почек, гепатоцеллюлярный рак, рак легких, рак яичников, рак шейки матки, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак щитовидной железы, рак матки, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи, меланома, нейроэндокринные раки, рак ЦНС, опухоли головного мозга, рак костей или саркома мягких тканей. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является рак мочевого пузыря, легкого, головного мозга, меланома (*например,* мелкоклеточная меланома легкого), груди, шейки матки, яичников, толстой кишки, поджелудочной железы, эндометрия, пищевода, почек, печени, простаты, кожи, щитовидной железы или матки. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак груди, рак простаты, рак почек, гепатоцеллюлярный рак, рак легких, рак яичников, рак шейки матки, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак щитовидной железы, рак матки, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи, меланома, нейроэндокринный рак, рак ЦНС, опухоли головного мозга, рак костей или саркома мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления, введение представленных клеток, например сконструированных клеток с модифицированным локусом *TGFBR2,* может привести к лечению и/или облегчению заболевания или состояния, такого как NSCLC, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или подозревается в наличии NSCLC, ассоциированного с экспрессией опухолеассоциированного антигена, такого как орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1).

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC). В некоторых вариантах осуществления,

введение представленных клеток, например сконструированных клеток с модифицированным локусом *TGFBR2,* может привести к лечению и/или облегчению заболевания или состояния, такого как HNSCC, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или подозревается в наличии HNSCC, ассоциированного с экспрессией опухолеассоциированного антигена, такого как вирус папилломы человека (HPV) 16 E6 или E7. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является инфекционное заболевание или состояние, такое как, но не ограниченное ими, вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекции, иммунодефицит, цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейн-Барр (EBV), аденовирус, BK полиомавирус. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например, ревматоидный артрит (RA), диабет I типа, системная красная волчанка (SLE), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермия, аутоиммунная болезнь щитовидной железы, болезнь Грейвса, болезнь Крона, рассеянный склероз, астма и/или заболевание или состояние, ассоциированное с трансплантацией.

В некоторых вариантах осуществления, антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, является или содержит интегрин αvβ6 (интегрин avb6), антиген созревания B-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково/тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, C-C мотив хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутация рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфринB2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, Fc рецептор, подобный 5 (FCRL5; также известный как гомолог 5 Fc рецептора или FCRH5), фетальный ацетилхолиновый рецептор (фетальный AchR), фолат-связывающий белок (FBP), рецептор фолиевой кислоты альфа, ганглиозид GD2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), сопряженный с G белком рецептор класса C группы 5 член D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита B, лейкоцитарный антиген человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2), рецептор IL-22 альфа (IL-22Rα), рецептор IL-13 альфа 2 (IL-13Rα2), рецептор со встроенным киназным доменом (kdr), легкая цепь каппа, молекула клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, богатый лейцином повтор, содержащий 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), c-Met, мышиный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, естественные киллеры группы 2 член D (NKG2D), лиганды, мелан A (MART-1), молекула

адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальный антиген, преимущественно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простат-специфический антиген, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфический мембранный антиген (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобласта (TPBG, также известный как 5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), родственный тирозиназе белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), родственный тирозиназе белок 2 (TRP2, также известный как допахром-таутомераза, допахром-дельта-изомераза или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоль Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемый антиген, или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другие патогены. Антигены, таргетируемые рецепторами, в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные со злокачественными новообразованиями B-клеток, такие как любой из ряда известных маркеров B-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген является или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30.

В некоторых вариантах осуществления, антиген является или включает патоген-специфический или патоген-экспрессированный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является вирусный антиген (такой как вирусный антиген из HIV, HCV, HBV и т.д.), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием или экспрессированный в клетках окружающей среды повреждения, ассоциированного со злокачественным новообразованием B-клеток. Антигены, таргетированные рецепторами в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные со злокачественными новообразованиями B-клеток, такие как любой из ряда известных маркеров B-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антигеном, таргетированным рецептором, является CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30 или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является миелома, такая как множественная миелома. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием или экспрессированным в клетках среды повреждения, связанного с множественной миеломой. Антигены, таргетированные рецептором, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с множественной миеломой. В некоторых аспектах, антиген, например второй или дополнительный антиген, такой как специфический для заболевания антиген и/или родственный антиген, экспрессирован на множественной миеломе, такой как антиген созревания B-клеток (BCMA), сопряженный с G-белком рецептор класса C группы 5 член

D (GPRC5D), CD38 (циклическая АДФ-рибозогидролаза), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 подмножество 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI и/или FcRH5. Другие типовые антигены множественной миеломы включают CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β2-микроглобулин, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1 и рецептор активина типа IIA (ActRIIA). См. Benson and Byrd, J. Clin. Oncol. (2012) 30(16): 2013-15; Tao and Anderson, Bone Marrow Research (2011):924058; Chu et al., Leukemia (2013) 28(4):917-27; Garfall et al., Discov Med. (2014) 17(91):37-46. В некоторых вариантах осуществления, антигены включают антигены, присутствующие в лимфоидных опухолях, миеломе, СПИД-ассоциированной лимфоме и/или посттрансплантационных лимфопролиферациях, таких как CD38. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, направленные против таких антигенов, известны и включают, например, те, что описаны в патенте США № 8,153,765; 8,603477, 8,008,450; публикации США. № US20120189622 или US20100260748; и/или международной публикации PCT №№ WO2006099875, WO2009080829 или WO2012092612 или WO2014210064. В некоторых вариантах осуществления, такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, scFv) содержатся в мультиспецифических антителах, мультиспецифических химерных рецепторах, таких как мультиспецифические CAR, и/или мультиспецифических клетках.

В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение ассоциировано с экспрессией сопряженного с G-белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D) и/или экспрессией антигена созревания B-клеток (BCMA).

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является нарушение, связанное с B-клетками. В некоторых из представленных вариантов осуществления, представленных способов, заболеванием или нарушением ассоциированным с BCMA, является аутоиммунное заболевание или нарушение. В некоторых из представленных вариантов осуществления, представленных способов аутоиммунным заболеванием или нарушением является системная красная волчанка (СКВ), волчаночный нефрит, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, ANCA-ассоциированный васкулит, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP), аутоиммунная тромбоцитопения, болезнь Шагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, вульгарная пузырчатка, склеродермия, рассеянный склероз, псориаз, нефропатия IgA, полиневропатии IgM, васкулит, сахарный диабет, синдром Рейно, анти-фосфолипидный синдром, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунная гемолитическая анемия, миастения гравис или прогрессирующий гломерулонефрит.

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или нарушением является рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак, экспрессирующий GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, раком является злокачественное новообразование плазматических клеток, и злокачественным новообразованием плазматических клеток

является множественная миелома (ММ) или плазмоцитома. В некоторых вариантах осуществления, раком является множественная миелома (ММ). В некоторых вариантах осуществления, раком является рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома.

В некоторых вариантах осуществления, антиген ассоциирован с вирусом, таким как папилломавирус человека (HPV), и заболеванием или нарушением является рак, такой как HNSCC. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является ROR1, и заболеванием или нарушением является CLL. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является ROR1, и заболеванием или нарушением является NSCLC.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент (*например,* scFv или домен V_H) специфически распознает антиген, такой как CD19, BCMA, GPRC5D или ROR1. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент получен из, или является вариантом, антител или антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с CD19, BCMA, GPRC5D или ROR1.

В некоторых вариантах осуществления, клеточную терапию, например адоптивную Т-клеточную терапию, проводят путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают из субъекта, который должен получать клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах, клетки получают от субъекта, например пациента, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, клеточную терапию, например адоптивную Т-клеточную терапию, проводят путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяются и/или иным образом получают от субъекта, отличного от субъекта, который должен получить или который в конечном итоге получает клеточную терапию, например, первого субъекта. В таких вариантах осуществления, клетки затем вводят другому субъекту, например второму субъекту того же вида. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты генетически идентичны. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты генетически похожи. В некоторых вариантах осуществления, второй субъект выражает тот же класс или супертип HLA, что и первый субъект.

Клетки можно вводить любыми подходящими способами, например, болюсной инфузией, инъекцией, например внутривенными или подкожными инъекциями, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, транс-септальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъектальной инъекцией, субконъюнтивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или задней юкстасклеральной доставкой. В некоторых вариантах осуществления, их вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально и, если желательно для местного лечения, внутриочагово. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления,

данную дозу вводят однократным болюсным введением клеток. В некоторых вариантах осуществления, их вводят путем многократного болюсного введения клеток, например, в течение периода не более 3 дней, или путем непрерывного инфузионного введения клеток. В некоторых вариантах осуществления, введение клеточной дозы или любых дополнительных терапий, например противолимфоцитарной терапии, интервенционной терапии и/или комбинированной терапии, проводят амбулаторно.

Для профилактики или лечения заболевания, подходящая дозировка может зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, от того, вводятся ли клетки в профилактических или в терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни субъекта и ответа на клетки, а также на усмотрение лечащего врача. Композиции и клетки в некоторых вариантах осуществления, подходящим образом вводят субъекту за один раз или в течение ряда курсов лечения.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят как часть комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно с, в любом порядке, другим терапевтическим вмешательством, таким как антитело или сконструированная клетка, или рецептор, или агент, такой как цитотоксический или терапевтический агент. Клетки в некоторых вариантах осуществления, вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами или в связи с другим терапевтическим вмешательством одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах, клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близкой по времени, так что клеточные популяции усиливают эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят до одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят после одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных агентов включают цитокин, такой как IL-2, например, для повышения жизнестойкости. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение химиотерапевтического агента.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение химиотерапевтического агента, например кондиционирующего химиотерапевтического агента, например, для уменьшения опухолевой нагрузки перед введением.

Предварительная подготовка субъектов с помощью противоиммунных (например, противолимфомных) терапий в некоторых аспектах, может улучшить эффекты адоптивной клеточной терапии (АСТ).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, способы включают введение предкондиционирующего агента, такого как противолимфомный или химиотерапевтический агент, такой как циклофосфамид, флударабин или их комбинации, субъекту до начала клеточной терапии. Например, субъекту может быть введен прекондиционирующий агент, по меньшей мере, за 2 дня до, например, по меньшей мере,

за 3, 4, 5, 6 или 7 дней до начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят прекондиционирующий агент не более чем за 7 дней до начала, например не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дня до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъекта предварительно подготавливают циклофосфамидом в дозе от точно или примерно 20 мг/кг до 100 мг/кг, например, от точно или примерно 40 мг/кг до 80 мг/кг. В некоторых аспектах, субъекта предварительно подготавливают приблизительно 60 мг/кг циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводят один раз в день в течение одного или двух дней. В некоторых вариантах осуществления, когда противолимфомный агент содержит циклофосфамид, субъекту вводят циклофосфамид в дозе от точно или примерно 100 мг/м^2 до 500 мг/м^2, например, от точно или примерно 200 мг/м^2 до 400 мг/м^2, или от 250 мг/м^2 до 350 мг/м^2, включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 300 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 300 мг/м^2 циклофосфамида ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, где противолимфомный агент содержит флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе от точно или примерно 1 мг/м^2 до 100 мг/м^2, например, от точно или примерно 10 мг/м^2 до 75 мг/м^2, от 15 мг/м^2 до 50 мг/м^2, от 20 мг/м^2 до 40 мг/м^2 или от 24 мг/м^2 до 35 мг/м^2, включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 30 мг/м^2 флударабина. В некоторых вариантах осуществления, флударабин можно вводить в виде однократной дозы или можно вводить в виде множества доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 30 мг/м^2 флударабина ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, противолимфомный агент содержит комбинацию агентов, такую как комбинация циклофосфамида и флударабина. Таким образом, комбинация агентов может включать циклофосфамид в любой дозе или схеме введения, такой как описаны в настоящем документе, и флударабин в любой дозе или схеме введения, такой как описаны в настоящем документе. Например, в некоторых аспектах, субъекту вводят 60 мг/кг (~ 2 г/м^2) циклофосфамида и 3-5 доз 25 мг/м^2 флударабина перед первой или последующей дозой.

После введения клеток, биологическую активность сконструированных популяций клеток в некоторых вариантах осуществления, измеряют, например, любым из ряда известных способов. Параметры для оценки включают специфическое связывание

сконструированной или природной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном in vivo, например, с помощью визуализации, или ex vivo, например, с помощью ELISA или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерить с использованием любых подходящих известных способов, таких как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), и Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления, биологическую активность клеток измеряют путем анализа экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, таких как CD107a, IFNγ, IL-2 и TNF. В некоторых аспектах, биологическую активность измеряют путем оценки клинического результата, такого как уменьшение опухолевой массы или нагрузки.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки дополнительно модифицируют любым количеством способов, так что их терапевтическая или профилактическая эффективность увеличивается. Например, сконструированный CAR, экспрессируемый популяцией, может быть конъюгирован прямо или косвенно через линкер с таргетирующим фрагментом. Практика конъюгирования соединений, например CAR, с таргетирующими группами известна. См., например, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 1 1 1 (1995) и патент США 5,087,616.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят как часть комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно с, в любом порядке, другим терапевтическим вмешательством, таким как антитело или сконструированная клетка, или рецептор, или агент, такой как цитотоксический или терапевтический агент. Клетки в некоторых вариантах осуществления, вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами или в связи с другим терапевтическим вмешательством одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых случаях, клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близкой по времени, так что клеточные популяции усиливают эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят до одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят после одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных агентов включают цитокин, такой как IL-2, например, для повышения жизнестойкости.

В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток вводят субъектам в соответствии с предоставленными способами и/или предоставленными готовыми изделиями или композициями. В некоторых вариантах осуществления, размер или время введения доз определяют как функцию конкретного заболевания или состояния у субъекта. В некоторых случаях размер или время приема доз для конкретного заболевания с учетом представленного описания могут быть определены эмпирически.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток составляет от точно или

примерно 2 x 10^5 клеток/кг до точно или примерно 2 x 10^6 из клеток/кг, например, ото точно или примерно 4 x 10^5 клеток/кг до точно или примерно 1 x 10^6 клеток/кг или от точно или примерно 6 x 10^5 клеток/кг то точно или примерно до 8 x 10^5 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит не более 2 x 10^5 клеток (например, экспрессирующих антиген, таких как клетки, экспрессирующие CAR) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, не более чем точно или примерно 3×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 4×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 5×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 6×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 7×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 8×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 9×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 1 x 10^6 клеток/кг, или не более чем точно или примерно 2 x 10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или точно или примерно 2 x 10^5 клеток (например, экспрессирующих антиген, таких как клетки, экспрессирующие CAR) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, по меньшей мере, или по меньшей мере, или примерно, или примерно 3 x 10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 4 x 10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 5×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 6×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 7×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 8 x 10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 9 x 10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 1 x 10^6 клеток/кг, или, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 2 x 10^6 клеток/кг.

В некоторых вариантах осуществления, клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят субъекту в диапазоне от точно или примерно 0,1 миллиона до точно или примерно 100 миллиардов клеток и/или такого количества клеток на килограмм массы тела субъекта, *например,* от точно или примерно 0,1 миллиона до точно или примерно 50 миллиардов клеток (*например,* точно или примерно 5 миллионов клеток, точно или примерно 25 миллионов клеток, точно или примерно 500 миллионов клеток, точно или примерно 1 миллиард клеток, точно или примерно 5 миллиардов клеток, точно или примерно 20 миллиардов клеток, точно или примерно 30 миллиардов клеток, точно или примерно 40 миллиардов клеток или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеперечисленных значений), от точно или примерно 1 миллиона до точно или примерно 50 миллиардов клеток (*например,* точно или примерно 5 миллионов клеток, точно или примерно 25 миллионов клеток, точно или примерно 500 миллионов клеток, точно или примерно 1 миллиард клеток, точно или примерно 5 миллиардов клеток, точно или примерно 20 миллиардов клеток, точно или примерно 30 миллиардов клеток, точно или примерно 40 миллиардов клеток или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеперечисленных значений), например, от точно или примерно 10 миллионов до точно

или примерно 100 миллиардов клеток (*например,* точно или примерно 20 миллионов клеток, точно или примерно 30 миллионов клеток, точно или примерно 40 миллионов клеток или точно или примерно 60 миллионов клеток, точно или примерно 70 миллионов клеток, точно или примерно 80 миллионов клеток, точно или примерно 90 миллионов клеток, точно или примерно 10 миллиардов клеток, точно или примерно 25 миллиардов клеток, точно или примерно 50 миллиардов клеток, точно или примерно 75 миллиардов клеток, точно или примерно 90 миллиардов клеток или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеперечисленных значений), и, в некоторых, случаях от точно или примерно 100 миллионов клеток до точно или примерно 50 миллиардов клеток (*например,* точно или примерно 120 миллионов клеток, точно или примерно 250 миллионов клеток, точно или примерно 350 миллионов клеток, точно или примерно 650 миллионов клеток, точно или примерно 800 миллионов клеток, точно или примерно 900 миллионов клеток, точно или примерно 3 миллиарда клеток, точно или примерно 30 миллиардов клеток или точно или примерно 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими диапазонами и/или на килограмм массы тела субъекта. Дозировки могут варьироваться в зависимости от признаков, характерных для заболевания или нарушения, и/или пациента, и/или других способов лечения. В некоторых вариантах осуществления, такие значения относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; в других вариантах осуществления, они относятся к количеству Т-клеток или PBMC, или общему количеству введенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза содержит менее примерно 5 x 10^8 всего клеток, экспрессирующих рекомбинантных рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, в диапазоне от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 5×10^8 таких клеток, например, точно или примерно 2×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, $1{,}5\times10^8$ или 5×10^8 всего таких клеток или диапазон между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза содержит более чем 1 x 10^6 всего клеток, экспрессирующих рекомбинантных рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и меньше, чем точно или примерно 2 x 10^9 всего клеток, экспрессирующих рекомбинантных рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, в диапазоне от точно или примерно 2,5 x 10^7 до точно или примерно или примерно $1{,}2\times10^9$ таких клеток, например, точно или примерно 2.5×10^7, 5×10^7, 1×10^8, $1{,}5\times10^8$, 8×10^8 или $1{,}2\times10^9$ всего таких клеток, или диапазон между любыми двумя из вышеперечисленных значений.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно 1 x 10^5 до точно или примерно 5 x 10^8 всего CAR-экспрессирующих (CAR^+) Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^5 до точно или примерно $2{,}5\times10^8$ всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 1×10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 5×10^7 всего

CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^5 до точно или примерно 2,5 x 10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^5 до точно или примерно 1 x 10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^5 до точно или примерно 5 x 10^6 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^5 до точно или примерно 2,5 x 10^6 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^5 примерно до 1 x 10^6 всего CAR+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^6 до точно или примерно 5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^6 до точно или примерно 2,5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 5×10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^6 до точно или примерно 2,5 x 10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^6 или примерно 1 x 10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^6 до точно или примерно 5 x 10^6 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^6 до точно или примерно 2,5 x 10^6 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 2,5 x 10^6 до точно или примерно 5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 2,5 x 10^6 до точно или примерно 2,5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 2,5 x 10^6 до точно или примерно или примерно 1×10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно $2,5\times10^6$ до точно или примерно 5×10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно $2,5\times10^6$ до точно или примерно $2,5\times10^7$ всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 2,5 x 10^6 до точно или примерно 1 x 10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 2,5 x 10^6 до точно или примерно 5 x 10^6 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 5 x 10^6 до точно или примерно 5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 5 x 10^6 до точно или примерно 2,5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 5 x 10^6 до точно или примерно 1 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 5 x 10^6 до точно или примерно 5 x 10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 5 x 10^6 до точно или примерно 2,5 x 10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 5×10^6 до точно или примерно 1×10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1×10^7 до точно или примерно 5×10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^7 до точно или примерно 2,5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^7 до точно или примерно 1 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^7 до точно или примерно 5×10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1×10^7 до точно или примерно $2,5\times10^7$ всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно $2,5\times10^7$ до точно или примерно 5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 2,5 x 10^7 до точно или примерно 2,5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 2,5 x 10^7 до точно или примерно 1 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 2,5 x 10^7 до точно или примерно 5 x 10^7 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 5 x 10^7 до точно или примерно 5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 5 x 10^7 до точно или примерно 2,5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 5 x 10^7 до точно или примерно 1 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно 1 x 10^8 до точно или примерно 5×10^8 всего CAR+ Т-клеток, от точно или примерно 1×10^8 до точно или примерно $2,5\times10^8$ всего CAR^+ Т-клеток, от точно или примерно $2,5\times10^8$ до точно или примерно 5×10^8 всего CAR^+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от или от

примерно 2,5 x 10^7 до точно или примерно 1,5 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток, например, от или от примерно 5 x 10^7 до или до примерно 1 x 10^8 всего CAR^+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^5 CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно $2,5\times10^5$ CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно 5×10^5 CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^6 CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно $2,5\times10^6$ CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно 5×10^6 CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^7 CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно $2,5\times10^7$ CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно 5×10^7 CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^8 CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно $1,5\times10^8$ CAR^+ клеток, по меньшей мере, точно или примерно $2,5\times10^8$ CAR^+ клеток, или, по меньшей мере, точно или примерно 5×10^8 CAR^+ клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, включающей количество клеток от или от примерно 1 x 10^5 до или до примерно 5 x 10^8 всего рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), от или от примерно 5×10^5 до или до примерно 1×10^7 всего рекомбинантных рецептор-экспрессирующих клеток, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), или от или от примерно 1×10^6 до или до примерно 1 x 10^7 всего рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), все включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы клеток, содержащих количество клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1 x 10^5 общих рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, 1 x 10^6, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1 x 10^7, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1 x 10^8 таких клеток. В некоторых вариантах осуществления, число относится к общему количеству $CD3^+$ или $CD8^+$, в некоторых случаях также клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR^+). В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или от примерно 1×10^5 до или до примерно 5×10^8 $CD3^+$ или $CD8^+$ всего Т-клеток или $CD3^+$ или $CD8^+$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, от или от примерно 5×10^5 до или до примерно 1×10^7 $CD3^+$ или $CD8^+$ всего Т-клеток или $CD3^+$ или $CD8^+$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, или от или от примерно 1×10^6 до или до примерно 1×10^7 $CD3^+$ или $CD8^+$ всего Т-клеток или $CD3^+$ или $CD8^+$экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или от примерно 1×10^5 до или до примерно 5×10^8 всего $CD3^+/CAR^+$ или $CD8^+/CAR^+$ клеток, от или от примерно 5×10^5 до или до примерно 1×10^7 всего $CD3^+/CAR^+$ или $CD8^+/CAR^+$ клеток, или от или от примерно 1×10^6 до или до примерно 1×10^7 всего

$CD3^+/CAR^+$ или $CD8^+/CAR^+$ клеток, все включительно.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки в дозе содержат CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD4+ и CD8+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, например, где субъектом является человек, $CD8^+$ Т-клетки в дозе, в том числе в дозе, включающей $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки, содержат от точно или примерно 1 x 10^6 до точно или примерно 5 x 10^8 всего $CD8^+$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), например, в диапазоне от точно или примерно 5×10^6 до точно или примерно 1×10^8 таких клеток, например 1×10^7, $2,5\times10^7$, 5×10^7, $7,5\times10^7$, 1×10^8, $1,5\times10^8$ или 5×10^8 всего таких клеток, или диапазон между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любого из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит введение от или от примерно 1 x 10^7 до или до примерно 0,75 x 10^8 всего экспрессирующих рекомбинантных рецептор $CD8^+$ Т-клеток, от или от примерно 1 x 10^7 до или до примерно 5 x 10^7 всего экспрессирующих рекомбинантных рецептор $CD8^+$ Т-клеток, или от или от примерно 1 x 10^7 до или до примерно 0,25 x 10^8 всего экспрессирующих рекомбинантных рецептор $CD8^+$ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит введение точно или примерно 1×10^7, $2,5\times10^7$, 5×10^7, $7,5\times10^7$, 1×10^8, $1,5\times10^8$, $2,5\times10^8$ или 5×10^8 всего экспрессирующих рекомбинантных рецептор $CD8^+$ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток, например, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в виде разовой дозы или вводят только один раз в течение двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, 1 года или больше.

В контексте адоптивной клеточной терапии введение данной «дозы» охватывает введение данного количества или числа клеток в виде единой композиции и/или однократное непрерывное введение, например, в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии, а также охватывает введение данного количества или числа клеток в виде дробной дозы или множества композиций, представленных в виде множества отдельных композиций или инфузий, в течение определенного периода времени, например, в течение не более 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах, дозой является однократное или непрерывное введение определенного количества клеток, данное или начатое в один момент времени. Однако, в некоторых случаях, дозу вводят в виде множественных инъекций или инфузий в течение периода не более трех дней, например, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или в виде множественных инфузий в течение однодневного периода.

Таким образом, в некоторых аспектах, клетки дозы вводят в единой фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы вводят во множестве композиций, вместе содержащих клетки дозы.

В некоторых вариантах осуществления, термин «разделенная доза» относится к

дозе, разделенной таким образом, чтобы вводить ее в течение более одного дня. Этот тип дозирования охватывается настоящими способами и считается разовой дозой.

Таким образом, доза клеток может быть введена в виде разделенной дозы, например разделенной дозы, вводимой с течением времени. Например, в некоторых вариантах осуществления, доза может вводиться субъекту в течение 2 или 3 дней. Типовые способы раздельного дозирования включают введение 25% дозы в первый день и введение оставшихся 75% дозы во второй день. В других вариантах осуществления, 33% дозы можно вводить в первый день, а оставшиеся 67% во второй день. В некоторых аспектах, 10% дозы вводят в первый день, 30% дозы вводят во второй день и 60% дозы вводят на третий день. В некоторых вариантах осуществления, разделенную дозу не распределяют более чем на 3 дня.

В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы можно вводить путем введения множества композиций или растворов, таких как первая и вторая, необязательно несколько, каждая из которых содержит некоторое количество клеток в дозе. В некоторых аспектах, множество композиций, каждая из которых содержит разные популяции и/или подтипы клеток, вводят отдельно или независимо, необязательно, в течение определенного периода времени. Например, популяции или подтипы клеток могут включать $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, соответственно, и/или CD8+ - и CD4+- обогащенные популяции, соответственно, например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, каждая индивидуально включающая клетки, генетически сконструированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу CD8+ Т-клеток или дозу CD4+ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую из дозы CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, введение композиции или дозы, например введение множества клеточных композиций, включает введение клеточных композиций по отдельности. В некоторых аспектах, отдельные введения выполняют одновременно или последовательно в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления, доза включает первую композицию и вторую композицию, и первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от точно или примерно 0 до точно или примерно 12 часов или от точно или примерно 0 до точно или примерно 6 часов или от точно или примерно 0 до точно или примерно 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более чем точно или примерно 2 часа, не более чем точно или примерно 1 час или не более чем точно или примерно 30 минут, не более чем точно или примерно 15 минут, не более чем точно или примерно 10 минут или не более чем точно или примерно 5 минут. В некоторых вариантах осуществления, начало и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более чем точно или примерно 2 часа, не более чем точно или примерно 1 час, или не более чем точно или примерно 30 минут, не более чем точно или примерно 15 минут, не более чем точно или примерно 10 минут или не более чем точно или примерно 5 минут.

В некоторых композициях, первая композиция, например первая композиция дозы, содержит CD4+ Т-клетки. В некоторых композициях, первая композиция, например первая композиция дозы, содержит CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, первую композицию вводят перед второй композицией.

В некоторых вариантах осуществления, доза или композиция клеток содержит определенное или целевое соотношение CD4+ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, к CD8+ клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор, и/или CD4+ клеток к CD8+ клеткам, это соотношение необязательно составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, например, приблизительно 1:1. В некоторых аспектах, введение композиции или дозы с целевым или желаемым соотношением различных популяций клеток (например, соотношением CD4+:CD8+ или соотношением CAR+CD4+:CAR+CD8+, например, 1:1) включает введение клеточной композиции, содержащей одну из популяций, и затем введение отдельной клеточной композиции, содержащей другую из популяций, где введение осуществляют в или приблизительно в целевом или желаемом соотношении. В некоторых аспектах, введение дозы или композиции клеток в определенном соотношении приводит к улучшенному размножению, жизнеспособности и/или противоопухолевой активности Т-клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект получает несколько доз, например две или несколько доз или несколько последовательных доз клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления, субъект получает последовательную дозу, например, вторую дозу вводят приблизительно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, несколько последовательных доз вводят после первой дозы, так что дополнительную дозу или дозы вводят после введения последовательной дозы. В некоторых аспектах, количество клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, является таким же или аналогичным первой дозе и/или последовательной дозе. В некоторых вариантах осуществления, дополнительная доза или дозы больше, чем предыдущие дозы.

В некоторых аспектах, размер первой и/или последовательной дозы определяется на основе одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предыдущее лечение, например химиотерапию, болезненная нагрузка у субъекта, такая как опухолевая нагрузка, объем, размер, или степень, размер или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических результатов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

В некоторых аспектах, время между введением первой дозы и введением последовательной дозы составляет от примерно 9 до примерно 35 дней, от примерно 14 до примерно 28 дней или от 15 до 27 дней. В некоторых вариантах осуществления, введение последовательной дозы происходит в момент времени более чем примерно через 14 дней

после и менее чем примерно через 28 дней после введения первой дозы. В некоторых аспектах, время между первой и последующей дозой составляет примерно 21 день. В некоторых вариантах осуществления, дополнительная доза или дозы, например, последовательные дозы, вводят после введения последовательной дозы. В некоторых аспектах, дополнительную последовательную дозу или дозы вводят, по меньшей мере, примерно через 14 и менее чем примерно через 28 дней после введения предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную дозу вводят менее чем примерно через 14 дней после предыдущей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 дней после предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления, никакую дозу не вводится менее чем через 14 дней после предыдущей дозы и/или никакую дозу не вводят более чем через 28 дней после предыдущей дозы.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, например клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, содержит две дозы (например, двойную дозу), включающую первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, причем одна или обе из первой дозы и второй дозы содержат введение разделенной дозы Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток обычно достаточно велика, чтобы быть эффективной для снижения болезненной нагрузки.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в желаемой дозировке, которая в некоторых аспектах, содержит желаемую дозу или количество клеток или типы клеток и/или желаемое соотношение типов клеток. Таким образом, дозировка клеток в некоторых вариантах осуществления, основана на общем количестве клеток (или количестве на кг массы тела) и желаемом соотношении отдельных популяций или подтипов, таком как соотношение CD4+ к CD8+. В некоторых вариантах осуществления, дозировка клеток основана на желаемом общем количестве (или количестве на кг массы тела) клеток в отдельных популяциях или отдельных типов клеток. В некоторых вариантах осуществления, дозировка основана на сочетании таких характеристик, как желаемое общее количество клеток, желаемое соотношение и желаемое общее количество клеток в отдельных популяциях.

В некоторых вариантах осуществления, популяции или подтипы клеток, таких как $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, вводят при или в пределах допустимой разницы от желаемой дозы от общего количества клеток, такой как желаемая доза Т-клеток. В некоторых аспектах, желаемой дозой является желаемое количество клеток или желаемое количество клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клетки/кг. В некоторых аспектах, желаемая доза составляет точно или выше минимального количества клеток или минимальное количество клеток на единицу массы тела. В некоторых аспектах, среди всех клеток, вводимых в желаемой дозе, отдельные популяции или подтипы присутствуют при или близко к желаемому выходному соотношению (например, соотношению $CD4^+$ к $CD8^+$), например, в пределах определенной переносимой разницы или погрешности такого соотношения.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят при или в пределах

допустимой разницы от желаемой дозы одной или нескольких отдельных популяций или подтипов клеток, такой как желаемая доза клеток CD4+ и/или желаемая доза клеток CD8+. В некоторых аспектах, желаемой дозой является желаемое количество клеток подтипа или популяции или желаемое количество таких клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клетки/кг. В некоторых аспектах, желаемая доза равна или превышает минимальное количество клеток популяции или подтипа или минимальное количество клеток популяции или подтипа на единицу массы тела.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозировка основана на желаемой фиксированной дозе всех клеток и желаемом соотношении и/или на основе желаемой фиксированной дозы одного или нескольких, например, каждого из отдельных подтипов или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозировка основана на желаемой фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и желаемом соотношении $CD4^+$ к $CD8^+$ клеток и/или основана на желаемой фиксированной или минимальной дозе $CD4^+$ и/или $CD8^+$ клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в пределах или в пределах допустимого диапазона желаемого выходного соотношения множества популяций или подтипов клеток, таких как CD4+ и CD8+ клетки или подтипы. В некоторых аспектах, желаемое соотношение может быть конкретным соотношением или может быть диапазоном соотношений, например, в некоторых вариантах осуществления, желаемое соотношение (например, соотношение $CD4^+$ к $CD8^+$ клеткам) составляет от точно или примерно 5:1 до точно или примерно 5:1 (или больше чем примерно 1:5 и меньше чем примерно 5:1), или от точно или примерно 1:3 до точно или примерно 3:1 (или больше чем примерно 1:3 и меньше чем примерно 3:1), например, от точно или примерно 2:1 до точно или примерно 1:5 (или больше чем примерно 1:5 и меньше чем примерно 2:1, например, примерно 5:1 или примерно 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В некоторых аспектах, допустимая разница находится в пределах примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50% от желаемого соотношения, включая любое значение между этими диапазонами.

В конкретных вариантах осуществления, количество и/или концентрации клеток относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В других вариантах осуществления, количество и/или концентрации клеток относятся к количеству или концентрации всех введенных клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

В некоторых аспектах, размер дозы определяется на основе одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предыдущее лечение, например химиотерапию, болезненная нагрузка у субъекта, такая как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, распространенность или тип метастаз, стадия и/или вероятность или частота

развития у субъекта токсических результатов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответ хозяина против введенных клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления, способы также включают введение одной или нескольких дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и/или противолимфомной терапии, и/или повторяют одну или несколько стадий способов. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько дополнительных доз являются такими же, как начальная доза. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько дополнительных доз отличаются от начальной дозы, например, выше, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или более, выше начальной дозы, или ниже, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более, ниже начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления, введение одной или нескольких дополнительных доз определяется на основе ответа субъекта на начальное лечение или любое предыдущее лечение, болезненной нагрузки у субъекта, например, опухолевой нагрузки, объема, размера или степени, распространенности или типа метастаз, стадии и/или вероятности или частоты развития токсических результатов у субъекта, например CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток.

V. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СОСТАВ

Также представлены композиции, такие как фармацевтические композиции и составы для введения, например, для адоптивной клеточной терапии. В некоторых аспектах, фармацевтические композиции содержат любые сконструированные клетки или композиции, содержащие сконструированные клетки, описанные в настоящем документе, например, содержащие модифицированный локус *TGFBR2,* содержащий трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный или химерный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, содержащая представленные сконструированные клетки, например, содержащая модифицированный локус *TGFBR2,* содержащий трансгенную последовательность, кодирующую рецептор рекомбинантного антигена или его часть, например CAR, представлена в виде композиции или состава, такого как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции можно использовать в соответствии с представленными способами и/или с представленными готовыми изделиями или композициями, например, для профилактики или лечения заболеваний, состояний и нарушений, или в способах обнаружения, диагностики и прогнозирования.

Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы позволить биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента быть эффективной, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет введен состав.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличному от активного ингредиента, который не токсичен для

субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель содержит, но не ограничен ими, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или агентом и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах, используют смесь двух или нескольких консервантов. Консервант или его смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% от веса всей композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничены ими: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

В композиции включены буферные агенты в некоторых аспектах. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах, используют смесь двух или нескольких буферных агентов. Буферный агент или его смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% от веса всей композиции. Способы получения фармацевтических композиций для введения известны. Типовые способы описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

Состав или композиция также может содержать более одного активного ингредиента, полезного для конкретного показания, заболевания или состояния, которое предотвращается или лечится клетками или агентами, когда соответствующие активности не влияют негативно друг на друга. Такие активные ингредиенты обычно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно содержит другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как

химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д. В некоторых вариантах осуществления, агенты или клетки вводят в форме соли, например фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из минеральных кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например п-толуолсульфоновая кислота.

Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления, содержит агенты или клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическая или профилактическая эффективность, в некоторых вариантах осуществления, отслеживается путем периодической оценки леченных субъектов. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть полезны и другие режимы дозирования, которые могут быть определены. Желаемая доза может быть доставлена однократным болюсным введением композиции, многократным болюсным введением композиции или непрерывным инфузионным введением композиции.

Агенты или клетки можно вводить любыми подходящими способами, например, болюсной инфузией, инъекцией, например, внутривенной или подкожной инъекцией, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, транссептальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъектальной инъекцией, субконъюнтивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или задней юкстасклеральной доставкой. В некоторых вариантах осуществления, их вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально и, если желательно для местного лечения, внутриочагово. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, данную доза вводится путем однократного болюсного введения клеток или агента. В некоторых вариантах осуществления, ее вводят путем многократного болюсного введения клеток или агента, например, в течение периода не более 3 дней, или путем непрерывного инфузионного введения клеток или агента.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая дозировка может зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, типа агента или агентов, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, того, вводится ли агент или клетки с профилактическими или терапевтическими целями, предыдущей терапии, истории

болезни субъекта и реакции на агент или клетки, а также на усмотрение лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления, композиции вводят субъекту за один раз или в течение серии курсов лечения.

Клетки или агенты можно вводить с использованием стандартных способов введения, составов и/или устройств. Представлены составы и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. Что касается клеток, введение может быть аутологичным или гетерологичным. В некоторых аспектах, клетки выделяют от субъекта, конструируют и вводят тому же субъекту. В других аспектах, их выделяют от одного субъекта, конструируют и вводят другому субъекту. Например, иммунореактивные клетки или предшественники могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммунореактивные клетки, полученные из периферической крови, или их потомство (например, полученные in vivo, ex vivo или in vitro) можно вводить локальной инъекцией, включая катетерное введение, системную инъекцию, локальную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированную иммунореактивную клетку или агент, который лечит или облегчает симптомы нейротоксичности), ее обычно составляют в виде стандартной дозированной формы для инъекций (раствор, суспензия, эмульсия).

Составы включают составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального введения или введения суппозитория. В некоторых вариантах осуществления, агент или популяции клеток вводят парентерально. Используемый в настоящем документе термин «парентерально» включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления, агент или популяции клеток вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

Композиции, в некоторых вариантах осуществления, представлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые, в некоторых аспектах, могут быть забуференными до выбранного значения pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно путем инъекции. С другой стороны, вязкие композиции могут быть составлены в соответствующем диапазоне вязкости для обеспечения более длительных периодов контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут быть растворителем или диспергирующей средой, содержащей, например, воду, солевой раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения

агента или клеток в растворитель, например, в смеси с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза или подобные.

Составы, используемые для введения in vivo, обычно стерильны. Стерильность может быть легко достигнута, например, фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны.

VI. НАБОРЫ И ГОТОВЫЕ ИЗДЕЛИЯ

Также представлены изделия, системы, аппараты и наборы, полезные при выполнении представленных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления, представленные готовые изделия или наборы содержат один или несколько компонентов одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение, и/или матричные полинуклеотиды, например матричные полинуклеотиды, содержащие трансгенные последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы можно использовать в способах конструирования Т-клеток для экспрессии рекомбинантного рецептора и/или других молекул, как описано в настоящем документе, например, для создания сконструированных клеток, содержащих модифицированный локус *TGFBR2,* содержащий кодирующий трансген рекомбинантный рецептор или его часть.

В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы содержат полипептиды, нуклеиновые кислоты, векторы и/или полинуклеотиды, полезные при выполнении представленных способов. В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы содержат один или несколько агентов, способных вызывать генетические нарушения, например, в локусе *TGFBR2* (например, описанных в разделе I.A настоящего документа). В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы содержат одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, *например,* плазмиду или фрагмент ДНК, которые кодируют один или несколько компонентов одного или нескольких агентов, способных вызывать генетические нарушения и/или содержат матричные полинуклеотиды, например, для использования для таргетирования трансгенных последовательностей в клетку посредством HDR, например, описанных в разделе I.B.2 настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы, представленные в настоящем документе, содержат контрольные векторы.

В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы, представленные в настоящем документе, содержат один или несколько агентов, при этом каждый из одного или нескольких агентов независимо способен индуцировать генетическое разрушение сайта-мишени в локусе *TGFBR2;* и матричный полинуклеотид, содержащий трансген, кодирующий рекомбинантный рецептор или его часть, где трансген таргетирован для интеграции в сайт-мишень или рядом с ним посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). В некоторых аспектах, в настоящем документе описаны один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение. В некоторых

аспектах, одним или несколькими агентами являются комплекс рибонуклеопротеина (RNP), содержащий комплекс Cas9/нРНК. В некоторых аспектах, нРНК, включенная в RNP, направлена на сайт-мишень в локусе *TGFBR2,* такой как любой сайт-мишень, описанный в настоящем документе. В некоторых аспектах, матричным полинуклеотидом является любой из описанных в настоящем документе матричных полинуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы содержат один или несколько контейнеров, обычно множество контейнеров, упаковочный материал и этикетку или вкладыш в упаковку на контейнере или контейнерах и/или упаковке или связанные с ними, обычно включающий инструкции по применению, *например,* инструкции по вводу компонентов в клетки для конструирования.

Представленные в настоящем документе готовые изделия содержат упаковочные материалы. Упаковочные материалы для использования в упаковке представленных материалов хорошо известны. См., например, патенты США №№ 5,323,907, 5,052,558 и 5,033,252, каждый из которых полностью включен в настоящий документ. Примеры упаковочных материалов включают, но не ограничены ими, блистерные упаковки, бутылки, пробирки, ингаляторы, насосы, пакеты, флаконы, контейнеры, шприцы, одноразовые лабораторные принадлежности, *например,* наконечники для пипеток и/или пластиковые тарелки или бутылки. Готовые изделия или наборы могут включать устройство для облегчения дозирования материалов или для облегчения использования с высокой производительностью или в крупном масштабе, *например,* для облегчения использования в роботизированном оборудовании. Обычно упаковка не вступает в реакцию с содержащимися в ней композициями.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение, и/или матричные полинуклеотиды упакованы отдельно. В некоторых вариантах осуществления, каждый контейнер может иметь одно отделение. В некоторых вариантах осуществления, другие компоненты готовых изделий или наборов упакованы отдельно или вместе в одном отделении.

Также предоставлены готовые изделия, системы, устройства и наборы, полезные для введения представленных клеток и/или клеточных композиций, например, для использования в терапии или лечении. В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы, представленные в настоящем документе, содержат Т-клетки и/или композиции Т-клеток, такие как любые Т-клетки и/или композиции Т-клеток, описанные в настоящем документе. В некоторых аспектах, готовые изделия или наборы, представленные в настоящем документе, могут использоваться для введения Т-клеток или композиций Т-клеток и могут включать инструкции по применению.

В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы, представленные в настоящем документе, содержат Т-клетки и/или композиции Т-клеток, такие как любые Т-клетки и/или композиции Т-клеток, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки и/или композиции Т-клеток любых модифицированных Т-клеток используют способы скрининга, описанные в настоящем

документе. В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия или наборы, представленные в настоящем документе, содержат контрольные или не модифицированные Т-клетки и/или композиции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, готовое изделие или наборы содержат одну или несколько инструкций по введению сконструированных клеток и/или клеточных композиций для терапии.

Готовые изделия и/или наборы, содержащие клетки или клеточные композиции для терапии, могут включать контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку на контейнере или связанный с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с растворами для ВВ введения и т. д. Контейнеры могут быть получены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер в некоторых вариантах осуществления, содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией, эффективна для лечения, профилактики и/или диагностики состояния. В некоторых вариантах осуществления, контейнер имеет стерильное отверстие для доступа. Типовые контейнеры включают пакеты с раствором для внутривенного введения, флаконы, в том числе с пробками, прокалываемыми иглой для инъекции, или бутылки или флаконы для перорально вводимых агентов. Этикетка или листок-вкладыш могут указывать на то, что композиция используется для лечения заболевания или состояния. Готовое изделие может включать (a) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор; и (b) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит второй агент. В некоторых вариантах осуществления, готовое изделие может включать (a) первый контейнер с первой композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит подтип сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и (b) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит другой подтип сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. Готовое изделие может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, указывающий, что композиции можно использовать для лечения определенного состояния. Альтернативно или дополнительно, готовое изделие может дополнительно включать другой или такой же контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. Оно может дополнительно содержать другие материалы, такие как другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и/или шприцы.

VII. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все термины в данной области техники, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится заявленный объект изобретения. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для облегчения ссылки, и включение таких определений в настоящий документ не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимается в данной области техники.

Используемые в настоящем документе формы единственного числа включают в себя множественное число, если контекст явно не диктует иное. Например, «a» или «an» означает «по меньшей мере, один» или «один или несколько». Понятно, что аспекты и варианты, описанные в настоящем документе, включают в себя «состоящие» и/или «состоящие по существу из» аспектов и вариаций.

Во всем описании, различные аспекты заявленного объекта изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона дано просто для удобства и краткости и не должно толковаться как жесткое ограничение объема заявленного объекта изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, если представлен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим заявленным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне охватывается заявленным объектом изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны, а также включены в заявленный объект изобретения с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон содержит один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в заявленный объект изобретения. Это применимо независимо от широты диапазона.

Используемый в настоящем документе термин «примерно» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, который общеизвестен. Ссылка на «примерное» значение или параметр в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковые. Например, описание, относящееся к «примерно X», включает описание «X». В некоторых вариантах осуществления, «примерно» может относиться к ±25%, ±20%, ±15%, ±10%, ±5% или ±1%.

В настоящем документе, указание того, что положения нуклеотидов или аминокислот «соответствуют» положениям нуклеотидов или аминокислот в описанной последовательности, такой как указана в списке последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот, идентифицированным при выравнивании с описанной последовательностью, чтобы максимизировать идентичность с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. При выравнивании последовательностей можно идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве ориентиров. Как правило, для идентификации соответствующих положений, последовательности аминокислот выравнивают таким образом, чтобы получить соответствие наивысшего порядка (см., например: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M.,

and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).

Используемый в настоящем документе термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «векторами экспрессии». Векторы включают вирусные векторы, такие как ретровирусные, например гаммаретровирусные и лентивирусные векторы.

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева содержат «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые содержат первичную трансформированную клетку и потомство, полученное от нее, независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным родительской клетке по содержанию нуклеиновых кислот, но может содержать мутации. В настоящий документ включены мутантные потомки, которые обладают той же функцией или биологической активностью, что и проверенные или отобранные в первоначально трансформированной клетке.

В настоящем контексте утверждение о том, что клетка или популяция клеток является «положительной» по конкретному маркеру, относится к обнаруживаемому присутствию в клетке или в клетке конкретного маркера, обычно поверхностного маркера. Что касается, поверхностного маркера, этот термин относится к наличию поверхностной экспрессии, обнаруживаемой с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, при этом окрашивание обнаруживается с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем окрашивание, обнаруживаемое при выполнении той же процедуры с контролем, подобранным по изотипу, в других идентичных условиях и/или на уровне, по существу аналогичном уровню для клетки, которая, как известно, является положительной по маркеру, и/или на уровне, существенно более высоком чем для клетки, заведомо отрицательной по маркеру.

В настоящем контексте утверждение, что клетка или популяция клеток является «отрицательной» по конкретному маркеру, относится к отсутствию существенного определяемого присутствия на клетке или в клетке конкретного маркера, обычно поверхностного маркера. Что касается поверхностного маркера, этот термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, обнаруженной с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером,

и обнаружения указанного антитела, при этом окрашивание не обнаруживается с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем обнаруженное окрашивание, при выполнении той же процедуры с контролем, подобранным по изотипу, в других идентичных условиях, и/или на уровне, существенно более низком, чем уровень для клетки, которая, как известно, является положительной по маркеру, и/или на уровне по существу аналогичном таковому для клетки, заведомо негативной по маркеру.

В контексте настоящего описания, «доля (%) идентичности аминокислотной последовательности» и «доля идентичности» при использовании по отношению к аминокислотной последовательности (эталонной полипептидной последовательности) определяется как доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности (например, рассматриваемом антителе или фрагменте), которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимальной доли идентичности последовательностей, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для определения доли идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными известными способами, в некоторых вариантах осуществления, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Могут быть определены соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления, «функционально связанный» может включать ассоциацию компонентов, таких как последовательность ДНК, например, гетерологичная нуклеиновая кислота) и регуляторная последовательность, таким образом, чтобы разрешить экспрессию гена, когда соответствующие молекулы (например, белки-активаторы транскрипции) связаны с регуляторной последовательностью. Следовательно, это означает, что описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать по назначению.

Аминокислотная замена может включать замену одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Замена может быть консервативной аминокислотной заменой или не консервативной аминокислотной заменой. Аминокислотные замены могут быть введены в связывающую молекулу, например антитело, представляющее интерес, и продукты, подвергнутые скринингу на желаемую активность, *например,* сохраненное/улучшенное связывание антигена, пониженную иммуногенность или улучшенную ADCC или CDC.

Аминокислоты обычно можно сгруппировать в соответствии со следующими общими свойствами боковой цепи:

(1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислые: Asp, Glu;

(4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

В некоторых вариантах осуществления, консервативные замены могут включать замену члена одного из этих классов другим членом того же класса. В некоторых вариантах осуществления, не консервативные аминокислотные замены могут включать замену члена одного из этих классов на другой класс.

Используемый в настоящем документе термин «композиция» относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водная, не водная или любая их комбинация.

В настоящем контексте «субъектом» является млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно является человек.

VIII. ТИПОВЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Предоставленные варианты осуществления включают:

1. Генетически сконструированная Т-клетка, содержащая модифицированный локус рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2)*, где указанный модифицированный локус *TGFBR2* содержит трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть.

2. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления, 1, в которой трансгенная последовательность интегрирована в эндогенный локус *TGFBR2,* необязательно посредством репарации, направляемой гомологией (HDR).

3. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления, 1 или варианту осуществления, 2, где модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует функциональный полипептид TGFBRII.

4. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления, 1-3, в которой модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полипептид TGFBRII или экспрессия полипептида TGFBRII исключена.

5. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-3, где модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полноразмерный полипептид TGFBRII или кодирует частичный полипептид TGFBRII.

6. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-3 и 5, где модифицированный локус *TGFBR2* кодирует доминантно-негативный полипептид TGFBRII.

7. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-3, 5 и 6, где кодированный полипептид TGFBRII содержит аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью,

соответствующей остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60 или их фрагменту.

8. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-3 и 5-7, где трансгенная последовательность находится внутри рамки с одним или несколькими экзонами открытой рамки считывания или ее частичной последовательностью эндогенного локуса *TGFBR2*.

9. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-8, где трансгенная последовательность расположена ниже экзона 1 и выше экзона 6 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*.

10. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-9, где трансгенная последовательность расположена ниже экзона 4 и выше экзона 6 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*.

11. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-10, где рекомбинантный рецептор является или содержит рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR).

12. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-11, где рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, и трансгенная последовательность кодирует TCR альфа цепь (TCRα), TCR бета цепь (TCRβ) или обе цепи.

13. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-10, где рекомбинантный рецептор является или содержит функциональный антигенный рецептор, не относящийся к Т-клеточному рецептору (не TCR).

14. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-10 и 13, где рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

15. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 14, где CAR содержит внеклеточную область, трансмембранный домен и внутриклеточную область.

16. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 15, где внеклеточная область содержит связывающий домен.

17. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 16, где связывающий домен является или содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

18. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 16 и варианту осуществления 17, где связывающий домен способен связываться с антигеном-мишенью, который связан, специфичен или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния.

19. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 18, где антигеном-мишенью является опухолевый антиген.

20. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 18 или варианту осуществления 19, где антиген-мишень выбран из интегрина αvβ6 (avb6 интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22Rα), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13Rα2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана A (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемого антигена, или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

21. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов

осуществления 15-20, где внеклеточная область содержит спейсер, необязательно, где спейсер функционально связан между связывающим доменом и трансмембранным доменом.

22. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 21, где спейсер содержит шарнирную область иммуноглобулина.

23. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 21 или варианту осуществления 22, где спейсер содержит область C_H2 и область C_H3.

24. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 15-23, где внутриклеточная область содержит внутриклеточный сигнальный домен.

25. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 24, где внутриклеточный сигнальный домен является или содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3 цепи, необязательно CD3-дзета цепи (CD3ζ) или ее сигнальную часть.

26. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 24 или варианту осуществления 25, где внутриклеточная область содержит один или несколько костимулирующих сигнальных доменов.

27. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 26, в которой один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть.

28. Химерный антигенный рецептор по варианту осуществления 26 или варианту осуществления 27, где костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

29. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 16-28, где модифицированный локус *TGFBR2* кодирует рекомбинантный рецептор, который содержит, от своего N- до С-конца в следующем порядке: внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область.

30. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-10 и 13-29, где

трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих внеклеточный связывающий домен, необязательно, scFv; спейсер, необязательно содержащий последовательность из шарнира иммуноглобулина человека, необязательно из IgG1, IgG2 или IgG4 или их модифицированной версии, необязательно дополнительно включающий область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, необязательно из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, необязательно из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, необязательно CD3ζ цепь или ее часть; и/или

модифицированный локус *TGFBR2* содержит по порядку: последовательность нуклеотидов, кодирующую внеклеточный связывающий домен, необязательно scFv; спейсер, необязательно содержащий последовательность из шарнира иммуноглобулина

человека, необязательно из IgG1, IgG2 или IgG4 или их модифицированной версии, необязательно дополнительно включающий область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, необязательно из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, необязательно из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, необязательно CD3ζ цепь или ее часть.

31. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 14-30, где CAR является мультицепочечный CAR.

32. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-30, где трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих, по меньшей мере, один дополнительный белок.

33. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-32, где трансгенная последовательность содержит один или несколько мультицистронных элементов.

34. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 33, где один или несколько мультицистронных элементов расположены между последовательностью нуклеотидов, кодирующих CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей, по меньшей мере, один дополнительный белок.

35. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 32-34, где, по меньшей мере, одним дополнительным белком является суррогатный маркер, необязательно, где суррогатным маркером является усеченный рецептор, необязательно, где усеченный рецептор лишен внутриклеточного сигнального домена и/или не способен опосредовать внутриклеточную передачу сигналов при связывании своим лигандом.

36. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 33, где рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, и мультицистронный элемент расположен между последовательностью нуклеотидов, кодирующих TCRα, и последовательностью нуклеотидов, кодирующих TCRβ.

37. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 33, где рекомбинантным рецептором является мультицепочечный CAR, и мультицистронный элемент расположен между последовательностью нуклеотидов, кодирующих одну цепь мультицепочечного CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующих другую цепь мультицепочечного CAR.

38. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 33-37, где один или несколько мультицистронных элементов расположены выше последовательности нуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор.

39. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 33-38, где один или несколько мультицистронных элементов являются или содержат последовательность проскока рибосомы, необязательно где последовательностью проскока рибосомы является элемент T2A, P2A, E2A или F2A.

40. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов

осуществления 1-39, где модифицированный локус *TGFBR2* содержит промотор и/или регуляторный или контрольный элемент эндогенного локуса *TGFBR2,* функционально связанный для контроля экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор.

41. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-39, где модифицированный локус содержит один или несколько гетерологичных регуляторных или контрольных элементов, функционально связанных с контрольной экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор.

42. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 41, где один или несколько гетерологичных регуляторных или контрольных элементов содержат гетерологичный промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусную последовательность Козака, последовательность акцептора сплайсинга или последовательность донора сплайсинга.

43. Генетически сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 42, где гетерологичный промотор является или содержит промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α) или промотор MND, или его вариант.

44. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-44, где Т-клеткой является первичная Т-клетка, полученная от субъекта, необязательно, где субъектом является человек.

45. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-44, где Т-клеткой является CD8+ Т-клетка или ее подтипы.

46. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-44, где Т-клеткой является CD4+ Т-клетка или ее подтипы.

47. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-46, где Т-клетка получена из мультипотентной или плюрипотентной клетки, которая необязательно является iPSC.

48. Полинуклеотид, содержащий:

(a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть; и

(b) одно или несколько плеч гомологии, связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, где одно или несколько плеч гомологии содержат последовательность, гомологичную одной или нескольким областям открытой рамки считывания локуса трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2).*

49. Полинуклеотид по варианту осуществления 48, где рекомбинантный рецептор или его часть кодируется модифицированным локусом *TGFBR2,* содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, когда рекомбинантный рецептор экспрессируется из клетки, введенной с полинуклеотидом.

50. Полинуклеотид по варианту осуществления 48 или варианту осуществления 49,

отличающийся тем, что последовательностью нуклеиновой кислоты в (a) является последовательность, которая является экзогенной или гетерологичной по отношению к открытой рамке считывания эндогенного геномного локуса *TGFBR2* Т-клетки, необязательно, Т-клетки человека.

51. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-50, где одно или несколько плеч гомологии содержат, по меньшей мере, один интрон или, по меньшей мере, один экзон открытой рамки считывания локуса *TGFBR2*.

52. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-51, где модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует функциональный полипептид TGFBRII, в клетке, введенной с полинуклеотидом.

53. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-52, где модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полипептид TGFBRII или экспрессия полипептида TGFBRII элиминирована в клетке, введенной с полинуклеотидом.

54. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-52, где модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полноразмерный полипептид TGFBRII или кодирует частичный полипептид TGFBRII в клетке, введенной с полинуклеотидом.

55. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-52 и 54, где модифицированный локус *TGFBR2* кодирует доминантно-негативный полипептид TGFBRII в клетке, введенной с полинуклеотидом.

56. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-52, 54 и 55, где кодированный полипептид TGFBRII в клетке, введенной полинуклеотидом, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60 или последовательность, которая имеет не менее 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60 или их фрагменту.

57. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-52 и 54-56, где последовательность нуклеиновой кислоты в (a) находится внутри рамки с одним или несколькими экзонами открытой рамки считывания локуса *TGFBR2,* содержащегося в одном или нескольких плечах гомологии.

58. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-57, где одной или несколькими областями открытой рамки считывания являются или содержат последовательности, расположенные ниже экзона 1 открытой рамки считывания эндогенного локуса *TGFBR2*.

59. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-58, где одна или несколько областей открытой рамки считывания являются или содержат последовательности, которые содержат, по меньшей мере, часть экзона 4 или ниже экзона 4 открытой рамки считывания локуса *TGFBR2*.

60. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-59, где одно или

несколько плеч гомологии содержит 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии.

61. Полинуклеотид по варианту осуществления 60, где полинуклеотид имеет структуру [5' плечо гомологии]-[последовательность нуклеиновой кислоты (a)]-[3' плечо гомологии].

62. Полинуклеотид по варианту осуществления 60 или варианту осуществления 61, где 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину от точно или примерно 50 до точно или примерно 2000 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 200 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 750 нуклеотидов или от точно или примерно 750 до точно или примерно 1000 нуклеотидов.

63. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 60-62, где 5' плечо гомологии и 3' плечо независимо имеют длину примерно 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 нуклеотидов или любое значение между любым из вышеперечисленных.

64. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 60-63, где 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо больше, чем точно или примерно 300 нуклеотидов в длину, необязательно, где 5' плечо гомологии и 3' плечо независимо имеют точно или примерно 400, 500 или 600 нуклеотидов в длину, или любое значение между любыми из вышеперечисленных.

65. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 60-64, где 5’ плечо гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 69-71, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%., 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности SEQ ID NO: 69-71 или ее частичной последовательности.

66. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 60-65, где 3' плечо гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 72, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности

SEQ ID NO: 72 или ее частичной последовательности.

67. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-66, где кодированный рекомбинантный рецептор является или содержит рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR).

68. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-67, где кодированным рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, и последовательность нуклеиновой кислоты в (a) кодирует TCR альфа цепь (TCRα), TCR бета цепь (TCRβ) или обе цепи.

69. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-66, где кодированный рекомбинантный рецептор является или содержит функциональный антигенный рецептор, не относящийся к Т-клеточному рецептору (не TCR).

70. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-66 и 69, где кодированным рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

71. Полинуклеотид по варианту осуществления 70, где CAR содержит внеклеточную область, трансмембранный домен и внутриклеточную область.

72. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 71, где внеклеточная область содержит связывающий домен.

73. Полинуклеотид по варианту осуществления 72, где связывающий домен является или содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

74. Полинуклеотид по варианту осуществления 72 и варианту осуществления 73, где связывающий домен способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован, специфичен или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния.

75. Полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 74, где антигеном-мишенью является опухолевый антиген.

76. Полинуклеотид по варианту осуществления 74 или варианту осуществления 75, где антиген-мишень выбран из αvβ6 интегрина (avb6 интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2),

ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22Rα), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13Rα2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана A (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемого антигена, или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

77. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 71-76, где внеклеточная область содержит спейсер, необязательно где спейсер функционально связан между связывающим доменом и трансмембранным доменом.

78. Полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 77, где спейсер содержит шарнирную область иммуноглобулина.

79. Полинуклеотид по варианту осуществления 77 или варианту осуществления 78, где спейсер содержит область C_H2 и область C_H3.

80. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 71-79, где внутриклеточная область содержит внутриклеточный сигнальный домен.

81. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 71-80, где внутриклеточный сигнальный домен является или содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3 цепи, необязательно CD3-дзета цепи (CD3ζ) или ее сигнальную часть.

82. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 71-81, где внутриклеточная область содержит один или несколько доменов костимулирующей передачи сигнала.

83. Полинуклеотид по варианту осуществления 82, где один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть.

84. Полинуклеотид по варианту осуществления 82 или варианту осуществления 83, где костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

85. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 72-84, где модифицированный локус *TGFBR2* кодирует рекомбинантный рецептор, который содержит от своего N- до С-конца в следующем порядке: внеклеточный связывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область.

86. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-66 и 68-85, где

трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих внеклеточный связывающий домен, необязательно scFv; спейсер, необязательно содержащий последовательность из шарнира иммуноглобулина человека, необязательно из IgG1, IgG2 или IgG4 или их модифицированной версии, необязательно дополнительно включающий область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, необязательно из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, необязательно из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, необязательно CD3ζ цепь или ее часть.

87. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 70-86, где CAR является мультицепочечный CAR.

88. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-87, где последовательность нуклеиновой кислоты в (a) содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих, по меньшей мере, один дополнительный белок.

89. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-88, где последовательность нуклеиновой кислоты в (a) содержит один или несколько мультицистронных элементов.

90. Полинуклеотид по варианту осуществления 89, где один или несколько мультицистронных элементов расположены между последовательностью нуклеотидов, кодирующих CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующих, по меньшей мере, один дополнительный белок.

91. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 88-90, где, по меньшей мере, одним дополнительным белком является суррогатный маркер, необязательно, где суррогатным маркером является усеченный рецептор, необязательно, где усеченный рецептор лишен внутриклеточного сигнального домена и/или не способен опосредовать внутриклеточная передача сигналов при связывании с его лигандом.

92. Полинуклеотид по варианту осуществления 89, где рекомбинантным рецептором является рекомбинантный TCR, и мультицистронный элемент расположен между последовательностью нуклеотидов, кодирующих TCRα, и последовательностью нуклеотидов, кодирующих TCRβ.

93. Полинуклеотид по варианту осуществления 89, где рекомбинантным рецептором является мультицепочечный CAR, и мультицистронный элемент расположен между последовательностью нуклеотидов, кодирующих одну цепь мультицепочечного CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей другую цепь мультицепочечного CAR.

94. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 89-93, где один или несколько мультицистронных элементов расположены выше последовательности нуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор.

95. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 89-94, где один или несколько мультицистронных элементов являются или содержат последовательность проскока рибосомы, необязательно где последовательностью проскока рибосомы является элемент T2A, P2A, E2A или F2A.

96. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-95, где последовательность нуклеиновой кислоты по (a) содержит один или несколько гетерологичных или регуляторных контрольных элементов, функционально связанных с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора при экспрессии из клетки, введенной с полинуклеотидом.

97. Полинуклеотид по варианту осуществления 96, где один или несколько гетерологичных регуляторных или контрольных элементов содержат гетерологичный промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусную последовательность Козака, последовательность акцептора сплайсинга и/или последовательность донора сплайсинга.

98. Полинуклеотид по варианту осуществления, 97, где гетерологичный промотор является или содержит промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α) или промотор MND, или его вариант.

99. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-98, где полинуклеотид содержится в вирусном векторе.

100. Полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 99, где вирусным вектором является вектор AAV.

101. Полинуклеотид по варианту осуществления 100, где вектор AAV выбран из вектора AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 или AAV8.

102. Полинуклеотид по варианту осуществления 100 или варианту осуществления 101, где вектором AAV является вектор AAV2 или AAV6.

103. Полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 99, где вирусным вектором является ретровирусный вектор, необязательно лентивирусный вектор.

104. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-98, который является линейным полинуклеотидом, необязательно двухцепочечным полинуклеотидом или одноцепочечным полинуклеотидом.

105. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-104, где полинуклеотид имеет длину, по меньшей мере, точно или примерно 2500, 2750, 3000, 3250, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4760, 5000, 5250, 5500, 5750, 6000, 7000, 7500, 8000, 9000 или

10000 нуклеотидов или любое значение между любыми из вышеперечисленных.

106. Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-105, где полинуклеотид имеет длину от точно или примерно 2500 до точно или примерно 5000 нуклеотидов, от точно или примерно 3500 до точно или примерно 4500 нуклеотидов, или от точно или примерно 3750 нуклеотидов до точно или примерно 4250 нуклеотидов.

107. Способ получения генетически сконструированной Т-клетки, включающий введение полинуклеотида по любому из вариантов осуществления 48-106 в Т-клетку, содержащую генетическое разрушение в локусе *TGFBR2.*

108. Способ получения генетически сконструированной Т-клетки, включающий:

(a) введение в Т-клетку одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в эндогенном локусе *TGFBR2* Т-клетки; и

(b) введение полинуклеотида по любому из вариантов осуществления 48-106 в Т-клетку, содержащую генетическое разрушение в локусе *TGFBR2,* где способ дает модифицированный локус *TGFBR2,* где указанный модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или их часть.

109. Способ по варианту осуществления 108, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть, интегрирована в эндогенный локус *TGFBR2* посредством репарации, направляемой гомологией (HDR).

110. Способ получения генетически сконструированной Т-клетки, включающий введение в Т-клетку полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, где указанная Т-клетка имеет генетическое разрушение в локусе *TGFBR2* Т клетки, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть, интегрирована в эндогенный локус *TGFBR2* посредством репарации, направляемой гомологией (HDR).

111. Способ по варианту осуществления 107 или варианту осуществления 110, где генетическое разрушение осуществляется путем введения в Т-клетку одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в эндогенном локусе *TGFBR2* Т-клетки.

112. Способ по любому из вариантов осуществления 107-111, где способ дает модифицированный локус *TGFBR2,* где указанный модифицированный локус *TGFBR2* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть.

113. Способ по любому из вариантов осуществления 110-112, где полинуклеотид дополнительно содержит одно или несколько плеч гомологии, связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, где одно или несколько плеч гомологии содержат последовательность, гомологичную одной или нескольким областям открытой рамки считывания локуса рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (*TGFBR2).*

114. Способ по любому из вариантов осуществления 110-113, где модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует функциональный полипептид TGFBRII в клетке, созданной данным способом.

115. Способ по любому из вариантов осуществления 110-114, где модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полипептид TGFBRII или экспрессия полипептида TGFBRII элиминирована в клетке, созданной данным способом.

116. Способ по любому из вариантов осуществления 110-114, где модифицированный локус *TGFBR2* не кодирует полноразмерный полипептид TGFBRII или кодирует частичный полипептид TGFBRII в клетке, созданной данным способом.

117. Способ по любому из вариантов осуществления 110-114 и 116, где модифицированный локус *TGFBR2* кодирует доминантно-негативный полипептид TGFBRII в клетке, созданной данным способом.

118. Способ по любому из вариантов осуществления 113-117, где одно или несколько плеч гомологии содержит 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии.

119. Способ по варианту осуществления 118, где полинуклеотид имеет структуру [5' плечо гомологии]-[последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть]-[3' плечо гомологии].

120. Способ по варианту осуществления 118 или варианту осуществления 119, где 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину от точно или примерно 50 до точно или примерно 2000 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 100 до точно или примерно 200 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 200 до точно или примерно 300 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 300 до точно или примерно 400 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 750 нуклеотидов, от точно или примерно 400 до точно или примерно 600 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 1000 нуклеотидов, от точно или примерно 600 до точно или примерно 750 нуклеотидов или от точно или примерно 750 до точно или примерно 1000 нуклеотидов.

121. Способ по любому из вариантов осуществления 118-120, где плечо 5’ гомологии и плечо 3' гомологии независимо имеют длину точно или примерно 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 нуклеотидов или любое значение между любым из вышеперечисленных.

122. Способ по любому из вариантов осуществления 118-121, где 5' плечо гомологии

и 3' плечо гомологии независимо имеют длину больше точно или примерно 300 нуклеотидов, необязательно где 5' плечо гомологии и 3' плечо независимо имеют длину точно или примерно 400, 500 или 600 нуклеотидов, или любое значение между любыми из вышеперечисленных.

123. Способ по любому из вариантов осуществления 118-122, где 5’ плечо гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 69-71, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%., 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 69-71 или ее частичной последовательностью.

124. Способ по любому из вариантов осуществления 118-123, где плечо 3'-гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 72, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72 или ее частичной последовательностью.

125. Способ по любому из вариантов осуществления 110-124, где кодированный рекомбинантный рецептор является или содержит рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR).

126. Способ по любому из вариантов осуществления 110-124, где кодированным рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

127. Способ по любому из вариантов осуществления 108 и 111-126, где один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение, содержат ДНК-связывающий белок или ДНК-связывающую нуклеиновую кислоту, которая специфически связывается с сайтом-мишенью или гибридизуется с ним, слитый белок, содержащий ДНК-таргетирующий белок и нуклеазу, или РНК-управляемую нуклеазу, необязательно где один или несколько агентов содержат цинк-пальцевую нуклеазу (ZFN), TAL-эффекторную нуклеазу (TALEN) или и комбинацию CRISPR-Cas9, которая специфически связывается, распознает или гибридизуется с сайтом-мишенью.

128. Способ по любому из вариантов осуществления 108 и 111-127, где каждый из одного или нескольких агентов содержит направляющую РНК (нРНК), имеющую таргетирующий домен, который комплементарен, по меньшей мере, одному сайту-мишени.

129. Способ по варианту осуществления 128, где один или несколько агентов вводят в виде комплекса рибонуклеопротеина (RNP), содержащего нРНК и белок Cas9.

130. Способ по варианту осуществления 129, где RNP вводят посредством электропорации, генной пушки, трансфекции фосфатом кальция, сжатия или сдавливания клеток, необязательно, посредством электропорации.

131. Способ по варианту осуществления 129 или варианту осуществления 130, где концентрация RNP составляет от точно или примерно 1 мкМ до точно или примерно 5 мкМ, необязательно, где концентрация RNP составляет точно или примерно 2 мкМ.

132. Способ по любому из вариантов осуществления 128-131, где нРНК имеет последовательность таргетирующего домена GUGGAUGACCUGGCUAACAG (SEQ ID

NO: 73).

133. Способ по любому из вариантов осуществления 107-132, где Т-клеткой является первичная Т-клетка, полученная от субъекта, необязательно, где субъектом является человек.

134. Способ по любому из вариантов осуществления 107-133, где Т-клеткой является CD8+ Т-клетка или ее подтипы.

135. Способ по любому из вариантов осуществления 107-133, где Т-клеткой является CD4+ Т-клетка или ее подтипы.

136. Способ по любому из вариантов осуществления 107-135, где Т-клетка получена из мультипотентной или плюрипотентной клетки, которая необязательно является iPSC.

137. Способ по любому из вариантов осуществления 110-136, где полинуклеотид содержится в вирусном векторе.

138. Способ по варианту осуществления 137, где вирусным вектором является вектор AAV.

139. Способ по варианту осуществления 138, где вектор AAV выбран из вектора AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 или AAV8.

140. Способ по варианту осуществления 138 или варианту осуществления 139, где вектором AAV является вектор AAV2 или AAV6.

141. Способ по варианту осуществления 137, где вирусным вектором является ретровирусный вектор, необязательно лентивирусный вектор.

142. Способ по любому из вариантов осуществления 110-136, где полинуклеотидом является линейный полинуклеотид, необязательно двухцепочечный полинуклеотид или одноцепочечный полинуклеотид.

143. Способ по любому из вариантов осуществления 108 и 111-142, где один или несколько агентов и полинуклеотид вводят одновременно или последовательно в любом порядке.

144. Способ по любому из вариантов осуществления 108 и 111-143, где полинуклеотид вводят после введения одного или нескольких агентов.

145. Способ по варианту осуществления 144, отличающийся тем, что полинуклеотид вводят сразу после или в течение примерно 30 секунд, 1 минуты, 2 минут, 3 минут, 4 минут, 5 минут, 6 минут, 6 минут, 8 минут, 9 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 30 минут, 40 минут, 50 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часов, 3 часов или 4 часов после введения агента.

146. Способ по любому из вариантов осуществления 108 и 111-141, где перед введением одного или нескольких агентов способ включает инкубацию клеток *in vitro* со стимулирующими агентами в условиях для стимуляции или активации одной или нескольких иммунных клеток.

147. Способ по варианту осуществления 146, где стимулирующие агенты содержат и анти-CD3 и/или анти-CD28 антитела, необязательно гранулы анти-CD3/анти-CD28, необязательно где соотношение гранул к клеткам составляет или составляет примерно 1:1.

148. Способ по варианту осуществления 146 или варианту осуществления 147,

включающий удаление стимулирующих агентов из одной или нескольких иммунных клеток до введения с одним или несколькими агентами.

149. Способ по любому из вариантов осуществления 108 и 111-148, где способ дополнительно включает инкубацию клеток до, во время или после введения одного или нескольких агентов и/или введения матричного полинуклеотида с одним или несколькими рекомбинантными цитокинами, необязательно, где один или несколько рекомбинантных цитокинов выбраны из группы, состоящей из IL-2, IL-7 и IL-15.

150. Способ по варианту осуществления 149, где один или несколько рекомбинантных цитокинов добавляют в концентрации, выбранной из концентрации IL-2 от точно или примерно 10 Ед/мл до точно или примерно 200 Ед/мл, необязательно, от точно примерно 50 МЕ/мл до точно или примерно 100 Ед/мл; IL-7 в концентрации от 0,5 нг/мл до 50 нг/мл, необязательно от точно или примерно 5 нг/мл до точно или примерно 10 нг/мл, и/или IL-15 в концентрации от 0,1 нг/мл до 20 нг./мл, необязательно от точно или примерно 0,5 нг/мл до точно или примерно 5 нг/мл.

151. Способ по варианту осуществления 149 или варианту осуществления 150, где инкубацию проводят после введения одного или нескольких агентов и введения матричного полинуклеотида в течение вплоть до или приблизительно 24 часов, 36 часов, 48 часов, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 дня, необязательно, вплоть до или примерно 7 дней.

152. Способ по любому из вариантов осуществления 107-151, где, по меньшей мере, или более 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 90% клеток во множестве сконструированных клеток, генерируемых данным способом, содержат генетическое разрушение, по меньшей мере, одного сайта-мишени в локусе *TGFBR2*.

153. Способ по любому из вариантов осуществления 107-152, где, по меньшей мере, или более 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 90% клеток во множестве сконструированных клеток, полученных данным способом, экспрессируют рекомбинантный рецептор или его антигенсвязывающий фрагмент.

154. Сконструированные Т-клетки или множество сконструированных Т-клеток, созданные с использованием способа по любому из вариантов осуществления 107-153.

155. Композиция, содержащая сконструированные Т-клетки по любому из вариантов осуществления 1-47 и 154.

156. Композиция, содержащая множество сконструированных Т-клеток по любому из вариантов осуществления 1-47 и 154.

157. Композиция по варианту осуществления 155 или варианту осуществления 156, где композиция содержит CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

158. Композиция по любому из вариантов осуществления 155-157, где композиция содержит CD4+ и CD8+ Т-клетки, и отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам составляет от или от примерно 1:3 до 3:1, необязательно, 1:1.

159. Композиция по любому из вариантов осуществления 155-158, где клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, составляют, по меньшей мере, 30%, 40%,

50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более от общего количества клеток в композиции или от общего количества клеток CD4+ или CD8+ в композиции.

160. Способ лечения, включающий введение сконструированной клетки, множества сконструированных клеток или композиции по любому из вариантов осуществления 1-47 и 154-159 субъекту, страдающему заболеванием или нарушением.

161. Использование сконструированной клетки, множества сконструированных клеток или композиции по любому из вариантов осуществления 1-47 и 154-159 для лечения заболевания или нарушения.

162. Использование сконструированной клетки, множества сконструированных клеток или композиции по любому из вариантов осуществления 1-47 и 154-159 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения.

163. Сконструированная клетка, множество сконструированных клеток или композиция по любому из вариантов осуществления 1-47 и 154-159 для использования при лечении заболевания или нарушения.

164. Способ, применение или сконструированная клетка, множество сконструированных клеток или композиция для использования по любому из вариантов осуществления 160-163, где заболеванием или нарушением является рак или опухоль.

165. Способ, применение или сконструированная клетка, множество сконструированных клеток или композиция для использования в соответствии с вариантом осуществления 164, где раком или опухолью является гематологическое злокачественное новообразование, необязательно лимфома, лейкоз или злокачественное новообразование плазматических клеток.

166. Способ, применение или сконструированная клетка, множество сконструированных клеток или композиция для использования по варианту осуществления 164 или варианту осуществления 165, где раком является лимфома, и лимфомой является лимфома Беркитта, неходжкинская лимфома (NHL), лимфома Ходжкина, макроглобулинемия Вальденстрема, фолликулярная лимфома, мелкоклеточная лимфома с нерасщепленными ядрами, лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфома маргинальной зоны, лимфома селезенки, узловая моноцитоидная B-клеточная лимфома, иммунобластная лимфома, крупноклеточная лимфома, диффузная смешанная клеточная лимфома, легочная B-клеточная ангиоцентрическая лимфома, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, первичная медиастинальная B-клеточная лимфома, лимфоплазмацитартная лимфома (LPL) или мантийноклеточная лимфома (MCL).

167. Способ, применение или сконструированная клетка, множество сконструированных клеток или композиция для применения по варианту осуществления 164 или варианту осуществления 165, где раком является лейкоз, и лейкозом является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), плазмоклеточный лейкоз или острый лимфоцитарный лейкоз (ALL).

168. Способ, применение или сконструированная клетка, множество

сконструированных клеток или композиция для использования по варианту осуществления 164 или варианту осуществления 165, где раком является злокачественное новообразование плазматических клеток, и злокачественным новообразованием плазматических клеток является множественная миелома (ММ).

169. Способ, применение или сконструированная клетка, множество сконструированных клеток или композиция для использования в соответствии с вариантом осуществления 164, где опухолью является солидная опухоль.

170. Способ, использование или сконструированная клетка, множество сконструированных клеток или композиция для использования в соответствии с вариантом осуществления 169, где солидной опухолью является немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC).

171. Набор, включающий:

один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в локусе *TGFBR2;* и

полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 48-106.

172. Набор, включающий:

один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в локусе *TGFBR2;* и

полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, где трансген, кодирующий рекомбинантный рецептор или его антигенсвязывающий фрагмент или его цепь, направлен для интеграции в сайт-мишень или рядом с ним посредством репарации, направляемой гомологией (HDR); и

инструкции по осуществлению способа в соответствии с любым из вариантов осуществления 107-153.

IX. ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1 Получение и оценка in vivo сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) с нокаутированным (KO) или доминантно-негативным (DN) рецептором трансформирующего ростового фактора бета 2 (*TGFBR2*)

Т-клетки человека конструируют для экспрессии типового химерного антигенного рецептора (CAR), который специфически связывает антиген, ассоциированный с опухолью, а также модифицируют путем генетического разрушения до нокаута (KO) локуса рецептора 2 трансформирующего фактора роста (*TGFBR2)* или путем экспрессии доминантно-негативного рецептора трансформирующего фактора роста бета II (DN-TGFBRII). DN-TGFBRII, в котором отсутствует протеинкиназный домен рецептора, используют в качестве альтернативного способа для вмешательства в передачу сигналов TGF бета (TGFβ), поскольку экспрессия DN-TGFBRII конкурирует с TGFBRII дикого типа за связывание

TGFβ и формирует нефункциональный рецепторный комплекс. Сконструированные Т-клетки вводят в модель опухоли мыши с опухолевыми клетками, экспрессирующими антиген, и отслеживают противоопухолевую активность.

A. Создание *TGFBR2* KO и DN Т-клеток, экспрессирующих типовой CAR

Первичные CD4+ и CD8+ Т-клетки человека выделяют селекцией на основе иммуноаффинности из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека, полученных от здоровых доноров. Полученные клетки CD4+ и CD8+ (в соотношении 1:1) стимулируют культивированием с анти-CD3/анти-CD28 реагентом.

Готовят лентивирусные препараты для трансдукции стимулированных клеток. Типовой лентивирусный вектор для трансдукции химерного антигенного рецептора (CAR) содержит последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие типовой анти-ROR1 CAR, содержащий антигенсвязывающий домен scFv, полученный из вариабельной тяжелой и легкой цепи химерного антитела IgG1 кролика/человека, обозначенного R12 (см., *например,* Yang *et al.* (2011) *PloS ONE*, 6:e21018; патентная заявка США № US 2013/0251642). Кодированный CAR также содержит спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, костимулирующую область и сигнальный домен CD3ζ. Для трансдукции DN-TGFBRII с CAR, лентивирусная конструкция, содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие зрелую форму доминантно-негативной последовательности TGFBRII, соответствующие остаткам 22-191 последовательности *TGFBR2,* указанной в SEQ ID NO: 59), отделенные от последовательностей, кодирующих анти-ROR1 CAR, последовательностью, кодирующей элемент проскока рибосомы T2A. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR (LV) или CAR и DN-TGFBRII (LV+DN), включают в типовой лентивирусный вектор, полученный из HIV-1. Частицы псевдотипированного лентивирусного вектора получаю стандартными методами, путем временной трансфекции клеток HEK-293T полученными векторами, хелперными плазмидами (содержащими плазмиды *gagpol* и плазмиду *rev)* и псевдотипирующей плазмидой, и используют для трансдукции клеток.

Через 24 часа клетки трансдуцируют лентивирусными препаратами или ложно трансдуцируют в качестве контроля (имитация). Для клеток, трансдуцированных лентивирусным препаратом, кодирующим анти-ROR1 (R12) CAR (не содержащий DN-TGFBRII), также сконструируют клетки для нокаута эндогенного локуса *TGFBR2* (LV+KO). Анти-CD3/анти-CD28 реагент удаляют через 72 часа после стимуляции, и стимулированные клетки подвергают электропорации с 2,2 мкМ комплексов рибонуклеопротеина (RNP), содержащих нРНК, таргетирующую TGFBR2 (содержащую последовательность GUGGAUGACCUGGCUAACAG (SEQ ID NO: 73), которая таргетируют генетическое разрушение в экзоне 4 последовательности эндогенного *TGFBR2* (нумерация экзонов основана на изоформе 1, как указано в **таблице 1** в настоящем документе) и *Streptococcus pyogenes* Cas9, для нокаута эндогенного гена *TGFBR2* (LV+KO или контроль с имитацией KO), или электропорации без каких-либо комплексов RNP (только LV или LV+DN). Электропорированные клетки культивируют в течение

приблизительно 7 дней перед криоконсервацией. Клетки, трансдуцированные лентивирусом, кодирующим R12 CAR, электропорированные без RNP (LV), и ложно обработанные клетки, электропорированные с RNP (имитация KO), оценивают как контрольные.

B. Оценка противоопухолевой активности in vivo

Противоопухолевые эффекты типовых сконструированных CAR-экспрессирующих первичных Т-клеток человека с нокаутом *TGFBR2* или экспрессирующих DN-TGFBRII оценивают путем мониторинга опухолей после адоптивного переноса клеток в модель ксенотрансплантата мыши с опухолью. Каждой из мышей NOD.Cg.Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) вводят подкожной инъекцией приблизительно 5 x 10^6 клеток немелкоклеточного рака легкого H1975. На 24 день после приживления опухоли, измеряют объем опухоли. Перед введением Т-клеток, экспрессирующих CAR, средний объем опухоли составляет приблизительно 190 мм^3 с диапазоном от 83 до 302 мм^3.

Восемь (8) мышей в каждой группе получают одну внутривенную (в.в.) инъекцию одной из сконструированных композиций первичных Т-клеток, полученных от одного из двух независимых доноров-людей (донор 1, донор 2), следующим образом: (1) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 посредством лентивирусной доставки (только LV), (2) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 посредством лентивирусной доставки и нокаута *TGFBR2* (LV+KO), или (3) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 и DN-TGFBRII лентивирусной доставкой (LV+DN). Каждую из различных групп сконструированных Т-клеток вводят в дозе 1 x 10^6 клеток (низкая доза) или 3 x 10^6 клеток (высокая доза). В качестве контроля, мышам вводят 3 x 10^6 ложно обработанных клеток (имитация KO) или оставляют без обработки (только опухоль). Выживаемость без опухоли и объем опухоли оценивают в течение приблизительно 120 дней.

Противоопухолевую активность адоптивно перенесенных анти-ROR1 CAR+ Т-клеток отслеживают путем определения объема опухоли каждые 3-6 дней после введения. Как показано на **фиг. 1A** и **1C** (группа; донор 1 и 2, соответственно) и **фиг. 1B** и **1D** (отдельные мыши; доноры 1 и 2, соответственно), введение клеток, экспрессирующих анти-ROR1 CAR с нокаутом гена *TGFBR2* (KO), привело к большему уменьшению объема опухоли по сравнению с введением сконструированных Т-клеток, экспрессирующих те же анти-ROR1 CAR без нокаута (LV) или с экспрессией доминантно-негативной формы TGFBRII (DN). Оценивают уровень экспрессии CD103, интегрина, связывающего E-кадгерин, индуцированного TGFβ, и обнаруживают, что он был выше в сконструированных клетках, экспрессирующих анти-ROR1 CAR, и уровни эндогенного TGFBRII, по сравнению с клетками, сконструированными для экспрессии анти-ROR1 CAR и KO для *TGFBR2* или экспрессии DN-TGFBRII.

Как показано на **фиг. 2A** и **2B** (донор 1 и 2, соответственно), введение клеток, экспрессирующих анти-ROR1CAR, которые были KO для *TGFBR2,* или экспрессирующих DN-TGFBRII, приводит к повышению выживаемости без опухоли по сравнению с мышами,

которым вводят Т-клетки, сконструированные только для экспрессии анти-ROR1 CAR, хотя наблюдается вариабельность от донора к донору. Введение сконструированных Т-клеток, экспрессирующих клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR, которые были KO для *TGFBR2,* в обоих испытанных дозах, как низких, так и высоких, приводит к наибольшей выживаемости без опухоли в этих исследованиях. Введение сконструированных Т-клеток, экспрессирующих анти-ROR1 CAR и DN-TGFBRII, приводит к улучшенному уменьшению объема опухоли и выживаемости без опухоли по сравнению с введением сконструированных Т-клеток, экспрессирующих только анти-ROR1 CAR.

Результаты согласуются с наблюдением, что ингибирование опосредованного TGFβ иммунного подавления, либо путем нокаута гена *TGFBR2,* либо путем экспрессии доминантно-негативного (DN) TGFBRII в сконструированных Т-клетках, экспрессирующих типовой химерный антигенный рецептор (CAR), приводит к улучшенной противоопухолевой активности и улучшенной выживаемости мышей, которым вводят такие клетки.

Пример 2. Оценка размножения, инфильтрации опухоли и противоопухолевой активности CAR-экспрессирующих Т-клеток с KO или DN *TGFBR2*

Оценивают размножение, инфильтрация опухоли и противоопухолевая активность (на основе анализа сфероидов) типовых CAR-экспрессирующих клеток, в которых передача сигналов TGFβ ингибируется либо нокаутом гена *TGFBR2,* либо экспрессией доминантно-негативного (DN) TGFBRII.

Мышам NSG пересаживают клетки H1975, как описано в Примере 1.B выше. На 24 день после приживления опухоли, пять (5) мышей в каждой группе получают однократную внутривенную (в.в.) инъекцию 1 x 10^6 клеток, сконструированных первичных Т-клеток человека, экспрессирующих следующим образом: (1) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 с помощью лентивирусной доставки (LV), (2) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 с помощью лентивирусной доставки и нокаута *TGFBR2* (KO), или (3) сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 и DN-TGFBRII с помощью лентивирусной доставки (DN) в дозе 1×10^6 клеток, где сконструированные клетки во всех группах подвергнуты электропорации.

Объем опухоли контролируют до четырнадцати (14) дней после введения сконструированных клеток. На 14 день после введения сконструированных клеток образцы опухоли, селезенки и крови собирают и оценивают с помощью проточной цитометрии. Выделенные лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL) из образцов опухоли, подвергают анализу киллинга сфероидов для определения противоопухолевой активности.

A. Объем опухоли

Фиг. 3A (группа) и **3B** (индивидуумы) показывают изменение объема опухоли в течение первых 14 дней после введения сконструированных Т-клеток до сбора образцов опухоли, селезенки и крови. Как показано, введение клеток, экспрессирующих анти-ROR1 CAR с нокаутом гена *TGFBR2* (KO), приводит к большему уменьшению объема опухоли по

сравнению с введением сконструированных Т-клеток, экспрессирующих тот же анти-ROR1 CAR без нокаута (LV) или с экспрессией доминантно-негативной формы TGFBRII (DN), что соответствует результатам, описанным в Примере 1.

B. Размножение in vivo CAR-экспрессирующих Т-клеток и инфильтрация опухоли

Как показано на **фиг. 4A** (кровь) и **4B** (селезенка), частота CAR-экспрессирующих CD4+ и CD8+ Т-клеток в крови или селезенке была наивысшей у мышей, которым вводят сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 с *TGFBR2* KO (KO) по сравнению с другими группами. Как показано на **фиг. 4C** (нижняя панель), частота инфильтрации CD8+ CAR-экспрессирующих клеток в опухоль была выше у мышей, которым вводят сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 с *TGFBR2* KO (KO), по сравнению с другими группами. Средняя частота CD4+ CAR-экспрессирующих клеток, инфильтрирующих опухоль, была сходной между мышами, которым вводят клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12 с *TGFBR2* KO (KO), и мышами, которым вводят клетки, экспрессирующие тот же анти-ROR1 CAR с экспрессией доминантно-негативной формы TGFBRII. (DN) и были выше, чем средняя частота у мышей, которым вводят только анти-ROR1 CAR R12 (LV) (**фиг. 4C,** верхняя панель). Среди сконструированных клеток, инфильтрирующих опухоль, средняя доля CD103+CD8+ CAR-экспрессирующих Т-клеток была ниже в сконструированных клетках с *TGFBR2* KO по сравнению с другими группами (**фиг. 4D,** нижняя панель)**,** в то время как средняя доля CD103+CD4+ клеток была аналогичной у мышей, которым вводят анти-ROR1 CAR R12 с *TGFBR2* KO (KO), и мышей, которым вводят тот же анти-ROR1 CAR с экспрессией доминантно-негативной формы TGFBRII (DN) (**фиг. 4D,** верхняя панель).

C. Противоопухолевая активность сфероидным анализом

Противоопухолевую активность оценивают в анализе на киллинг сфероидов, в котором выделенные инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) из образцов опухоли мышей, которым вводят сконструированные Т-клетки, как описано выше, инкубируют с опухолевыми сфероидами H1975 при соотношении эффектора к мишени 1:5 в присутствии низкого уровня TGFβ в среде, содержащей сыворотку. Клетки опухолевых сфероидов H1975 метят красным флуоресцентным красителем для обеспечения возможности отслеживания лизиса опухолевых клеток (с использованием системы IncuCyte® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience), и инкубацию проводят в присутствии реагента зеленой флуоресцентной каспазы 3/7 для отслеживания апоптоза (с использованием системы реагентов IncuCyte® Caspase-3/7). Флуоресценцию отслеживают под микроскопом в течение приблизительно 9 дней. Также оценивают Т-клетки, восстановленные из селезенки мышей, которым вводят сконструированные Т-клетки. В качестве контроля, опухолевые сфероидные клетки H1975 инкубируют без сконструированных клеток (только опухоль).

Как показано на **фиг. 5A,** активность каспазы была самой высокой в опухолевых клетках, выделенных от мышей, которым вводят анти-CAR-экспрессирующие Т-клетки с *TGFBR2* KO, по сравнению с клетками, выделенными от других обработанных мышей.

Подобным образом, как показано на **фиг. 5B,** уменьшение размера сфероида (что отслеживается по уменьшению красной флуоресценции) было наибольшим в опухолевых клетках, выделенных от мышей, которым вводят анти-CAR-экспрессирующие Т-клетки с *TGFBR2* KO (LV KO), по сравнению с клетками, выделенными от других обработанных мышей. CAR-экспрессирующие клетки *TGFBR2* KO, выделенные из селезенки, также проявляют некоторую каспазную активность и противоопухолевую активность, по оценке в более поздние моменты времени. Сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR и DN-TGFBRII (LV DN), демонстрируют некоторые улучшения в активности каспазы и лизисе опухолевых сфероидов по сравнению с клетками, экспрессирующими анти-ROR1 CAR без модификации *TGFBR2*. Результаты согласуются с наблюдением, что CAR-экспрессирующие Т-клетки с нокаутом *TGFBR2* (LV KO) демонстрируют улучшенную противоопухолевую активность против сфероидов, как показано в анализе киллинга сфероидов и активности каспазы, по сравнению с CAR-экспрессирующими клетками с доминантно-негативные (LV DN) TGFBRII, или клетками, экспрессирующими CAR без нокаута *TGFBR2*. Результаты дополнительно подтверждают ингибирование TGFβ-опосредованного подавления иммунитета, например, с помощью KO *TGFBR2* в сконструированных Т-клетках, для достижения улучшенной активности и функции сконструированных клеток.

Пример 3 Оценка противоопухолевой активности полностью человеческих Т-клеток, экспрессирующих CAR, с нокаутом *TGFBR2*

Противоопухолевую активность сконструированных клеток, экспрессирующих типовой полностью человеческий химерный антигенный рецептор (CAR), оценивают с помощью анализа сфероидов.

Первичные CD4+ и CD8+ Т-клетки человека выделяют, стимулируют и конструируют для экспрессии типового полностью человеческого анти-ROR1 CAR с (полностью человеческим KO) нокаутом *TGFBR2* или без него (полностью человеческий WT), в общем, как описано в Примере 1.A выше, за исключением того, что CAR содержит полностью человеческий антигенсвязывающий домен анти-ROR1 scFv вместо scFv, полученного из химерного анти-ROR1 кролика/человека. Затем сконструированные клетки криоконсервируют. Клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR с антигенсвязывающим доменом scFv, полученным из R12, с нокаутом *TGFBR2* (R12 KO) или без (R12 WT), описанные в Примере 1.A выше, и клетки, обработанные ложной трансдукцией и электропорацией без RNP (имитация) или ложной трансдукцией с RNP для нокаута *TGFBR2* (имитация KO) также оценивают качестве контроля.

Для анализа киллинга сфероидов криоконсервированные сконструированные клетки размораживают и инкубируют с опухолевыми сфероидами H1975 при соотношении эффектора к мишени 1:5. Активность каспазы (зеленый краситель) и размер сфероидов (красный краситель) контролируют с помощью микроскопии в течение приблизительно 7 дней, обычно, как описано в Примере 2.A выше. Также измеряют количество секретируемого цитокина интерферона-гамма (IFN-γ).

Как показано на **фиг. 6A** (каспаза) и **6B** (размер сфероида), и полностью человеческий анти-ROR1 CAR, и анти-ROR1 CAR R12 с нокаутом *TGFBR2* проявляют улучшенную активность каспазы и активность по киллингу сфероидов по сравнению с клетками, экспрессирующими тот же рецептор без нокаута *TGFBR2*. Результат также показал, что продуцирование IFN-γ в целом выше в клетках *TGFBR2* KO по сравнению с клетками без *TGFBR2* KO.

Пример 4 Таргетный нокин (KI) трансгенных последовательностей, кодирующих химерный антигенный рецептор (CAR), в локусе эндогенного рецептора трансформирующего ростового фактора бета 2 (*TGFBR2*) в Т-клетке

Т-клетки человека конструируют для экспрессии типового химерного антигенного рецептора (CAR) путем таргетной интеграции нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в локус эндогенного рецептора трансформирующего ростового фактора бета 2 (*TGFBR2*) посредством репарации, направляемой гомологией (HDR). Стратегия приводит к нокину последовательностей, кодирующих CAR в эндогенном локусе *TGFBR2*, и нокауту эндогенного локуса *TGFBR2* (KO/KI).

A. нРНК и трансгенная конструкция для таргетного KI или случайной интеграции

Комплексы рибонуклеопротеидов (RNP) создают для введения генетического разрушения в эндогенный локус *TGFBR2* посредством редактирования генов, опосредованного CRISPR/Cas9. Комплексы RNP содержат Cas9 *Streptococcus pyogenes* и направляющую РНК (нРНК) с последовательностью таргетирующего домена GUGGAUGACCUGGCUAACAG (SEQ ID NO: 73), в общем, как описано в Примере 1.A выше.

Типовые матричные полинуклеотиды создают для таргетной интеграции (нокина) трансгенных последовательностей, содержащих последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие типовой химерный антигенный рецептор (CAR). Трансгенные последовательности включают последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие типовой CAR, специфичный для антигена созревания B-клеток (BCMA), и либо a) промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α) с энхансером (SEQ ID NO: 119) для управления экспрессией последовательностей, кодирующих CAR, под контролем гетерологичного промотора (EF1α-CAR); либо b) последовательности, кодирующие элемент проскока рибосомы P2A (SEQ ID NO: 120) выше последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих типовой CAR (P2A-CAR), для управления экспрессией CAR от эндогенного промотора *TGFBR2* при HDR-опосредованной таргетной интеграции внутри рамки в открытую рамку считывания *TGFBR2*. Кодированный CAR содержит scFv, который связывается с типовым антигеном-мишенью BCMA, спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и сигнальный домен CD3ζ.

Общая структура типовых матричных полинуклеотидов следующая: [5’ плечо гомологии]-[трансгенные последовательности]-[3' плечо гомологии]. Типовое 5' плечо

гомологии содержит приблизительно 600 по последовательности, которая гомологична части третьего интрона и четвертого экзона эндогенного локуса *TGFBR2* человека (5' последовательность плеча гомологии, указанная в SEQ ID NO: 69; нумерация экзона и интрона основана на изоформе 1, как указано в **таблице 1** в настоящем документе), или приблизительно 600 по последовательности, которая гомологична части четвертого экзона (5' последовательность плеча гомологии, указанная в SEQ ID NO: 71). Типовое 3' плечо гомологии содержит последовательность из приблизительно 600 по, которая гомологична части четвертого интрона (последовательность 3' плеча гомологии, указанная в SEQ ID NO: 72). Интеграция трансгенных последовательностей с помощью HDR приводит к делеции части четвертого экзона, замененной трансгенными последовательностями, кодирующими CAR и регуляторными или мультицистронными элементами.

В качестве контроля, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CAR, вводит в типовой лентивирусный вектор, полученный из HIV-1, для экспрессии CAR из последовательностей, введенных в Т-клетку путем случайной интеграции. Для экспрессии доминантно-негативной (DN) формы рецептора трансформирующего фактора роста бета II (DN-TGFBRII) конструкция для лентивирусной трансдукции дополнительно содержит последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие DN-TGFBRII, в общем, как описано в Примере 1.A выше.

B. Создание сконструированных Т-клеток, экспрессирующих типовой CAR, посредством репарации, направляемой гомологией (HDR)

Для таргетной интеграции с помощью HDR создают исходные аденоассоциированные вирусы (AAV), содержащие векторные конструкции, содержащие полинуклеотиды, описанные выше, для трансдукции клеток. Для случайной интеграции, лентивирусные векторные частицы получают, в общем, как описано в Примере 1.A выше.

Первичные CD4+ и CD8+ Т-клетки человека выделяют селекцией на основе иммуноаффинности из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека, полученных от здоровых доноров. Полученные клетки CD4+ и CD8+ (в соотношении 1:1) стимулируют в течение 72 часов путем культивирования с анти-CD3/анти-CD28 реагентом. Анти-CD3/анти-CD28 реагент удаляют, и стимулированные клетки подвергают электропорации с 2,2 мкМ комплексов RNP, содержащих нРНК, таргетирующую TGFBR2 (содержащую последовательность таргетирующего домена *TGFBR2,* указанную в SEQ ID NO: 73), и Cas9 *Streptococcus pyogenes,* как описано выше. В течение от 0 до 3 часов после электропорации, клетки инкубируют с исходным AAV, каждый из которых содержит матричные полинуклеотиды в объеме 5%. Клетки, подвергнутые электропорации с RNP, таргетирующим TGFBR2, но не контактировавшие с препаратами AAV (только RNP), ложно электропорированные и трансдуцированные клетки (имитация) и клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором для случайной интеграции трансгенных последовательностей, кодирующих CAR, и доминантно-негативной формы TGFBRII (Lenti DN-TGFBRII) оценивают как контроль. Клетки культивируют в течение 3 дней и оценивают с помощью проточной цитометрии после окрашивания анти-CD4 антителом,

анти-CD8 антителом и определяющим агентом, который специфически связывает CAR, для обнаружения экспрессии CAR.

Результаты показаны на **фиг. 7.** Введение матричных полинуклеотидов для таргетной интеграции посредством HDR в локус *TGFBR2* приводит к экспрессии CAR на поверхности клетки примерно в 42-58% протестированных клеток (**фиг. 7**). Экспрессия CAR посредством лентивирусной трансдукции, например, наблюдаемая в клетках, сконструированных для экспрессии CAR и DN-TGFBRII, была выше, чем в условиях HDR. Результаты окрашивания анти-CD4 и анти-CD8 показали, что процесс таргетной интеграции последовательностей, кодирующих CAR, существенно не изменил доли клеток CD4+ или CD8+ в композиции.

Результаты согласуются с открытием, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CAR, могут быть направлены для интеграции в локус *TGFBR2* для экспрессии CAR под контролем эндогенного промотора *TGFBR2* или гетерологичного промотора, такого как EF1α, создавая сконструированные Т-клетки, экспрессирующие CAR.

Пример 5 Противоопухолевая активность сконструированных Т-клеток с таргетной интеграцией трансгенных последовательностей, кодирующих CAR, посредством репарации, направляемой гомологией (HDR) на эндогенном локусе *TGFBR2*

Активность типовых клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированных путем таргетной интеграции в локус *TGFBR2* (KO/KI) или путем случайной интеграции с нокаутом (KO) эндогенного локуса *TGFBR2* или экспрессией доминантно-негативного TGFBRII (DN) оценивают с помощью анализа сфероидов.

A. Создание сконструированных Т-клеток с помощью HDR и экспрессии CAR

Первичные CD4+ и CD8+ Т-клетки человека от трех (3) доноров-людей выделяют, стимулируют и конструируют для экспрессии типового анти-ROR1 CAR R12 (см. Пример 1.A) посредством любой из: (1) только лентивирусной доставки (LV), (2) лентивирусной доставки с нокаутом *TGFBR2* (LV+KO) или (3) лентивирусной доставки и экспрессии доминантно-негативного TGFBRII (LV+DN), каждая из которых в общем описана в Примере 1.A выше; (4) таргетным нокином на локусе *TGFBR2* посредством HDR (KO/KI), по существу, как описано в примере 4, за исключением использования нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-ROR1 CAR R12 и под контролем другого гетерологичного промотора (MND).

Для таргетного нокина клетки подвергают электропорации с комплексами RNP, содержащими нРНК, таргетирующую TGFBR2 (содержащую последовательность таргетирующего домена *TGFBR2,* указанную в SEQ ID NO: 73), и Cas9 *Streptococcus pyogenes*, как описано выше в Примере 4.A. В течение от 0 до 3 часов после электропорации, клетки инкубируют с препаратами AAV, содержащими матричные полинуклеотиды со структурой [5’ плечо гомологии]-[трансгенные последовательности]-[3' плечо гомологии], с последовательностью 5’ плеча гомологии, указанной в SEQ ID NO: 69, и

последовательностью 3' плеча гомологии, указанной в SEQ ID NO: 72), и трансгенные последовательности, включая последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие анти-ROR1 CAR R12, под функциональным контролем промотора MND, синтетического промотора, который содержит область U3 модифицированного MoMuLV LTR с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы (последовательность, указанная в SEQ ID NO: 186; см. Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755) и связан с сигналом полиаденилирования SV40 (последовательность, указанная в SEQ ID NO: 185) (KO/KI). Сконструированные клетки культивируют в течение приблизительно 7 дней после электропорации и криоконсервируют. В качестве контроля также оценивают клетки, обработанные ложной трансдукцией и электропорацией без RNP (имитация) или ложной трансдукцией с RNP для нокаута *TGFBR2* (имитация KO). Уровень экспрессии анти-ROR1 CAR оценивают в каждой группе.

B. Противоопухолевая активность с помощью анализа сфероида

Для анализа киллинга сфероидов, сконструированные клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR R12, размораживают и инкубируют с опухолевыми сфероидами H1975 при соотношении эффектора к мишени 1:5. Активность каспазы (зеленый краситель) и размер сфероидов (красный краситель) контролируют с помощью микроскопии в течение приблизительно 14 дней, в общем, как описано в Примере 2.C выше.

Как показано на **фиг. 8A,** в этом эксперименте экспрессия анти-ROR1 CAR R12 (среднее геометрическое значение флуоресценции по данным проточной цитометрии) была наивысшей в клетках, сконструированных с использованием только типового CAR с помощью лентивирусной доставки (LV) или с DN-TGFBRII (LV+DN) по сравнению с клетками, которые доставляют CAR посредством лентивирусной доставки с нокаутом TGFBRII (LV+KO) или посредством HDR-опосредованной таргетной интеграции CAR в локус *TGFBR2* (KO/KI). Противоопухолевая активность, как показано повышенной активностью каспазы (**фиг. 8B)** и уменьшенным размером сфероидов (**фиг. 8C)**, была наивысшей в сфероидных культурах, инкубированных с CAR-экспрессирующими клетками, сконструированными путем HDR интеграции в локус *TGFBR2* (KO/KI). Улучшенная противоопухолевая активность также наблюдается в CAR-экспрессирующих клетках, которые были сконструированы с помощью лентивирусной доставки и с KO локуса *TGFBR2* (LV+KO) или с DN-TGFBRII (LV+DN), по сравнению с клетками, которые были сконструированы только для экспрессии типового CAR (LV).

Аналогичные результаты в отношении противоопухолевой активности наблюдают в исследованиях с использованием аналогичным образом сконструированных Т-клеток, но с полностью человеческим анти-ROR1 CAR.

C. Анализ сфероидов после продолжительной стимуляции

Противоопухолевую активность сконструированных клеток, экспрессирующих анти-ROR1 CAR R12, оценивают с помощью анализа киллинга сфероидов после продолжительной стимуляции. Криоконсервированные сконструированные клетки, полученные, как описано в Примере 5.A, размораживают и подвергают 7-дневной

продолжительной стимуляции путем инкубации с гранулами, покрытыми рекомбинантным слитым белком ROR1-Fc, что может привести к хронической стимуляции клеток и снижению активности. CAR-положительные Т-клетки смешивают с гранулами ROR1-Fc в соотношении 1 к 1. На 7-й день гранулы, содержащие ROR1-Fc, удаляют, и клетки инкубируют с опухолевыми сфероидами H1975 при соотношении эффектора к мишени, равном 1:5 или 1:10. Долю клеток, экспрессирующих CAR, оценивают до и после длительной стимуляции. Активность каспазы (зеленый краситель) и размер сфероидов (красный краситель) отслеживают с помощью микроскопии в течение приблизительно 14 дней, в общем, как описано в Примере 2.C выше. Количество секретированного цитокина интерферона-гамма (IFN-γ) также измеряют в день 1 продолжительной стимуляции и день 1 теста на киллинг сфероидов.

Как показано на **фиг. 9A,** наблюдается увеличение доли клеток CAR+, экспрессирующих анти-ROR1 CAR R12 при размораживании до длительной стимуляции (до) или после длительной стимуляции (после) в клетках, сконструированных с CAR посредством HDR-опосредованной таргетной интеграции CAR в локус *TGFBRII* (KO/KI). Доля клеток, экспрессирующих CAR при до или после продолжительной стимуляции, была в целом одинаковой для других групп сконструированных клеток у каждого из трех доноров (где один донор показал снижение частоты экспрессии CAR в клетках LV, сконструированных для экспрессирования только CAR лентивирусной доставкой). Как показано на **фиг. 9B** (каспаза) и **9C** (размер сфероида), клетки, сконструированные с CAR посредством HDR-опосредованной таргетной интеграции CAR в локус *TGFBRII* (KO/KI) или путем доставки лентивирусов с KO локуса *TGFBRII* (LV+KO), демонстрируют наивысшую активность каспазы и наибольшее уменьшение размера сфероида при каждом из соотношений E:T, протестированных в этом исследовании. Улучшенную противоопухолевую активность также наблюдают в клетках, экспрессирующих CAR, которые были сконструированы путем лентивирусной доставки с DN-TGFBRII (LV+DN), по сравнению с клетками, которые были сконструированы только для экспрессии типового CAR (LV).

D. Заключение

Результаты согласуются с наблюдением, что таргетный нокин типовых последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, в эндогенный ген *TGFBR2* (который также элиминирует экспрессию эндогенного гена *TGFBR2)* приводит к улучшенной противоопухолевой активности, как показано в анализе киллинга сфероидов. Улучшение наблюдают с различными типовыми анти-ROR1 CAR, и оно аналогично или больше, чем у клеток, сконструированных с использованием последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, доставляемых лентивирусной доставкой и содержащих нокаут *TGFBR2.* Результаты подтверждают использование таргетного нокина последовательностей, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в эндогенный ген *TGFBR2,* например, путем репарации, направляемой гомологией (HDR), для получения сконструированных клеток, которые менее восприимчивы или резистентны к TGFβ-

опосредованному подавлению иммунитета, и которые демонстрируют улучшенную противоопухолевую активность и функцию.

Пример 6 Создание и оценка противоопухолевой активности сконструированных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) с нокином (KI) или нокаутом (KO) *TGFBR2*

Т-клетки человека сконструируют для экспрессии типового рекомбинантного Т-клеточного рецептора (TCR) и генетического разрушения (нокаута) локуса рецептора трансформирующего ростового фактора бета 2 (*TGFBR2)* или путем таргетной интеграции (нокина) последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный TCR в эндогенном локусе *TGFBR2.*

A. *TGFBR2* KO Т-клетки, экспрессирующие типовой TCR

Первичные CD4+ и CD8+ Т-клетки человека выделяют, стимулируют и конструируют для экспрессии типового рекомбинантного TCR, специфичного для пептида папилломавируса человека 16 (HPV16) E7 (11-19), представленного на молекуле главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC), с или без нокаута *TGFBR2.* Способы конструирования клеток, как правило, такие, как описано в Примере 1.A выше, за исключением использования лентивирусных векторов, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие рекомбинантный TCR, посредством: (1) только лентивирусной доставки (TCR), (2) лентивирусной доставки с нокаутом *TGFBR2* (TCR+KO) или (3) лентивирусной доставки и ложной электропорации без RNP (TCR EP). В качестве контроля также оценивают клетки, обработанные ложной трансдукцией (имитацией), ложной трансдукцией и электропорацией без RNP (имитация EP) или ложной трансдукцией и электропорацией с RNP для нокаута *TGFBR2* (имитация KO).

Противоопухолевую активность сконструированных клеток, экспрессирующих типовой TCR, оценивают с помощью анализа киллинга сфероидов, в общем, как описано в Примере 2.C выше, за следующим исключением: клетки, экспрессирующие анти-HPV16 E7 TCR, инкубируют с опухолевыми сфероидами, содержащими экспрессирующие UPCI:SCC152 (ATCC® CRL-3240™) клетки плоскоклеточной карциномы при соотношении E:T 1:10, с или без 10 нг/мл TGFβ в среде. Количество секретированных цитокинов интерферон-гамма (IFN-γ), интерлейкина-2 (IL-2) и фактора некроза опухоли альфа (TNF-α) также измеряют в день 1 теста на киллинг сфероидов.

Как показано на **фиг. 10A** (каспаза) и **10B** (размер сфероида), противоопухолевая активность, о чем свидетельствует повышенная активность каспазы и уменьшенный размер сфероида, соответственно, значительно выше для клеток, экспрессирующих анти-HPV TCR с *TGFBR2* KO, по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими тот же анти-HPV TCR, но без *TGFBR2* KO, в исследованиях как с так и без добавления TGFβ. Результаты показывают полный клиренс сфероида опухоли даже при субоптимальном соотношении E:T 1:10 для клеток, экспрессирующих анти-HPV TCR с *TGFBR2* KO.

B. Сконструированные Т-клетки, экспрессирующие типовой CAR посредством

репарации, направляемой гомологией (HDR)

Первичные CD4+ и CD8+ Т-клетки человека от 3 доноров (доноры 1, 2 и 3) выделяют, стимулируют и конструируют для экспрессии типового рекомбинантного TCR, специфичного для папилломавируса человека 16 (HPV16), путем таргетной интеграции через HDR. Способы конструирования клеток, в общем, были такими, как описано в Примере 4 выше, за следующими исключениями: трансгенные последовательности включают последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие типовой анти-HPV16 TCR, под контролем либо a) промотора фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α) (EF1α KO/KI) или b) промотора MND (MND KO/KI). Также оценивают клетки, экспрессирующие рекомбинантный TCR посредством лентивирусной доставки с нокаутом *TGFBR2* (TCR LV *TGFBR2* KO) или без нокаута *TGFBR2* (TCR LV). Дополнительные контроли включают клетки, подвергнутые ложной обработке (имитация), и клетки с нокаутом *TGFBR2,* которые не были сконструированы для экспрессии рекомбинантного TCR (*TGFBR2* KO). Клетки культивируют в течение 8 дней и замораживают.

Уровень экспрессии анти-HPV TCR оценивают в каждой группе путем окрашивания анти-Vbeta2 антителом, которое распознает рекомбинантный TCR. Экспрессия рекомбинантного TCR в каждой из сконструированных клеток показана на **фиг. 11A** и **11B.** Как показано, доля клеток, экспрессирующих рекомбинантный TCR, обычно выше для клеток, сконструированных с использованием лентивирусной доставки (TCR LV, см. **фиг. 11A;** или TCR LV *TGFBR2* KO, см. **фиг. 11B)**, по сравнению с клетками, сконструированными с помощью HDR (MND KO/KI или EF1α KO/KI, см. **фиг. 11B)**. Приблизительно 6-9% эндогенных Т-клеток демонстрируют неспецифическое фоновое окрашивание анти-Vbeta2 антителом, как показано в группе имитации. Среди групп, сконструированных с помощью HDR, экспрессия рекомбинантного TCR выше в клетках, в которых рекомбинантный TCR находится под контролем промотора MND, по сравнению с теми, которые находятся под контролем промотора EF1α.

Противоопухолевую активность сконструированных клеток, экспрессирующих типовой TCR, оценивают с помощью анализа киллинга сфероидов, в общем, как описано в Примере 6.A выше, за исключением соотношения E:T 1:1 или 1:5 и без добавления экзогенного TGFβ. Как показано на **фиг. 12A** (каспаза) и **12B** (размер сфероида), клетки, сконструированные с рекомбинантным TCR посредством HDR-опосредованной таргетной интеграции TCR в локус *TGFBRII* (MND KO/KI), продемонстрировали наивысшую активность каспазы и наибольшее уменьшение размера сфероида при каждом из соотношений E:T, протестированных в этом исследовании. Клетки, сконструированные с рекомбинантным TCR с помощью лентивирусной доставки с KO локуса *TGFBRII* (TCR LV *TGFBR2* KO), также показывают аналогичную высокую активность каспазы.

C. Заключение

Результаты согласуются с наблюдением, что нокаут эндогенного гена *TGFBR2* или таргетный нокин типовых последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих TCR, в эндогенный ген *TGFBR2* (что также приводит к нокауту эндогенного гена *TGFBR2)* дает

улучшенную противоопухолевую активность, как показывает анализ киллинга сфероидов. Результаты также подтверждают использование таргетного нокина последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор, такой как рекомбинантный TCR, например, путем гомологически-зависимой репарации (HDR), для получения сконструированных клеток, которые менее восприимчивы или резистентны к TGFβ-опосредованному подавлению иммунитета, и которые демонстрируют улучшенную противоопухолевую активность и функцию.

Пример 7 Матричные полинуклеотиды для генерации доминантно-негативного *TGFBR2* в эндогенном локусе и таргетная интеграция трансгенных последовательностей, кодирующих CAR

Типовые матричные полинуклеотиды создают для таргетной интеграции трансгенных последовательностей, кодирующих типовой CAR в локусе эндогенного рецептора трансформирующего ростового фактора бета 2 (*TGFBR2)*, а также генерируют доминантно-негативный TGFBRII (DN-TGFBRII) из эндогенного локуса *TGFBR2.*

Как описано в Примере 1.A выше, DN-TGFBRII лишен протеинкиназного домена рецептора и может вмешиваться в передачу сигналов TGF-бета (TGFβ) через образование нефункционального рецепторного комплекса. Создают типовой матричный полинуклеотид с общей структурой [5’ плечо гомологии]-[трансгенные последовательности]-[3' плечо гомологии]. Трансгенные последовательности содержат i) последовательности, кодирующие CAR, которые содержат scFv, который связывается с BCMA, спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, и костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и ii) последовательности, кодирующие элемент проскока рибосомы P2A выше последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих CAR. Плечо гомологии 5’ содержит приблизительно 600 по последовательности, которая гомологична части третьего интрона и четвертому экзону эндогенного локуса *TGFBR2* человека, включая часть последовательностей, кодирующих трансмембранный домен *TGFBR2* (последовательность 5' плеча гомологии указана в SEQ ID NO: 70). 3’ плечо гомологии содержит последовательность приблизительно 600 по, которая гомологична части четвертого интрона (последовательность 3' плеча гомологии указана в SEQ ID NO: 72).

Интеграция трансгенных последовательностей с помощью HDR приводит к экспрессии транскрипта иРНК, кодирующего DN-TGFBRII-P2A-CAR под контролем эндогенного промотора *TGFBR2,* что при трансляции и проскоке рибосом дает полипептид DN-TGFBRII (слитый с расщепленной N-концевой частью последовательности P2A) и CAR (слитый с расщепленным C-концевым пролином последовательности P2A).

Настоящее изобретение не предназначено для ограничения объема конкретными описанными вариантами осуществления, которые представлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из приведенного в настоящем документе описания и идей. Такие варианты могут быть применены на практике без отклонения от

истинного объема и сущности описания, и предполагается, что они попадают в объем настоящего описания.

Последовательности

№	**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**ОПИСАНИЕ**
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (IgG4шарнир) (aa)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT	спейсер (IgG4шарнир) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Шарнир-C_H3 спейсер
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Шарнир-CH2-C_H3 спейсер
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRG GEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQD LWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEG LLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQ RLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFS PPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVL RVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-шарнир-Fc
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINAT NIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLA VVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRD CVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECL PQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPK	tEGFR

	IPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aa 153-179 из Uniprot P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aa 114-179 из Uniprot P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR S	CD28 (aa 180-220 из Uniprot P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RS	CD28 (LL до GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L	4-1BB (aa 214-255 из Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAF RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKAT GQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLL EGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVAL GIGLFM	tEGFR
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A

18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-$(SGGGG)_5$-P- где P является пролином, G является глицином и S является серином	Линкер
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Линкер
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatccca	GMCSFR сигнальная последовательность альфа цепи
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	GMCSFR сигнальная последовательность альфа цепи
26	MALPVTALLLPLALLLHA	CD8 альфа сигнальный пептид
27	EPKSCDKTHTCPPCP	Шарнир
28	ERKCCVECPPCP	Шарнир
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	Шарнир
30	ESKYGPPCPSCP	Шарнир
31	X_1PPX_2P X_1 является глицином, цистеином или аргинином X_2 является цистеином или треонином	Шарнир
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3

38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP RKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKM NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTK GEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVS S	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVVDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTA YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVT VSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKD LADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTA YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVT	scFv

	CKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRF TGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGT KLEIKR	
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgacc atcagctgccgggccagccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccg acggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgcccagccg gtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaa gatatcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaaca aagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcag caccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggcccccagccaga gcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggat ccggcagccccccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagacca cctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagcca ggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagc actactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgt gagcagc	Последователь ность, кодирующая scFv
58	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
59	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTD NNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQ EVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCI MKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVI FQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTR KLMEFSEHCAIILEDDRSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLV GKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTE KDIFSDINLKHENILQFLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKG NLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPK MPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDL ANSGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMAL VLWEMTSRCNAVGEVKDYEPPFGSKVREHPCVESMKDNV LRDRGRPEIPSFWLNHQGIQMVCETLTECWDHDPEARLTA QCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK	TGF-бета рецептор типа-2 человека (TGFR2) изоформа 1 Uniprot P37173-1

60	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKD EIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDV RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSC SSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISV IIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMEFSEHCAIILEDDR SDISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQ NTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQF LTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDL RKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVK NDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSGQVGTARYMAPE VLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEV KDYEPPFGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSFWLNH QGIQMVCETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRL SGRSCSEEKIPEDGSLNTTK	TGF-бета рецептор типа-2 человека (TGFR2) изоформа 2 Uniprot P37173-2
61	ggagagggagaaggctctcgggcggagagaggtcctgcccagctgttggcgaggagtttc ctgtttcccccgcagcgctgagttgaagttgagtgagtcactcgcgcgcacggagcgacgac acccccgcgcgtgcacccgctcgggacaggagccggactcctgtgcagcttccctcggccg ccgggggcctccccgcgcctcgccggcctccaggcccccctcctggctggcgagcgggcgc cacatctggcccgcacatctgcgctgccggcccggcgcggggtccggagagggcgcggc gcggaggcgcagccaggggtccgggaaggcgccgtccgctgcgctgggggctcggtctat gacgagcagcggggtctgccatgggtcgggggctgctcaggggcctgtggccgctgcaca tcgtcctgtggacgcgtatcgccagcacgatcccaccgcacgttcagaagtcggttaataacg acatgatagtcactgacaacaacggtgcagtcaagtttccacaactgtgtaaattttgtgatgtg agattttccacctgtgacaaccagaaatcctgcatgagcaactgcagcatcacctccatctgtg agaagccacaggaagtctgtgtggctgtatggagaaagaatgacgagaacataacactaga gacagtttgccatgaccccaagctcccctaccatgactttattctggaagatgctgcttctccaa agtgcattatgaaggaaaaaaaaaaagcctggtgagactttcttcatgtgttcctgtagctctgatg agtgcaatgacaacatcatcttctcagaagaatataacaccagcaatcctgacttgttgctagtc atatttcaagtgacaggcatcagcctcctgccaccactgggagttgccatatctgtcatcatcat cttctactgctaccgcgttaaccggcagcagaagctgagttcaacctgggaaaccggcaaga cgcggaagctcatggagttcagcgagcactgtgccatcatcctggaagatgaccgctctgac atcagctccacgtgtgccaacaacatcaaccacaacacagagctgctgcccattgagctgga caccctggtggggaaaggtcgctttgctgaggtctataaggccaagctgaagcagaacacttc agagcagtttgagacagtggcagtcaagatctttccctatgaggagtatgcctcttggaagaca	TGF-бета рецептор типа-2 человека (TGFR2) вариант транскрипта B, NCBI эталонная последовательность: NM_003242.5

	gagaaggacatcttctcagacatcaatctgaagcatgagaacatactccagttcctgacggctg aggagcggaagacggagttggggaaacaatactggctgatcaccgccttccacgccaagg gcaacctacaggagtacctgacgcggcatgtcatcagctgggaggacctgcgcaagctggg cagctccctcgcccgggggattgctcacctccacagtgatcacactccatgtgggaggccca agatgcccatcgtgcacagggacctcaagagctccaatatcctcgtgaagaacgacctaacct gctgcctgtgtgactttgggctttccctgcgtctggaccctactctgtctgtggatgacctggcta acagtgggcaggtgggaactgcaagatacatggctccagaagtcctagaatccaggatgaat ttggagaatgttgagtccttcaagcagaccgatgtctactccatggctctggtgctctgggaaat gacatctcgctgtaatgcagtgggagaagtaaaagattatgagcctccatttggttccaaggtg cgggagcacccctgtgtcgaaagcatgaaggacaacgtgttgagagatcgagggcgacca gaaattcccagcttctggctcaaccaccagggcatccagatggtgtgtgagacgttgactgag tgctgggaccacgacccagaggcccgtctcacagcccagtgtgtggcagaacgcttcagtg agctggagcatctggacaggctctcggggaggagctgctcggaggagaagattcctgaaga cggctccctaaacactaccaaatagctcttctggggcaggctgggccatgtccaaagaggct gcccctctcaccaaagaacagaggcagcaggaagctgcccctgaactgatgcttcctggaaa accaaggggtcactcccctccctgtaagctgtggggataagcagaaacaacagcagcagg gagtgggtgacatagagcattctatgcctttgacattgtcataggataagctgtgttagcacttcc tcaggaaatgagattgatttttacaatagccaataacatttgcactttattaatgcctgtatataaat atgaatagctatgttttatatatatatatatatatctatatatgtctatagctctatatatatagccatac cttgaaaagagacaaggaaaaacatcaaatattcccaggaaattggttttattggagaactcca gaaccaagcagagaaggaagggacccatgacagcattagcatttgacaatcacacatgcagt ggttctctgactgtaaaacagtgaactttgcatgaggaaagaggctccatgtctcacagccagc tatgaccacattgcacttgcttttgcaaaataatcattccctgcctagcacttctcttctggccatg gaactaagtacagtggcactgtttgaggaccagtgttcccggggttcctgtgtgcccttatttctc ctggacttttcatttaagctccaagccccaaatctgggggggctagtttagaaactctccctcaac ctagtttagaaactctaccccatctttaataccttgaatgttttgaaccccacttttttaccttcatggg ttgcagaaaaatcagaacagatgtccccatccatgcgattgccccaccatctactaatgaaaaa ttgttctttttttcatctttcccctgcacttatgttactattctctgctcccagccttcatccttttctaaaa aggagcaaattctcactctaggctttatcgtgtttacttttttcattacacttgacttgattttctagtttt ctatacaaacaccaatgggttccatctttctgggctcctgattgctcaagcacagtttggcctgat gaagaggatttcaactacacaatactatcattgtcaggactatgacctcaggcactctaaacata tgttttgtttggtcagcacagcgtttcaaaaagtgaagccactttataaatatttggagattttgcag gaaaatctggatccccaggtaaggatagcagatggttttcagttatctccagtccacgttcacaa aatgtgaaggtgtggagacacttacaaagctgcctcacttctcactgtaaacattagctctttcca ctgcctacctggaccccagtctaggaattaaatctgcacctaaccaaggtcccttgtaagaaat	

	gtccattcaagcagtcattctctgggtatataatatgattttgactaccttatctggtgttaagatttg aagttggccttttattggactaaaggggaactcctttaagggtctcagttagcccaagtttcttttg cttatatgttaatagttttaccctctgcattggagagaggagtgctttactccaagaagctttcctc atggttaccgttctctccatcatgccagccttctcaacctttgcagaaattactagagaggatttg aatgtgggacacaaaggtcccatttgcagttagaaaatttgtgtccacaaggacaagaacaaa gtatgagctttaaaactccataggaaacttgttaatcaacaaagaagtgttaatgctgcaagtaat ctctttttaaaactttttgaagctacttattttcagccaaataggaatattagagagggactggtag tgagaatatcagctctgtttggatggtggaaggtctcattttattgagatttttaagatacatgcaa aggtttggaaatagaacctctaggcaccctcctcagtgtgggtgggctgagagttaaagacag tgtggctgcagtagcatagaggcgcctagaaattccacttgcaccgtagggcatgctgatacc atcccaatagctgttgcccattgacctctagtggtgagtttctagaatactggtccattcatgagat attcaagattcaagagtattctcacttctgggttatcagcataaactggaatgtagtgtcagagga tactgtggcttgttttgtttatgttttttttttcttattcaagaaaaaagaccaaggaataacattctgta gttcctaaaaatactgacttttttcactactatacataaagggaaagttttattcttttatggaacactt cagctgtactcatgtattaaaataggaatgtgaatgctatatactctttttatatcaaaagtctcaag cacttatttttattctatgcattgtttgtcttttacataaataaaatgtttattagattgaataaagcaaa atactcaggtgagcatcctgcctcctgttcccattcctagtagctaaa	
62	ggagagggagaaggctctcgggcggagagaggtcctgcccagctgttggcgaggagtttc ctgtttccccccgcagcgctgagttgaagttgagtgagtcactcgcgcgcacggagcgacgac acccccgcgcgtgcacccgctcgggacaggagccggactcctgtgcagcttccctcggccg ccgggggcctccccgcgcctcgccggcctccaggcccccctcctggctggcgagcgggcgc cacatctggcccgcacatctgcgctgccggcccggcgcggggtccggagagggcgcggc gcggaggcgcagccaggggtccgggaaggcgccgtccgctgcgctgggggctcggtctat gacgagcagcggggtctgccatgggtcgggggctgctcaggggcctgtggccgctgcaca tcgtcctgtggacgcgtatcgccagcacgatcccaccgcacgttcagaagtcggatgtggaa atggaggcccagaaagatgaaatcatctgccccagctgtaataggactgcccatccactgag acatattaataacgacatgatagtcactgacaacaacggtgcagtcaagtttccacaactgtgta aattttgtgatgtgagattttccacctgtgacaaccagaaatcctgcatgagcaactgcagcatc acctccatctgtgagaagccacaggaagtctgtgtggctgtatggagaaagaatgacgagaa cataacactagagacagtttgccatgaccccaagctcccctaccatgactttattctggaagatg ctgcttctccaaagtgcattatgaaggaaaaaaaaaagcctggtgagactttcttcatgtgttcct gtagctctgatgagtgcaatgacaacatcatcttctcagaagaatataacaccagcaatcctga cttgttgctagtcatatttcaagtgacaggcatcagcctcctgccaccactgggagttgccatat ctgtcatcatcatcttctactgctaccgcgttaaccggcagcagaagctgagttcaacctggga aaccggcaagacgcggaagctcatggagttcagcgagcactgtgccatcatcctggaagat	TGF-бета рецептор типа-2 человека (TGFR2) вариант транскрипта A, NCBI эталонная последовательность: NM_001024847.2

	gaccgctctgacatcagctccacgtgtgccaacaacatcaaccacaacacagagctgctgcc cattgagctggacaccctggtggggaaaggtcgctttgctgaggtctataaggccaagctgaa gcagaacacttcagagcagtttgagacagtggcagtcaagatctttccctatgaggagtatgcc tcttggaagacagagaaggacatcttctcagacatcaatctgaagcatgagaacatactccagt tcctgacggctgaggagcggaagacggagttggggaaacaatactggctgatcaccgccttc cacgccaagggcaacctacaggagtacctgacgcggcatgtcatcagctgggaggacctgc gcaagctgggcagctccctcgcccgggggattgctcacctccacagtgatcacactccatgt gggaggcccaagatgcccatcgtgcacagggacctcaagagctccaatatcctcgtgaaga acgacctaacctgctgcctgtgtgactttgggctttccctgcgtctggaccctactctgtctgtgg atgacctggctaacagtgggcaggtgggaactgcaagatacatggctccagaagtcctagaa tccaggatgaatttggagaatgttgagtccttcaagcagaccgatgtctactccatggctctggt gctctgggaaatgacatctcgctgtaatgcagtgggagaagtaaaagattatgagcctccattt ggttccaaggtgcgggagcacccctgtgtcgaaagcatgaaggacaacgtgttgagagatc gagggcgaccagaaattcccagcttctggctcaaccaccagggcatccagatggtgtgtgag acgttgactgagtgctgggaccacgacccagaggcccgtctcacagcccagtgtgtggcag aacgcttcagtgagctggagcatctggacaggctctcggggaggagctgctcggaggagaa gattcctgaagacggctccctaaacactaccaaatagctcttctggggcaggctgggccatgt ccaaagaggctgcccctctcaccaaagaacagaggcagcaggaagctgcccctgaactgat gcttcctggaaaaccaaggggtcactcccctccctgtaagctgtggggataagcagaaaca acagcagcagggagtgggtgacatagagcattctatgcctttgacattgtcataggataagctg tgttagcacttcctcaggaaatgagattgatttttacaatagccaataacatttgcactttattaatg cctgtatataaatatgaatagctatgttttatatatatatatatatatctatatatgtctatagctctatat atatagccataccttgaaaagagacaaggaaaaacatcaaatattcccaggaaattggttttatt ggagaactccagaaccaagcagagaaggaagggacccatgacagcattagcatttgacaat cacacatgcagtggttctctgactgtaaaacagtgaactttgcatgaggaaagaggctccatgt ctcacagccagctatgaccacattgcacttgcttttgcaaaataatcattccctgcctagcacttct cttctggccatggaactaagtacagtggcactgtttgaggaccagtgttcccggggttcctgtgt gcccttatttctcctggacttttcatttaagctccaagccccaaatctgggggggctagtttagaaa ctctccctcaacctagtttagaaactctaccccatctttaataccttgaatgttttgaaccccacttttt taccttcatgggttgcagaaaaatcagaacagatgtccccatccatgcgattgccccaccatct actaatgaaaaattgttctttttttcatctttcccctgcacttatgttactattctctgctcccagccttc atccttttctaaaaaggagcaaattctcactctaggctttatcgtgtttacttttttcattacacttgact tgattttctagttttctatacaaacaccaatgggttccatctttctgggctcctgattgctcaagcac agtttggcctgatgaagaggatttcaactacacaatactatcattgtcaggactatgacctcagg cactctaaacatatgttttgtttggtcagcacagcgtttcaaaaagtgaagccactttataaatattt	

	ggagattttgcaggaaaatctggatccccaggtaaggatagcagatggttttcagttatctccag tccacgttcacaaaatgtgaaggtgtggagacacttacaaagctgcctcacttctcactgtaaac attagctctttccactgcctacctggaccccagtctaggaattaaatctgcacctaaccaaggtc ccttgtaagaaatgtccattcaagcagtcattctctgggtatataatatgattttgactaccttatct ggtgttaagatttgaagttggccttttattggactaaaggggaactcctttaagggtctcagttag cccaagtttcttttgcttatatgttaatagttttaccctctgcattggagagaggagtgctttactcca agaagctttcctcatggttaccgttctctccatcatgccagccttctcaacctttgcagaaattact agagaggatttgaatgtgggacacaaaggtcccatttgcagttagaaaatttgtgtccacaagg acaagaacaaagtatgagctttaaaactccataggaaacttgttaatcaacaaagaagtgttaat gctgcaagtaatctctttttttaaaacttttgaagctacttattttcagccaaataggaatattagaga gggactggtagtgagaatatcagctctgtttggatggtggaaggtctcattttattgagatttttaa gatacatgcaaaggtttggaaatagaacctctaggcaccctcctcagtgtgggtgggctgaga gttaaagacagtgtggctgcagtagcatagaggcgcctagaaattccacttgcaccgtagggc atgctgataccatcccaatagctgttgcccattgacctctagtggtgagtttctagaatactggtc cattcatgagatattcaagattcaagagtattctcacttctgggttatcagcataaactggaatgta gtgtcagaggatactgtggcttgttttgtttatgtttttttttcttattcaagaaaaaagaccaaggaa taacattctgtagttcctaaaaatactgacttttttcactactatacataaagggaaagttttattctttt atggaacacttcagctgtactcatgtattaaaataggaatgtgaatgctatatactctttttatatca aaagtctcaagcacttatttttattctatgcattgtttgtcttttacataaataaaatgtttattagattg aataaagcaaaatactcaggtgagcatcctgcctcctgttcccattcctagtagctaaa	
63	GCAGACCGAUGUCUACUCCA	*TGFBR2* последовательность таргетирующего домена 1
64	CCCCUACCAUGACUUUAUUC	*TGFBR2* последовательность таргетирующего домена 2
65	GACAUCUCGCUGUAAUGCAG	*TGFBR2* последовательность таргетирующего домена 3

66	CACAUGAAGAAAGUCUCACC	*TGFBR2* последовательность таргетирующего домена 4
67	AUGAUAGUCACUGACAACAA	*TGFBR2* последовательность таргетирующего домена 5
68	CUCCAUCUGUGAGAAGCCAC	*TGFBR2* последовательность таргетирующего домена 6
69	TACATGCAGATTTTTTGAAGGCAGAAGCTGTGTCATTTTTTTTCATGTTCCCAATGTCCTGAGCTTAGATAACACTCAGTAAATGGTTTGTCTTTTTTATTTGGCAATATTGAGGACCTGCTGTGTGCTAAGTGCAGTTTACAGTAGTGAAGAAGACATGGTACCTTCCAGCATGGAGTTCCCTGTCCGTGGGGGATGGCAAGAGTAGGGAAAGACAGATGTGAAATCAAGAGGTAGAGTCATAGTTCATTTAGTTTAAGTTGTACTGAATTGTTACCTAGGAAAAGTATAAGGTGCTATGAAAATGTATAAAATAAGACAGTTTTCCAAGTTTTTCTAGGCCTCTCTTAAGCAGTGACATTTAAGCTGAAGTTTGAAGGAAGAGCAGGGGATGACGAACAGATGGCCAGAGGCAGGGAAGGCTGAACGAGCATGCACTTGCATCCCTGAAATAAAAATTAACAATATCGTATCTACAAAAACTATGCAGATGCTAAAATCTATAGATGCTCAGGCATGAACCCACTTCCTGACAGTACTTACCTACCACATCCAACTCCTTCTCTCCTTGTTTTGTTTCCCCATCAGAATATAACACCAGCAATCCTGAC	*TGFBR2* последовательность 5’ плеча гомологии 1
70	GTGCAGTTTACAGTAGTGAAGAAGACATGGTACCTTCCAGCATGGAGTTCCCTGTCCGTGGGGGATGGCAAGAGTAGGGAAAGACAGATGTGAAATCAAGAGGTAGAGTCATAGTTCATTTAGTTTAAGTTGTACTGAATTGTTACCTAGGAAA	*TGFBR2* последовательность 5’ плеча гомологии 2

	AGTATAAGGTGCTATGAAAATGTATAAAATAAGACAGTT TTCCAAGTTTTTCTAGGCCTCTCTTAAGCAGTGACATTTA AGCTGAAGTTTGAAGGAAGAGCAGGGGATGACGAACAG ATGGCCAGAGGCAGGGAAGGCTGAACGAGCATGCACTT GCATCCCTGAAATAAAAATTAACAATATCGTATCTACAA AAACTATGCAGATGCTAAAATCTATAGATGCTCAGGCAT GAACCCACTTCCTGACAGTACTTACCTACCACATCCAAC TCCTTCTCTCCTTGTTTTGTTTCCCCATCAGAATATAACA CCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGA CAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATAT CTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACCGGCA GCAGAAGCTGAGTTCA	
71	ATGGAGTTCAGCGAGCACTGTGCCATCATCCTGGAAGAT GACCGCTCTGACATCAGCTCCACGTGTGCCAACAACATC AACCACAACACAGAGCTGCTGCCCATTGAGCTGGACACC CTGGTGGGGAAAGGTCGCTTTGCTGAGGTCTATAAGGCC AAGCTGAAGCAGAACACTTCAGAGCAGTTTGAGACAGT GGCAGTCAAGATCTTTCCCTATGAGGAGTATGCCTCTTG GAAGACAGAGAAGGACATCTTCTCAGACATCAATCTGA AGCATGAGAACATACTCCAGTTCCTGACGGCTGAGGAGC GGAAGACGGAGTTGGGGAAACAATACTGGCTGATCACC GCCTTCCACGCCAAGGGCAACCTACAGGAGTACCTGACG CGGCATGTCATCAGCTGGGAGGACCTGCGCAAGCTGGG CAGCTCCCTCGCCCGGGGGATTGCTCACCTCCACAGTGA TCACACTCCATGTGGGAGGCCCAAGATGCCCATCGTGCA CAGGGACCTCAAGAGCTCCAATATCCTCGTGAAGAACG ACCTAACCTGCTGCCTGTGTGACTTTGGGCTTTCCCTGCG TCTGGACCCTACTCTGTCT	*TGFBR2* последовательность 5’ плеча гомологии 3
72	GTAAGTTAGAGCTAGTGCTAGATCCCCTTTACCTTGAGC CTGGCCTCACCCTACCTCTTGATCCATATCTCCTGGCTCT TATCTCAAACAGCCCTGTACTCTGGACACTGGTCTAGGG AATCTAGCCAAAGTATGGAGTCTGCCTTGAGCATACTCT GCTCTGTCCTGCCTGAGCATTTTTGCTAATGGACAGCATT TCTCCTCCTATCTTCAAATCCTTCCCAGTTCAGCACATTT TTTCCTCCTGGATCAATCCTCATTTCTCTTCCAGCAAATG	*TGFBR2* последовательность 3’ плеча гомологии 1

	TTTTTTCTTTGTTTCAAGCACTGTTAGTACTTTACCTCTAT TTTTTCCCTCTCTTATGGTTGTACTCAGTCCTTTCTGCTCT ATACTAGCTGTAGTTGTGTTGGTTTCTTTGTATTAAAAGC ATCGTGGAAGGCAATCTCCCTGAAGTCCAAATCTACATC CACATGGTCACCCAAGATATGTAGCACAATGCCTTGAAC ATTGAAAGTAAAATAAGTACTTGTCGACTGAGTGAGCAC TTCCACTCTTGAAGCACTCTCACAGATTAAAATGGAAAT GTTTTTGGCTAAGAAACTATTGGAAGGTGATTGGAAATC ACCACA	
73	GUGGAUGACCUGGCUAACAG	*TGFBR2* последовательность таргетирующего домена
74	GCAGACCGATGTCTACTCCA	*TGFBR2* последовательность-мишень 1
75	GACATCTCGCTGTAATGCAG	*TGFBR2* последовательность-мишень 2
76	ACAGTGATCACACTCCATGT	*TGFBR2* последовательность-мишень 3
77	cgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagtt gggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactggg aaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgc agtagtcgccgtgaacgttcttttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtg tgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacg cccctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttc gaggccttgcgcttaaggagcccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctg gggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctcta gccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgg gccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggggcccgtgcg tcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacg ggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccc	EF1альфа промотор (GenBank: J04617.1)

	cgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgc ttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcg ggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactcc acggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctt taggttgggggggagggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaag ttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttca ttctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtgaa	
78	CTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAG	сайт акцептора сплайсинга HBB человека
79	TTTCTCTCCACAG	сайт акцептора сплайсинга IgG человека
80	GTAGCTCTGATGAGTGCAAT	*TGFBR2* последовательность-мишень A
81	ATGAATCTCTTCACTCTAGG	*TGFBR2* последовательность-мишень B
82	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKMDSSR DRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE	FKBP
83	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSR DRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE	FKBP12v36
84	MGSNKSKPKDASQRRR	мотив ацилирования C-Src человека
85	MGCXC	двойной мотив ацилирования
86	CAAX	CAAX мотив
87	ACAGGAGTACCTGACGCGGC	*TGFBR2* последовательность-мишень C

88	CTGTTAGCCAGGTCATCCAC	*TGFBR2* последовательность-мишень D
89	GGGTGTCCAGCTCAATGGGC	*TGFBR2* последовательность-мишень E
90	TCATAATGCACTTTGGAGAA	*TGFBR2* последовательность-мишень F
91	TGACTTTATTCTGGAAGATG	*TGFBR2* последовательность-мишень G
92	GGCCGCTGCACATCGTCCTG	*TGFBR2* последовательность-мишень 4
93	GCGGGGTCTGCCATGGGTCG	*TGFBR2* последовательность-мишень 5
94	AGTTGCTCATGCAGGATTTC	*TGFBR2* последовательность-мишень 6
95	AAGTCATGGTAGGGGAGCTT	*TGFBR2* последовательность-мишень 7
96	AGTCATGGTAGGGGAGCTTG	*TGFBR2* последовательность-мишень 8
97	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	типовой домен комплементарности нРНК
98	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGAAA**AGCAUAGC**AAG**UUAAAAU**AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	типовой домен комплементарности нРНК
99	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUG	типовой домен

	GAAA**CAGCAUAGC**AAG**UUAAAAU**AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	комплементарности нРНК
100	NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUGGAAA**CAAAACAGCAUAGC**AAG**UUAAAAU**AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	типовой домен комплементарности нРНК
101	NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUAUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAUAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	типовая нРНК
102	NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	типовая нРНК
103	NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUAUUAGAGCUAUGCUGUAUUGGAAACAAUACAGCAUAGCAAGUUAAUAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	типовая нРНК
104	AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU	типовой проксимальный и хвостовой домен
105	AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGGUGC	типовой проксимальный и хвостовой домен
106	AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGGAUC	типовой проксимальный и хвостовой домен
107	AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG	типовой проксимальный и хвостовой домен
108	AAGGCUAGUCCGUUAUCA	типовой проксимальный

		и хвостовой домен
109	AAGGCUAGUCCG	типовой проксимальный и хвостовой домен
110	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU	типовая химерная нРНК
111	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGUACUCUGGAA ACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUA UCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUUUU	типовая химерная нРНК
112	KKPYSIGLDIGTNSVGWAVVTDDYKVPAKKMKVLGNTDK SHIEKNLLGALLFDSGNTAEDRRLKRTARRRYTRRRNRILY LQEIFSEEMGKVDDSFFHRLEDSFLVTEDKRGERHPIFGNLE EEVKYHENFPTIYHLRQYLADNPEKVDLRLVYLALAHIIKF RGHFLIEGKFDTRNNDVQRLFQEFLAVYDNTFENSSLQEQN VQVEEILTDKISKSAKKDRVLKLFPNEKSNGRFAEFLKLIVG NQADFKKHFELEEKAPLQFSKDTYEEELEVLLAQIGDNYAE LFLSAKKLYDSILLSGILTVTDVGTKAPLSASMIQRYNEHQ MDLAQLKQFIRQKLSDKYNEVFSDVSKDGYAGYIDGKTNQ EAFYKYLKGLLNKIEGSGYFLDKIEREDFLRKQRTFDNGSIP HQIHLQEMRAIIRRQAEFYPFLADNQDRIEKLLTFRIPYYVG PLARGKSDFAWLSRKSADKITPWNFDEIVDKESSAEAFINR MTNYDLYLPNQKVLPKHSLLYEKFTVYNELTKVKYKTEQ GKTAFFDANMKQEIFDGVFKVYRKVTKDKLMDFLEKEFD EFRIVDLTGLDKENKVFNASYGTYHDLCKILDKDFLDNSK NEKILEDIVLTLTLFEDREMIRKRLENYSDLLTKEQVKKLER RHYTGWGRLSAELIHGIRNKESRKTILDYLIDDGNSNRNFM QLINDDALSFKEEIAKAQVIGETDNLNQVVSDIAGSPAIKKG ILQSLKIVDELVKIMGHQPENIVVEMARENQFTNQGRRNSQ QRLKGLTDSIKEFGSQILKEHPVENSQLQNDRLFLYYLQNG RDMYTGEELDIDYLSQYDIDHIIPQAFIKDNSIDNRVLTSSK ENRGKSDDVPSKDVVRKMKSYWSKLLSAKLITQRKFDNLT KAERGGLTDDDKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDERFNTE	Streptococcus mutans Cas9

	TDENNKKIRQVKIVTLKSNLVSNFRKEFELYKVREINDYHH AHDAYLNAVIGKALLGVYPQLEPEFVYGDYPHFHGHKEN KATAKKFFYSNIMNFFKKDDVRTDKNGEIIWKKDEHISNIK KVLSYPQVNIVKKVEEQTGGFSKESILPKGNSDKLIPRKTK KFYWDTKKYGGFDSPIVAYSILVIADIEKGKSKKLKTVKAL VGVTIMEKMTFERDPVAFLERKGYRNVQEENIIKLPKYSLF KLENGRKRLLASARELQKGNEIVLPNHLGTLLYHAKNIHK VDEPKHLDYVDKHKDEFKELLDVVSNFSKKYTLAEGNLEK IKELYAQNNGEDLKELASSFINLLTFTAIGAPATFKFFDKNI DRKRYTSTTEILNATLIHQSITGLYETRIDLNKLGGD	
113	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYL QEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVD EVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFR GHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGV DAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGL TPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYAD LFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQ DLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQ IHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMT NFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRK PAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDI VLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTG WGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHD DSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQT VKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRE RMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGR DMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSD KNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNT KYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYH HAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKM	Streptococcus pyogenes Cas9

	IAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTG GFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAK GYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHY LDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAE NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGD	
114	TKPYSIGLDIGTNSVGWAVTTDNYKVPSKKMKVLGNTSKK YIKKNLLGVLLFDSGITAEGRRLKRTARRRYTRRRNRILYL QEIFSTEMATLDDAFFQRLDDSFLVPDDKRDSKYPIFGNLV EEKAYHDEFPTIYHLRKYLADSTKKADLRLVYLALAHMIK YRGHFLIEGEFNSKNNDIQKNFQDFLDTYNAIFESDLSLENS KQLEEIVKDKISKLEKKDRILKLFPGEKNSGIFSEFLKLIVGN QADFRKCFNLDEKASLHFSKESYDEDLETLLGYIGDDYSDV FLKAKKLYDAILLSGFLTVTDNETEAPLSSAMIKRYNEHKE DLALLKEYIRNISLKTYNEVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQE DFYVYLKKLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTFDNGSIP YQIHLQEMRAILDKQAKFYPFLAKNKERIEKILTFRIPYYVG PLARGNSDFAWSIRKRNEKITPWNFEDVIDKESSAEAFINR MTSFDLYLPEEKVLPKHSLLYETFNVYNELTKVRFIAESMR DYQFLDSKQKKDIVRLYFKDKRKVTDKDIIEYLHAIYGYD GIELKGIEKQFNSSLSTYHDLLNIINDKEFLDDSSNEAIIEEII HTLTIFEDREMIKQRLSKFENIFDKSVLKKLSRRHYTGWGK LSAKLINGIRDEKSGNTILDYLIDDGISNRNFMQLIHDDALS FKKKIQKAQIIGDEDKGNIKEVVKSLPGSPAIKKGILQSIKIV DELVKVMGGRKPESIVVEMARENQYTNQGKSNSQQRLKR LEKSLKELGSKILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYYLQN GKDMYTGDDLDIDRLSNYDIDHIIPQAFLKDNSIDNKVLVS SASNRGKSDDVPSLEVVKKRKTFWYQLLKSKLISQRKFDN LTKAERGGLSPEDKAGFIQRQLVETRQITKHVARLLDEKFN NKKDENNRAVRTVKIITLKSTLVSQFRKDFELYKVREINDF HHAHDAYLNAVVASALLKKYPKLEPEFVYGDYPKYNSFR ERKSATEKVYFYSNIMNIFKKSISLADGRVIERPLIEVNEETG	Streptococcus thermophilus Cas9

	ESVWNKESDLATVRRVLSYPQVNVVKKVEEQNHGLDRGK PKGLFNANLSSKPKPNSNENLVGAKEYLDPKKYGGYAGIS NSFTVLVKGTIEKGAKKKITNVLEFQGISILDRINYRKDKLN FLLEKGYKDIELIIELPKYSLFELSDGSRRMLASILSTNNKRG EIHKGNQIFLSQKFVKLLYHAKRISNTINENHRKYVENHKK EFEELFYYILEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSWQNHSIDEL CSSFIGPTGSERKGLFELTSRGSAADFEFLGVKIPRYRDYTPS SLLKDATLIHQSVTGLYETRIDLAKLGEG	
115	KKPYTIGLDIGTNSVGWAVLTDQYDLVKRKMKIAGDSEKK QIKKNFWGVRLFDEGQTAADRRMARTARRRIERRRNRISY LQGIFAEEMSKTDANFFCRLSDSFYVDNEKRNSRHPFFATIE EEVEYHKNYPTIYHLREELVNSSEKADLRLVYLALAHIIKY RGNFLIEGALDTQNTSVDGIYKQFIQTYNQVFASGIEDGSLK KLEDNKDVAKILVEKVTRKEKLERILKLYPGEKSAGMFAQ FISLIVGSKGNFQKPFDLIEKSDIECAKDSYEEDLESLLALIG DEYAELFVAAKNAYSAVVLSSIITVAETETNAKLSASMIER FDTHEEDLGELKAFIKLHLPKHYEEIFSNTEKHGYAGYIDG KTKQADFYKYMKMTLENIEGADYFIAKIEKENFLRKQRTF DNGAIPHQLHLEELEAILHQQAKYYPFLKENYDKIKSLVTF RIPYFVGPLANGQSEFAWLTRKADGEIRPWNIEEKVDFGKS AVDFIEKMTNKDTYLPKENVLPKHSLCYQKYLVYNELTKV RYINDQGKTSYFSGQEKEQIFNDLFKQKRKVKKKDLELFLR NMSHVESPTIEGLEDSFNSSYSTYHDLLKVGIKQEILDNPVN TEMLENIVKILTVFEDKRMIKEQLQQFSDVLDGVVLKKLER RHYTGWGRLSAKLLMGIRDKQSHLTILDYLMNDDGLNRN LMQLINDSNLSFKSIIEKEQVTTADKDIQSIVADLAGSPAIKK GILQSLKIVDELVSVMGYPPQTIVVEMARENQTTGKGKNN SRPRYKSLEKAIKEFGSQILKEHPTDNQELRNNRLYLYYLQ NGKDMYTGQDLDIHNLSNYDIDHIVPQSFITDNSIDNLVLTS SAGNREKGDDVPPLEIVRKRKVFWEKLYQGNLMSKRKFD YLTKAERGGLTEADKARFIHRQLVETRQITKNVANILHQRF NYEKDDHGNTMKQVRIVTLKSALVSQFRKQFQLYKVRDV NDYHHAHDAYLNGVVANTLLKVYPQLEPEFVYGDYHQFD WFKANKATAKKQFYTNIMLFFAQKDRIIDENGEILWDKKY LDTVKKVMSYRQMNIVKKTEIQKGEFSKATIKPKGNSSKLI	Listeria innocua Cas9

	PRKTNWDPMKYGGLDSPNMAYAVVIEYAKGKNKLVFEK KIIRVTIMERKAFEKDEKAFLEEQGYRQPKVLAKLPKYTLY ECEEGRRRMLASANEAQKGNQQVLPNHLVTLLHHAANCE VSDGKSLDYIESNREMFAELLAHVSEFAKRYTLAEANLNKI NQLFEQNKEGDIKAIAQSFVDLMAFNAMGAPASFKFFETTI ERKRYNNLKELLNSTIIYQSITGLYESRKRLDD	
116	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLG VRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRT RRLLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKL TPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGV AGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHT FSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQR PALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKL NNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLL GLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEG LKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEI LEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIY GDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVING VVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDRE KAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGK EINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQ NKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRI LLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKG KKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVV ACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKT HFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLA EKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSAK RLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNREREPKLYEALKAR LEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQK TGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQ VAKGILPDRAVVQGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVE VITKKARMFGYFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGI GVKTALSFQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVR	Neisseria meningitidis Cas9
117	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY	Streptococcus pyogenes Cas9

	LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
118	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACAT CGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGC AATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAA	промотор EF1альфа

	CTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCC GAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCACTAGTCGC CGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAAC ACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCT CTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCC ACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGG GTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGTGGCCTTGCGCTTAA GGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGTGGCCTGGCCT GGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTT CGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTT AAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCAGCACACTGG TATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCG TGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCG AGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAG CTGCCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGT GTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGG CACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCC CTGCTGCAGGGAGCACAAAATGGAGGACGCGGCGCTCG GGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAG GGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACG GAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCC AGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGG TTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAG ACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC TTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTC TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATT TCAGGTGTCGTGAAAACTACCCCTAAAAGCCAAA	
119	GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGC GCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCT TTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCC	промотор Ef1альфа с HTLV1 энхансером

	TTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACG CCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGC CTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCT CAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAG CCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGAC CCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTC TGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTAC	
120	GGATCTGGAGCGACGAATTTTAGTCTACTGAAACAAGCG GGAGACGTGGAGGAAAACCCTGGACCT	P2A нуклеотидная последовательность
121	atggataaaaagtacagcatcgggctggacatcggtacaaactcagtggggtgggccgtgat tacggacgagtacaaggtaccctccaaaaaatttaaagtgctgggtaacacggacagacact ctataaagaaaaatcttattggagccttgctgttcgactcaggcgagacagccgaagccacaa ggttgaagcggaccgccaggaggcggtataccaggagaaagaaccgcatatgctacctgca agaaatcttcagtaacgagatggcaaaggttgacgatagctttttccatcgcctggaagaatcct ttcttgttgaggaagacaagaagcacgaacggcaccccatctttggcaatattgtcgacgaagt ggcatatcacgaaaagtacccgactatctaccacctcaggaagaagctggtggactctaccg ataaggcggacctcagacttatttatttggcactcgcccacatgattaaatttagaggacatttctt gatcgagggcgacctgaacccggacaacagtgacgtcgataagctgttcatccaacttgtgc agacctacaatcaactgttcgaagaaaaccctataaatgcttcaggagtcgacgctaaagcaat cctgtccgcgcgcctctcaaaatctagaagacttgagaatctgattgctcagttgcccggggaa aagaaaaatggattgtttggcaacctgatcgccctcagtctcggactgaccccaaatttcaaaa gtaacttcgacctggccgaagacgctaagctccagctgtccaaggacacatacgatgacgac ctcgacaatctgctggcccagattggggatcagtacgccgatctcttttggcagcaaagaacc tgtccgacgccatcctgttgagcgatatcttgagagtgaacaccgaaattactaaagcacccct tagcgcatctatgatcaagcggtacgacgagcatcatcaggatctgaccctgctgaaggctctt gtgaggcaacagctccccgaaaaatacaaggaaatcttctttgaccagagcaaaaacggcta cgctggctatatagatggtggggccagtcaggaggaattctataaattcatcaagcccattctc gagaaaatggacggcacagaggagttgctggtcaaacttaacagggaggacctgctgcgga agcagcggacctttgacaacgggtctatcccccaccagattcatctgggcgaactgcacgca atcctgaggaggcaggaggatttttatccttttcttaaagataaccgcgagaaaatagaaaagat tcttacattcaggatcccgtactacgtgggacctctcgcccggggcaattcacggtttgcctgg atgacaaggaagtcagaggagactattacaccttggaacttcgaagaagtggtggacaaggg tgcatctgcccagtctttcatcgagcggatgacaaattttgacaagaacctccctaatgagaag	S. pyogenes Cas9 кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты

	gtgctgcccaaacattctctgctctacgagtactttaccgtctacaatgaactgactaaagtcaa gtacgtcaccgagggaatgaggaagccggcattccttagtggagaacagaagaaggcgatt gtagacctgttgttcaagaccaacaggaaggtgactgtgaagcaacttaaagaagactacttta agaagatcgaatgttttgacagtgtggaaatttcaggggttgaagaccgcttcaatgcgtcattg gggacttaccatgatcttctcaagatcataaaggacaaagacttcctggacaacgaagaaaat gaggatattctcgaagacatcgtcctcaccctgaccctgttcgaagacagggaaatgatagaa gagcgcttgaaaacctatgcccacctcttcgacgataaagttatgaagcagctgaagcgcagg agatacacaggatggggaagattgtcaaggaagctgatcaatggaattagggataaacagag tggcaagaccatactggatttcctcaaatctgatggcttcgccaataggaacttcatgcaactga ttcacgatgactctcttaccttcaaggaggacattcaaaaggctcaggtgagcgggcagggag actcccttcatgaacacatcgcgaatttggcaggttcccccgctattaaaaagggcatccttcaa actgtcaaggtggtggatgaattggtcaaggtaatgggcagacataagccagaaaatattgtg atcgagatggcccgcgaaaaccagaccacacagaagggccagaaaaatagtagagagcg gatgaagaggatcgaggagggcatcaaagagctgggatctcagattctcaaagaacacccc gtagaaaacacacagctgcagaacgaaaaattgtacttgtactatctgcagaacggcagaga catgtacgtcgaccaagaacttgatattaatagactgtccgactatgacgtagaccatatcgtgc cccagtccttcctgaaggacgactccattgataacaaagtcttgacaagaagcgacaagaaca ggggtaaaagtgataatgtgcctagcgaggaggtggtgaaaaaaatgaagaactactggcg acagctgcttaatgcaaagctcattacacaacggaagttcgataatctgacgaaagcagagag aggtggcttgtctgagttggacaaggcagggtttattaagcggcagctggtggaaactaggca gatcacaaagcacgtggcgcagattttggacagccggatgaacacaaaatacgacgaaaat gataaactgatacgagaggtcaaagttatcacgctgaaaagcaagctggtgtccgattttcgga aagacttccagttctacaaagttcgcgagattaataactaccatcatgctcacgatgcgtacctg aacgctgttgtcgggaccgccttgataaagaagtacccaaagctggaatccgagttcgtatac ggggattacaaagtgtacgatgtgaggaaaatgatagccaagtccgagcaggagattggaaa ggccacagctaagtacttcttttattctaacatcatgaatttttttaagacggaaattaccctggcc aacggagagatcagaaagcggcccccttatagagacaaatggtgaaacaggtgaaatcgtctg ggataagggcagggatttcgctactgtgaggaaggtgctgagtatgccacaggtaaatatcgt gaaaaaaaccgaagtacagaccggaggattttccaaggaaagcattttgcctaaaagaaactc agacaagctcatcgcccgcaagaaagattgggaccctaagaaatacgggggatttgactcac ccaccgtagcctattctgtgctggtggtagctaaggtggaaaaaggaaagtctaagaagctga agtccgtgaaggaactcttgggaatcactatcatggaaagatcatcctttgaaaagaaccctat cgatttcctggaggctaagggttacaaggaggtcaagaaagacctcatcattaaactgccaaa atactctctcttcgagctggaaaatggcaggaagagaatgttggccagcgccggagagctgc aaaagggaaacgagcttgctctgccctccaaatatgttaattttctctatctcgcttcccactatga	

	aaagctgaaagggtctcccgaagataacgagcagaagcagctgttcgtcgaacagcacaag cactatctggatgaaataatcgaacaaataagcgagttcagcaaaagggttatcctggcggat gctaatttggacaaagtactgtctgcttataacaagcaccgggataagcctattagggaacaag ccgagaatataattcacctctttacactcacgaatctcggagcccccgccgccttcaaatacttt gatacgactatcgaccggaaacggtataccagtaccaaagaggtcctcgatgccaccctcatc caccagtcaattactggcctgtacgaaacacggatcgacctctctcaactgggcggcgactag	
122	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL	S. pyogenes Cas9

	EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
123	atggccgccttcaagcccaaccccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatcgccag cgtgggctgggccatggtggagatcgacgaggacgagaaccccatctgcctgatcgacctg ggtgtgcgcgtgttcgagcgcgctgaggtgcccaagactggtgacagtctggctatggctcg ccggcttgctcgctctgttcggcgccttactcgccggcgcgctcaccgccttctgcgcgctcg ccgcctgctgaagcgcgagggtgtgctgcaggctgccgacttcgacgagaacggcctgatc aagagcctgcccaacactccttggcagctgcgcgctgccgctctggaccgcaagctgactcc tctggagtggagcgccgtgctgctgcacctgatcaagcaccgcggctacctgagccagcgc aagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggtgctctgctgaagggcgtggccga caacgcccacgccctgcagactggtgacttccgcactcctgctgagctggccctgaacaagtt cgagaaggagagcggccacatccgcaaccagcgcggcgactacagccacaccttcagcc gcaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaaccc ccacgtgagcggcggcctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccagcgccccgc cctgagcggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgcaccttcgagccagccgagcc caaggccgccaagaacacctacaccgccgagcgcttcatctggctgaccaagctgaacaac ctgcgcatcctggagcagggcagcgagcgccccctgaccgacaccgagcgcgccaccctg atggacgagccctaccgcaagagcaagctgacctacgcccaggcccgcaagctgctgggt ctggaggacaccgccttcttcaagggcctgcgctacggcaaggacaacgccgaggccagc accctgatggagatgaaggcctaccacgccatcagccgcgccctggagaaggagggcctg aaggacaagaagagtcctctgaacctgagccccgagctgcaggacgagatcggcaccgcc ttcagcctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccgcctgaaggaccgcatccagcccg agatcctggaggccctgctgaagcacatcagcttcgacaagttcgtgcagatcagcctgaag gccctgcgccgcatcgtgcccctgatggagcagggcaagcgctacgacgaggcctgcgcc gagatctacggcgaccactacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgcctcctat ccccgccgacgagatccgcaaccccgtggtgctgcgcgccctgagccaggcccgcaaggt gatcaacggcgtggtgcgccgctacggcagccccgcccgcatccacatcgagaccgcccg cgaggtgggcaagagcttcaaggaccgcaaggagatcgagaagcgccaggaggagaacc gcaaggaccgcgagaaggccgccgccaagttccgcgagtacttccccaacttcgtgggcga gcccaagagcaaggacatcctgaagctgcgcctgtacgagcagcagcacggcaagtgcct gtacagcggcaaggagatcaacctgggccgcctgaacgagaagggctacgtggagatcga ccacgccctgcccttcagccgcacctgggacgacagcttcaacaacaaggtgctggtgctgg	N. meningitidis Cas9 кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты

	gcagcgagaaccagaacaagggcaaccagacccctacgagtacttcaacggcaaggaca acagccgcgagtggcaggagttcaaggcccgcgtggagaccagccgcttccccgcagca agaagcagcgcatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagcgcaacctgaa cgacacccgctacgtgaaccgcttcctgtgccagttcgtggccgaccgcatgcgcctgaccg gcaagggcaagaagcgcgtgttcgccagcaacggccagatcaccaacctgctgcgcggctt ctggggcctgcgcaaggtgcgcgccgagaacgaccgccaccacgccctggacgccgtggt ggtggcctgcagcaccgtggccatgcagcagaagatcacccgcttcgtgcgctacaaggag atgaacgccttcgacggtaaaaccatcgacaaggagaccggcgaggtgctgcaccagaag acccacttcccccagccctgggagttcttcgcccaggaggtgatgatccgcgtgttcggcaag cccgacggcaagcccgagttcgaggaggccgacacccccgagaagctgcgcaccctgctg gccgagaagctgagcagccgccctgaggccgtgcacgagtacgtgactcctctgttcgtgag ccgcgcccccaaccgcaagatgagcggtcagggtcacatggagaccgtgaagagcgccaa gcgcctggacgagggcgtgagcgtgctgcgcgtgcccctgacccagctgaagctgaagga cctggagaagatggtgaaccgcgagcgcgagcccaagctgtacgaggccctgaaggcccg cctggaggcccacaaggacgaccccgccaaggccttcgccgagcccttctacaagtacgac aaggccggcaaccgcacccagcaggtgaaggccgtgcgcgtggagcaggtgcagaagac cggcgtgtgggtgcgcaaccacaacggcatcgccgacaacgccaccatggtgcgcgtgga cgtgttcgagaagggcgacaagtactacctggtgcccatctacagctggcaggtggccaagg gcatcctgcccgaccgcgccgtggtgcagggcaaggacgaggaggactggcagctgatcg acgacagcttcaacttcaagttcagcctgcaccccaacgacctggtggaggtgatcaccaag aaggcccgcatgttcggctacttcgccagctgccaccgcggcaccggcaacatcaacatccg catccacgacctggaccacaagatcggcaagaacggcatcctggagggcatcggcgtgaa gaccgccctgagcttccagaagtaccagatcgacgagctgggcaaggagatccgcccctgc cgcctgaagaagcgccctcctgtgcgctaa	
124	MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEDENPICLIDLG VRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRA RRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKL TPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGV ADNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHT FSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQR PALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKL NNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLL GLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEG LKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEI LEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIY	N. meningitidis Cas9

	GDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVING VVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDRE KAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGK EINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQ NKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRI LLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKG KKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVV ACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKT HFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLA EKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSAK RLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNREREPKLYEALKAR LEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQK TGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQ VAKGILPDRAVVQGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVE VITKKARMFGYFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGI GVKTALSFQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVR	
125	atgaaaaggaactacattctggggctggacatcgggattacaagcgtggggtatgggattatt gactatgaaacaagggacgtgatcgacgcaggcgtcagactgttcaaggaggccaacgtgg aaaacaatgagggacggagaagcaagaggggagccaggcgcctgaaacgacggagaag gcacagaatccagagggtgaagaaactgctgttcgattacaacctgctgaccgaccattctga gctgagtggaattaatccttatgaagccagggtgaaaggcctgagtcagaagctgtcagagg aagagttttccgcagctctgctgcacctggctaagcgccgaggagtgcataacgtcaatgagg tggaagaggacaccggcaacgagctgtctacaaaggaacagatctcacgcaatagcaaagc tctggaagagaagtatgtcgcagagctgcagctggaacggctgaagaaagatggcgaggtg agagggtcaattaataggttcaagacaagcgactacgtcaaagaagccaagcagctgctgaa agtgcagaaggcttaccaccagctggatcagagcttcatcgatacttatatcgacctgctggag actcggagaacctactatgagggaccaggagaagggagccccttcggatggaaagacatca aggaatggtacgagatgctgatgggacattgcacctattttccagaagagctgagaagcgtca agtacgcttataacgcagatctgtacaacgccctgaatgacctgaacaacctggtcatcacca gggatgaaaacgagaaactggaatactatgagaagttccagatcatcgaaaacgtgtttaagc agaagaaaaagcctacactgaaacagattgctaaggagatcctggtcaacgaagaggacatc aagggctaccgggtgacaagcactggaaaaccagagttcaccaatctgaaagtgtatcacga tattaaggacatcacagcacggaaagaaatcattgagaacgccgaactgctggatcagattgc taagatcctgactatctaccagagctccgaggacatccaggaagagctgactaacctgaaca gcgagctgacccaggaagagatcgaacagattagtaatctgaaggggtacaccggaacaca	S. aureus Cas9 кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты

	caacctgtccctgaaagctatcaatctgattctggatgagctgtggcatacaaacgacaatcag attgcaatctttaaccggctgaagctggtcccaaaaaaggtggacctgagtcagcagaaaga gatcccaaccacactggtggacgatttcattctgtcacccgtggtcaagcggagcttcatccag agcatcaaagtgatcaacgccatcatcaagaagtacggcctgcccaatgatatcattatcgag ctggctagggagaagaacagcaaggacgcacagaagatgatcaatgagatgcagaaacga aaccggcagaccaatgaacgcattgaagagattatccgaactaccgggaaagagaacgcaa agtacctgattgaaaaaatcaagctgcacgatatgcaggagggaaagtgtctgtattctctgga ggccatccccctggaggacctgctgaacaatccattcaactacgaggtcgatcatattatcccc agaagcgtgtccttcgacaattcctttaacaacaaggtgctggtcaagcaggaagagaactct aaaaagggcaataggactcctttccagtacctgtctagttcagattccaagatctcttacgaaac ctttaaaaagcacattctgaatctggccaaaggaaagggccgcatcagcaagaccaaaaagg agtacctgctggaagagcgggacatcaacagattctccgtccagaaggattttattaaccgga atctggtggacacaagatacgctactcgcggcctgatgaatctgctgcgatcctatttccgggt gaacaatctggatgtgaaagtcaagtccatcaacggcgggttcacatcttttctgaggcgcaaa tggaagtttaaaaaggagcgcaacaaagggtacaagcaccatgccgaagatgctctgattatc gcaaatgccgacttcatctttaaggagtggaaaaagctggacaaagccaagaaagtgatgga gaaccagatgttcgaagagaagcaggccgaatctatgcccgaaatcgagacagaacagga gtacaaggagattttcatcactcctcaccagatcaagcatatcaaggatttcaaggactacaagt actctcaccgggtggataaaaagcccaacagagagctgatcaatgacaccctgtatagtacaa gaaaagacgataaggggaataccctgattgtgaacaatctgaacggactgtacgacaaagat aatgacaagctgaaaaagctgatcaacaaaagtcccgagaagctgctgatgtaccaccatgat cctcagacatatcagaaactgaagctgattatggagcagtacggcgacgagaagaacccact gtataagtactatgaagagactgggaactacctgaccaagtatagcaaaaaggataatggccc cgtgatcaagaagatcaagtactatgggaacaagctgaatgcccatctggacatcacagacg attaccctaacagtcgcaacaaggtggtcaagctgtcactgaagccatacagattcgatgtcta tctggacaacggcgtgtataaatttgtgactgtcaagaatctggatgtcatcaaaaaggagaac tactatgaagtgaatagcaagtgctacgaagaggctaaaaagctgaaaaagattagcaacca ggcagagttcatcgcctccttttacaacaacgacctgattaagatcaatggcgaactgtatagg gtcatcggggtgaacaatgatctgctgaaccgcattgaagtgaatatgattgacatcacttacc gagagtatctggaaaacatgaatgataagcgcccccctcgaattatcaaaacaattgcctctaa gactcagagtatcaaaaagtactcaaccgacattctgggaaacctgtatgaggtgaagagcaa aaagcaccctcagattatcaaaaagggc	
126	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVE NNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSE LSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNE	S. aureus Cas9

	VEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEV RGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLL ETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELR SVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIEN VFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLK VYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNL NSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDN QIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQ SIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRN RQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEA IPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSK KGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKE YLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFR VNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAED ALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEI ETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELIND TLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEK LLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYL TKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVV KLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSK CYEEAKKLKKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNND LLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKY STDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	
127	ATTGCACTCATCAGAGCTAC	*TGFBR2* последовательность-мишень 9
128	CCTAGAGTGAAGAGATTCAT	*TGFBR2* последовательность-мишень 10
129	CCAATGAATCTCTTCACTCT	*TGFBR2* последовательность-мишень 11
130	AAAGTCATGGTAGGGGAGCT	*TGFBR2*

		последовательность-мишень 12
131	GTGAGCAATCCCCCGGGCGA	*TGFBR2* последовательность-мишень 13
132	GTCGTTCTTCACGAGGATAT	*TGFBR2* последовательность-мишень 14
133	GCCGCGTCAGGTACTCCTGT	*TGFBR2* последовательность-мишень 15
134	GACGCGGCATGTCATCAGCT	*TGFBR2* последовательность-мишень 16
135	GCTTCTGCTGCCGGTTAACG	*TGFBR2* последовательность-мишень 17
136	GTGGATGACCTGGCTAACAG	*TGFBR2* последовательность-мишень 18
137	GTGATCACACTCCATGTGGG	*TGFBR2* последовательность-мишень 19
138	GCCCATTGAGCTGGACACCC	*TGFBR2* последовательность-мишень

		20
139	GCGGTCATCTTCCAGGATGA	*TGFBR2* последовательность-мишень 21
140	GGGAGCTGCCCAGCTTGCGC	*TGFBR2* последовательность-мишень 22
141	GTTGATGTTGTTGGCACACG	*TGFBR2* последовательность-мишень 23
142	GGCATCTTGGGCCTCCCACA	*TGFBR2* последовательность-мишень 24
143	GCGGCATGTCATCAGCTGGG	*TGFBR2* последовательность-мишень 25
144	GCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	*TGFBR2* последовательность-мишень 26
145	GCTGGTGTTATATTCTGATG	*TGFBR2* последовательность-мишень 27
146	CCGACTTCTGAACGTGCGGT	*TGFBR2* последовательность-мишень 28
147	TGCTGGCGATACGCGTCCAC	*TGFBR2*

		последовательность-мишень 29
148	CCCGACTTCTGAACGTGCGG	*TGFBR2* последовательность-мишень 30
149	CCACCGCACGTTCAGAAGTC	*TGFBR2* последовательность-мишень 31
150	TCACCCGACTTCTGAACGTG	*TGFBR2* последовательность-мишень 32
151	CCCACCGCACGTTCAGAAGT	*TGFBR2* последовательность-мишень 33
152	CGAGCAGCGGGGTCTGCCAT	*TGFBR2* последовательность-мишень 34
153	ACGAGCAGCGGGGTCTGCCA	*TGFBR2* последовательность-мишень 35
154	AGCGGGGTCTGCCATGGGTC	*TGFBR2* последовательность-мишень 36
155	CCTGAGCAGCCCCCGACCCA	*TGFBR2* последовательность-мишень

		37
156	AACGTGCGGTGGGATCGTGC	*TGFBR2* последовательность-мишень 38
157	GGACGATGTGCAGCGGCCAC	*TGFBR2* последовательность-мишень 39
158	GTCCACAGGACGATGTGCAG	*TGFBR2* последовательность-мишень 40
159	CATGGGTCGGGGGCTGCTCA	*TGFBR2* последовательность-мишень 41
160	CCATGGGTCGGGGGCTGCTC	*TGFBR2* последовательность-мишень 42
161	CAGCGGGGTCTGCCATGGGT	*TGFBR2* последовательность-мишень 43
162	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAG	*TGFBR2* последовательность-мишень 44
163	CGGGGTCTGCCATGGGTCGG	*TGFBR2* последовательность-мишень 45
164	AGGAAGTCTGTGTGGCTGTA	*TGFBR2*

		последовательность-мишень 46
165	CTCCATCTGTGAGAAGCCAC	*TGFBR2* последовательность-мишень 47
166	ATGATAGTCACTGACAACAA	*TGFBR2* последовательность-мишень 48
167	GATGCTGCAGTTGCTCATGC	*TGFBR2* последовательность-мишень 49
168	ACAGCCACACAGACTTCCTG	*TGFBR2* последовательность-мишень 50
169	GAAGCCACAGGAAGTCTGTG	*TGFBR2* последовательность-мишень 51
170	TTCCTGTGGCTTCTCACAGA	*TGFBR2* последовательность-мишень 52
171	CTGTGGCTTCTCACAGATGG	*TGFBR2* последовательность-мишень 53
172	TCACAAAATTTACACAGTTG	*TGFBR2* последовательность-мишень

		54
173	CCCCTACCATGACTTTATTC	*TGFBR2* последовательность-мишень 55
174	CCAGAATAAAGTCATGGTAG	*TGFBR2* последовательность-мишень 56
175	GACAACATCATCTTCTCAGA	*TGFBR2* последовательность-мишень 57
176	TCCAGAATAAAGTCATGGTA	*TGFBR2* последовательность-мишень 58
177	GGTAGGGGAGCTTGGGGTCA	*TGFBR2* последовательность-мишень 59
178	TTCTCCAAAGTGCATTATGA	*TGFBR2* последовательность-мишень 60
179	CATCTTCCAGAATAAAGTCA	*TGFBR2* последовательность-мишень 61
180	CACATGAAGAAAGTCTCACC	*TGFBR2* последовательность-мишень 62
181	TTCCAGAATAAAGTCATGGT	*TGFBR2*

		последовательность-мишень 63
182	TTTTCCTTCATAATGCACTT	*TGFBR2* последовательность-мишень 64
183	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG2 Fc человека (Uniprot P01859)
184	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	IgG4 Fc человека (Uniprot P01861)
185	tgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttttttaaa	SV40 поли A сигнал
186	gaacagagaaacaggagaatatgggccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagttggaacagcagaatatgggccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagagaaccatcagatgtttccagggtgccccaaggacctgaaatgaccctgtgccttatttgaactaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatc	MND промотор
187	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTY	Спейсер

	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
188	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIY GVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	CD3дзета изоформа 1 последовательность белка-предшественника (NCBI Эталонная последовательность: NP_932170.1)
189	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIY GVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	CD3 дзета изоформа 2 последовательность белка-предшественника (NCBI Эталонная последовательность: NP_000725.1)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически сконструированная Т-клетка, содержащая модифицированный локус рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (TGFBR2), указанный модифицированный локус TGFBR2 содержит трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть.

2. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 1, отличающаяся тем, что трансгенная последовательность интегрирована в эндогенный локус TGFBR2 Т-клетки, необязательно посредством репарации, направляемой гомологией (HDR).

3. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что модифицированный локус TGFBR2:

не кодирует функциональный полипептид TGFBRII;

не кодирует полипептид TGFBRII или экспрессия полипептида TGFBRII исключена;

не кодирует полноразмерный полипептид TGFBRII; и/или

кодирует доминантно-негативный полипептид TGFBRII, необязательно, где доминантно-негативный полипептид TGFBRII содержит аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей остаткам 22-191 SEQ ID NO: 59 или остаткам 22-216 SEQ ID NO: 60 или их фрагменту.

4. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что трансгенная последовательность находится внутри рамки с одним или несколькими экзонами открытой рамки считывания или ее частичной последовательностью, эндогенного TGFBR2.

5. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что трансгенная последовательность расположена ниже экзона 1 и выше экзона 6 открытой рамки считывания эндогенного локуса TGFBR2.

6. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что трансгенная последовательность расположена ниже экзона 4 и выше экзона 6 открытой рамки считывания эндогенного локуса TGFBR2.

7. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что рекомбинантный рецептор является или содержит рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), и трансгенная последовательность кодирует TCR альфа цепи (TCRα), TCR бета цепи (TCRβ) или оба.

8. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит внеклеточную область, содержащую связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточную область.

9. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 8, отличающаяся тем, что связывающий домен является или содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

10. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 8 или 9, отличающаяся тем, что связывающий домен способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован, специфичен или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния, необязательно, где антигеном-мишенью является опухолевый антиген.

11. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 10, отличающаяся тем, что антиген-мишень выбран из интегрина (avb6 интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22Rα), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13Rα2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана A (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как

допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемого антигена, или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

12. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 8-11, отличающаяся тем, что внеклеточная область содержит спейсер, необязательно, где спейсер функционально связан между связывающим доменом и трансмембранным доменом.

13. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 12, отличающаяся тем, что спейсер содержит шарнирную область иммуноглобулина и/или область C_H2 и область C_H3.

14. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 8-13, отличающаяся тем, что внутриклеточная область содержит внутриклеточный сигнальный домен.

15. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 14, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен является или содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3 цепи, необязательно CD3-дзета цепи (CD3ζ) или ее сигнальную часть.

16. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 8-15, отличающаяся тем, что внутриклеточная область содержит один или несколько костимулирующих сигнальных доменов.

17. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 16, отличающаяся тем, что один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть.

18. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что

трансгенная последовательность содержит в следующем порядке: последовательность нуклеотидов, кодирующих связывающий домен, необязательно одноцепочечный фрагмент Fv (scFv); спейсер, необязательно содержащий последовательность из шарнира иммуноглобулина человека, необязательно из IgG1, IgG2 или IgG4 или их модифицированной версии, необязательно, дополнительно включающий область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, необязательно из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, необязательно из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, необязательно CD3ζ цепь или ее часть; и/или

модифицированный локус TGFBR2 содержит в следующем порядке: последовательность нуклеотидов, кодирующую связывающий домен, необязательно scFv; спейсер, необязательно содержащий последовательность из шарнира иммуноглобулина человека, необязательно из IgG1, IgG2 или IgG4 или их модифицированной версии, необязательно дополнительно включающий область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, необязательно, из CD28 человека; костимулирующий

сигнальный домен, необязательно, из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, необязательно CD3ζ цепь или ее часть.

19. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-18, отличающаяся тем, что трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих, по меньшей мере, один дополнительный белок.

20. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 19, отличающаяся тем, что, по меньшей мере, одним дополнительным белком является суррогатный маркер, необязательно, где суррогатным маркером является усеченный рецептор, необязательно где усеченный рецептор не имеет внутриклеточный сигнальный домен и/или не способен опосредовать внутриклеточную передачу сигналов при связывании его лигандом.

21. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-20, отличающаяся тем, что трансгенная последовательность содержит один или несколько мультицистронных элементов.

22. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 21, отличающаяся тем, что:

трансгенная последовательность содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть, и один или несколько мультицистронных элементов расположены выше последовательности нуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть; и/или расположены между последовательностью нуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор или его часть, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей, по меньшей мере, один дополнительный белок; и/или

рекомбинантным рецептором является TCR, и один или несколько мультицистронных элементов расположены между последовательностью нуклеотидов, кодирующих TCRα, и последовательностью нуклеотидов, кодирующих TCRβ; и/или

рекомбинантным рецептором является CAR, которым является мультицепочечный CAR, и один или несколько мультицистронных элементов расположены между последовательностью нуклеотидов, кодирующих одну цепь мультицепочечного CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующих другую цепь мультицепочечного CAR.

23. Генетически сконструированная Т-клетка по п. 21 или 22, отличающаяся тем, что один или несколько мультицистронных элементов представляют собой или содержат последовательность проскока рибосомы, необязательно где последовательностью проскока рибосомы является элемент T2A, P2A, E2A или F2A.

24. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-23, отличающаяся тем, что модифицированный локус TGFBR2 содержит промотор и/или регуляторный или контрольный элемент эндогенного локуса TGFBR2, функционально связанный для контроля экспрессии трансгенной последовательности, кодирующей рекомбинантный рецептор или его часть; или модифицированный локус TGFBR2 содержит один или несколько гетерологичных регуляторных или контрольных элементов, функционально связанных с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора или его части.

25. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-24, отличающаяся

тем, что Т-клеткой является первичная Т-клетка, полученная от субъекта, необязательно, где субъектом является человек.

26. Генетически сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-25, отличающаяся тем, что Т-клеткой является CD8+ Т-клетка или ее подтипы, или CD4+ Т-клетка или ее подтипы.

27. Полинуклеотид, содержащий:

(a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть; и

(b) одно или несколько плеч гомологии, связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, где одно или несколько плеч гомологии содержат последовательность, гомологичную одной или нескольким областям открытой рамки считывания локуса рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа-2 (TGFBR2).

28. Полинуклеотид по п. 27, отличающийся тем, что последовательностью нуклеиновой кислоты из (a) является последовательность, которая является экзогенной или гетерологичной по отношению к открытой рамке считывания эндогенного локуса TGFBR2 Т-клетки, необязательно, Т-клетки человека.

29. Полинуклеотид по п. 27 или 28, отличающийся тем, что одно или несколько плеч гомологии содержат, по меньшей мере, один интрон или, по меньшей мере, один экзон открытой рамки считывания локуса TGFBR2 Т-клетки, необязательно, Т-клетки человека.

30. Полинуклеотид по любому из пп. 27-29, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты из (a) находится внутри рамки с одним или несколькими экзонами открытой рамки считывания локуса TGFBR2, содержащегося в одном или нескольких плечах гомологии.

31. Полинуклеотид по любому из пп. 27-30, отличающийся тем, что одной или несколькими областями открытой рамки считывания являются последовательности, расположенные ниже экзона 1 открытой рамки считывания локуса TGFBR2, или содержат их.

32. Полинуклеотид по любому из пп. 27-31, отличающийся тем, что одна или несколько областей открытой рамки считывания являются или содержат последовательности, которые содержат, по меньшей мере, часть экзона 4 или ниже экзона 4 открытой рамки считывания локуса TGFBR2.

33. Полинуклеотид по любому из пп. 27-32, отличающийся тем, что одно или несколько плеч гомологии содержит 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии, и полинуклеотид содержит структуру [5' плечо гомологии]-[последовательность нуклеиновой кислоты из (a)]-[3’ плечо гомологии].

34. Полинуклеотид по п. 33, отличающийся тем, что 5’ плечо гомологии и 3' плечо гомологии независимо имеют длину точно примерно 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 нуклеотидов или любое значение между любыми из вышеперечисленных, или имеют

длину больше чем точно или примерно 300 нуклеотидов, необязательно, имеют длину точно примерно 400, 500 или 600 нуклеотидов или любое значение между любыми из вышеперечисленных.

35. Полинуклеотид по п. 33 или 34, отличающийся тем, что 5' плечо гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 69-71, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90. %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 69-71 или ее частичной последовательностью, и/или 3' плечо гомологии содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 72, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72 или ее частичной последовательностью.

36. Полинуклеотид по любому из пп. 27-35, отличающийся тем, что кодированный рекомбинантный рецептор является или содержит рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR), и последовательность нуклеиновой кислоты из (a) кодирует TCR-альфа цепь (TCRα), TCR-бета цепь (TCRβ) или обе.

37. Полинуклеотид по любому из пп. 27-35, отличающийся тем, что кодированным рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит внеклеточную область, содержащую связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточную область.

38. Полинуклеотид по п. 37, отличающийся тем, что связывающий домен является или содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

39. Полинуклеотид по п. 37 или 38, отличающийся тем, что связывающий домен способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован, специфичен или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, нарушения или состояния, необязательно, где антигеном-мишенью является опухолевый антиген.

40. Полинуклеотид по п. 39, отличающийся тем, что антиген-мишень выбран из интегрина (avb6 интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100),

глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22Rα), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13Rα2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана A (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемого антигена, или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

41. Полинуклеотид по любому из пп. 37-40, отличающийся тем, что внеклеточная область содержит спейсер, необязательно, где спейсер функционально связан между связывающим доменом и трансмембранным доменом.

42. Полинуклеотид по п. 41, отличающийся тем, что спейсер содержит шарнирную область иммуноглобулина и/или область C_H2 и область C_H3.

43. Полинуклеотид по любому из пп. 37-42, отличающийся тем, что внутриклеточная область содержит внутриклеточный сигнальный домен.

44. Полинуклеотид по п. 43, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен является или содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3 цепи, необязательно CD3-дзета цепи (CD3ζ) или ее сигнальную часть.

45. Полинуклеотид по любому из пп. 37-44, отличающийся тем, что внутриклеточная область содержит один или несколько костимулирующих сигнальных доменов.

46. Полинуклеотид по п. 45, отличающийся тем, что один или несколько костимулирующих сигнальных доменов содержат внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальную часть.

47. Полинуклеотид по любому из пп. 27-46, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты из (a) содержит, по порядку: последовательность нуклеотидов, кодирующую связывающий домен, необязательно одноцепочечный фрагмент Fv (scFv); спейсер, необязательно содержащий последовательность из шарнира иммуноглобулина человека, необязательно из IgG1, IgG2 или IgG4 или их модифицированной версии, необязательно, дополнительно включающий область C_H2 и/или область C_H3; и трансмембранный домен, необязательно из CD28 человека; костимулирующий сигнальный домен, необязательно из 4-1BB человека; и внутриклеточную сигнальную область, необязательно CD3ζ цепь или ее часть.

48. Полинуклеотид по любому из пп. 27-47, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты из (a) содержит последовательность нуклеотидов, кодирующих, по меньшей мере, один дополнительный белок.

49. Полинуклеотид по п. 48, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одним дополнительным белком является суррогатный маркер, необязательно, где суррогатным маркером является усеченный рецептор, необязательно, где усеченный рецептор не имеет внутриклеточный сигнальный домен и/или не способен опосредовать внутриклеточную передачу сигналов при связывании его лигандом.

50. Полинуклеотид по любому из пп. 27-49, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты из (a) содержит один или несколько мультицистронных элементов.

51. Полинуклеотид по п. 50, отличающийся тем, что:

последовательность нуклеиновой кислоты из (a) содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, и один или несколько мультицистронных элементов расположены выше последовательности нуклеотидов, кодирующей рекомбинантный рецептор или его часть; и/или расположен между последовательностью нуклеотидов, кодирующей рекомбинантный рецептор или его часть, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей, по меньшей мере, один дополнительный белок; и/или

рекомбинантным рецептором является TCR, и один или несколько мультицистронных элементов расположены между последовательностью нуклеотидов, кодирующей TCRα, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей TCRβ; и/или

рекомбинантным рецептором является CAR, которым является мультицепочечный CAR, и один или несколько мультицистронных элементов расположены между последовательностью нуклеотидов, кодирующей одну цепь мультицепочечного CAR, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей другую цепь мультицепочечного CAR.

52. Полинуклеотид по п. 50 или 51, отличающийся тем, что один или несколько полицистронных элементов являются или содержат последовательность проскока рибосомы, необязательно, где последовательностью проскока рибосомы является элемент T2A, P2A, E2A или F2A.

53. Полинуклеотид по любому из пп. 27-52, отличающийся тем, что

последовательность нуклеиновой кислоты из (a) содержит один или несколько гетерологичных регуляторных или контрольных элементов, функционально связанных с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора или его части.

54. Полинуклеотид по любому из пп. 27-53, отличающийся тем, что полинуклеотид содержится в вирусном векторе.

55. Полинуклеотид по п. 54, отличающийся тем, что вирусным вектором является вектор AAV, где вектором AAV необязательно является вектор AAV2 или AAV6.

56. Полинуклеотид по п. 54, отличающийся тем, что вирусным вектором является ретровирусный вектор, необязательно, лентивирусный вектор.

57. Полинуклеотид по любому из пп. 27-53, которым является линейный полинуклеотид, необязательно двухцепочечный полинуклеотид или одноцепочечный полинуклеотид.

58. Полинуклеотид по любому из пп. 27-57, отличающийся тем, что полинуклеотид имеет длину от точно или примерно 2500 до точно или примерно 5000 нуклеотидов, от точно или примерно 3500 до точно или примерно 4500 нуклеотидов, или точно или примерно 3750 нуклеотидов и точно или примерно 4250 нуклеотидов.

59. Способ получения генетически сконструированной Т-клетки, включающий введение полинуклеотида по любому из пп. 27-58 в Т-клетку, содержащую генетическое разрушение в локусе TGFBR2.

60. Способ получения генетически сконструированной Т-клетки, включающий:

(a) введение в Т-клетку одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в эндогенном локусе TGFBR2 Т-клетки; и

(b) введение полинуклеотида по любому из пп. 27-58 в Т-клетку, содержащую генетическое разрушение в локусе TGFBR2.

61. Способ по п. 59 или 60, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть, интегрирована в эндогенный локус TGFBR2 посредством репарации, направляемой гомологией (HDR).

62. Способ получения генетически сконструированной Т-клетки, включающий введение в Т-клетку полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, указанная Т-клетка имеет генетическое разрушение в локусе TGFBR2 Т клетки, в которой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть, интегрирована в эндогенный локус TGFBR2 посредством репарации, направляемой гомологией (HDR).

63. Способ по любому из пп. 59, 61 и 62, отличающийся тем, что генетическое разрушение осуществляется путем введения в Т-клетку одного или нескольких агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в эндогенном локусе TGFBR2 Т-клетки.

64. Способ по любому из пп. 59-63, отличающийся тем, что способ дает

модифицированный локус TGFBR2 в Т-клетке, указанный модифицированный локус TGFBR2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть.

65. Способ по любому из пп. 62-64, отличающийся тем, что полинуклеотид дополнительно содержит одно или несколько плеч гомологии, связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, где одно или несколько плеч гомологии содержат последовательность, гомологичную одной или нескольким областям открытой рамки считывания локуса рецептора трансформирующего ростового фактора бета типа 2 (TGFBR2).

66. Способ по любому из пп. 59-65, отличающийся тем, что в клетке, созданной данным способом, модифицированный локус TGFBR2:

не кодирует функциональный полипептид TGFBRII в клетке, созданной данным способом;

не кодирует полипептид TGFBRII, или экспрессия полипептида TGFBRII исключена; и/или

не кодирует полноразмерный полипептид TGFBRII или кодирует доминантно-негативный полипептид TGFBRII.

67. Способ по п. 65 или 66, отличающийся тем, что одно или несколько плеч гомологии содержит 5' плечо гомологии и 3' плечо гомологии, и полинуклеотид содержит структуру [5' плечо гомологии]-[последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть]-[3’ плечо гомологии].

68. Способ по любому из пп. 59-67, отличающийся тем, что кодированный рекомбинантный рецептор является или содержит рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR).

69. Способ по любому из пп. 59-67, отличающийся тем, что кодированным рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

70. Способ по любому из пп. 60 и 63-69, отличающийся тем, что один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение, содержат ДНК-связывающий белок или ДНК-связывающую нуклеиновую кислоту, которая специфически связывается с сайтом-мишенью или гибридизуется с ним, слитый белок, содержащий ДНК-таргетирующий белок и нуклеазу, или РНК-управляемую нуклеазу, необязательно где один или несколько агентов содержат цинк-пальцевую нуклеазу (ZFN), TAL эффекторную нуклеазу (TALEN) или и комбинацию CRISPR-Cas9, которая специфически связывается, распознает или гибридизуется с сайтом-мишенью.

71. Способ по любому из пп. 60 и 63-70, отличающийся тем, что один или несколько агентов содержат направляющую РНК (нРНК), имеющую таргетирующий домен, который комплементарен, по меньшей мере, одному сайту-мишени.

72. Способ по п. 71, отличающийся тем, что один или несколько агентов вводят в виде комплекса рибонуклеопротеина (RNP), содержащего нРНК и белок Cas9, при этом RNP необязательно вводят с применением электропорации, генной пушки, трансфекции

фосфатом кальция, сжатия или сдавливания клеток, необязательно, с применением электропорации.

73. Способ по п. 72, отличающийся тем, что концентрация RNP составляет от точно или примерно 1 мкМ до точно или примерно 5 мкМ, необязательно, где концентрация RNP составляет точно или примерно 2 мкМ.

74. Способ по любому из пп. 71-73, отличающийся тем, что нРНК имеет последовательность таргетирующего домена GUGGAUGACCUGGCUAACAG (SEQ ID NO: 73).

75. Способ по любому из пп. 59-74, отличающийся тем, что Т-клеткой является первичная Т-клетка, полученная от субъекта, необязательно, где субъектом является человек.

76. Способ по любому из пп. 59-75, отличающийся тем, что Т-клеткой является CD8+ Т-клетка или ее подтипы, или CD4+ Т-клетка или ее подтипы.

77. Способ по любому из пп. 59-76, отличающийся тем, что полинуклеотид содержится в вирусном векторе.

78. Способ по п. 77, отличающийся тем, что вирусным вектором является вектор AAV, где вектором AAV необязательно является вектор AAV2 или AAV6.

79. Способ по любому из пп. 59-78, отличающийся тем, что полинуклеотидом является линейный полинуклеотид, необязательно двухцепочечный полинуклеотид или одноцепочечный полинуклеотид.

80. Способ по любому из пп. 60 и 63-79, отличающийся тем, что полинуклеотид вводят после введения одного или нескольких агентов.

81. Способ по п. 80, отличающийся тем, что полинуклеотид вводят сразу после или в течение примерно 30 секунд, 1 минуты, 2 минут, 3 минут, 4 минут, 5 минут, 6 минут, 6 минут, 8 минут, 9 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 30 минут, 40 минут, 50 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часов, 3 часов или 4 часов после введения агента.

82. Способ по любому из пп. 60 и 64-81, отличающийся тем, что перед введением одного или нескольких агентов способ включает инкубацию клеток in vitro с одним или несколькими стимулирующими агентами в условиях для стимуляции или активации одной или нескольких иммунных клеток, необязательно, где один или несколько стимулирующих агентов содержат и анти-CD3 и/или анти-CD28 антитела, необязательно, анти-CD3/анти-CD28 гранулы, необязательно где соотношение гранул к клеткам составляет или составляет примерно 1:1.

83. Способ по любому из пп. 60 и 64-82, отличающийся тем, что способ дополнительно включает инкубацию клеток до, во время или после введения одного или нескольких агентов и/или введения полинуклеотида с одним или несколькими рекомбинантными цитокинами, где один или несколько рекомбинантных цитокинов необязательно выбраны из группы, состоящей из IL-2, IL-7 и IL-15, необязательно, где один или несколько рекомбинантных цитокинов добавлены в концентрации, выбранной из концентрации IL-2 из от точно или примерно 10 Ед/мл до точно или примерно 200

Ед/мл, необязательно, от точно или примерно 50 МЕ/мл до точно или примерно 100 Ед/мл; IL-7 в концентрации от 0,5 нг/мл до 50 нг/мл, необязательно, от точно или примерно 5 нг/мл до точно или примерно 10 нг/мл, и/или IL-15 в концентрации от 0,1 нг/мл до 20 нг/мл, необязательно, от точно или примерно 0,5 нг/мл до точно или примерно 5 нг/мл.

84. Способ по п. 82 или 83, отличающийся тем, что инкубацию проводят после введения одного или нескольких агентов и введения полинуклеотида в течение вплоть до или приблизительно 24 часов, 36 часов, 48 часов, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 дня, необязательно, вплоть до или примерно 7 дней.

85. Способ по любому из пп. 59-84, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или более чем 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 90% клеток во множестве сконструированных клеток, созданных данным способом, содержат генетическое разрушение, по меньшей мере, одного сайта-мишени в локусе TGFBR2; и/или, по меньшей мере, или более чем 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 90% клеток во множестве сконструированных клеток, созданных данным способом, экспрессируют рекомбинантный рецептор.

86. Генетически сконструированные Т-клетки или множество генетически сконструированных Т-клеток, созданные с использованием способа по любому из пп. 59-85.

87. Композиция, содержащая генетически сконструированные Т-клетки по любому из пп. 1-26 и 86; или множество генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-26 и 86.

88. Композиция по п. 87, отличающаяся тем, что композиция содержит CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки.

89. Композиция по п. 88, отличающаяся тем, что композиция содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, и отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам составляет от или от примерно 1:3 до 3:1, необязательно, 1:1.

90. Композиция по любому из пп. 87-89, отличающаяся тем, что клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, составляют, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более от общего количества клеток в композиции или от общего количества CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток в композиции.

91. Способ лечения, включающий введение генетически сконструированной Т-клетки, множества генетически сконструированных Т-клеток или композиции по любому из пп. 1-26 и 86-90 субъекту, страдающему заболеванием или нарушением.

92. Применение генетически сконструированных Т-клеток, множества генетически сконструированных Т-клеток или композиции по любому из пп. 1-26 и 86-90 для лечения заболевания или нарушения.

93. Применение генетически сконструированных Т-клеток, множества генетически сконструированных Т-клеток или композиции по любому из пп. 1-26 и 86-90 в

производстве лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения.

94. Генетически сконструированная Т-клетка, множество генетически сконструированных Т-клеток или композиции по любому из пп 1-26 и 86-90 для применения в лечении заболевания или нарушения.

95. Способ, применение или генетически сконструированные Т-клетки, множество генетически сконструированных Т-клеток или композиция для применения по любому из пп. 91-94, где заболеванием или нарушением является рак или опухоль.

96. Способ, применение или генетически сконструированные Т-клетки, множество генетически сконструированных Т-клеток или композиция для применения по п. 95, где раком или опухолью является гематологическое злокачественное новообразование, необязательно лимфома, лейкоз или злокачественное новообразование плазматических клеток.

97. Способ, применение или генетически сконструированная Т-клетка, множество генетически сконструированных Т-клеток или композиция для применения по п. 95, где раком или опухолью является солидная опухоль, необязательно, где солидной опухолью является немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC).

98. Набор, включающий:

один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в локусе TGFBR2; и

полинуклеотид по любому из пп. 27-58.

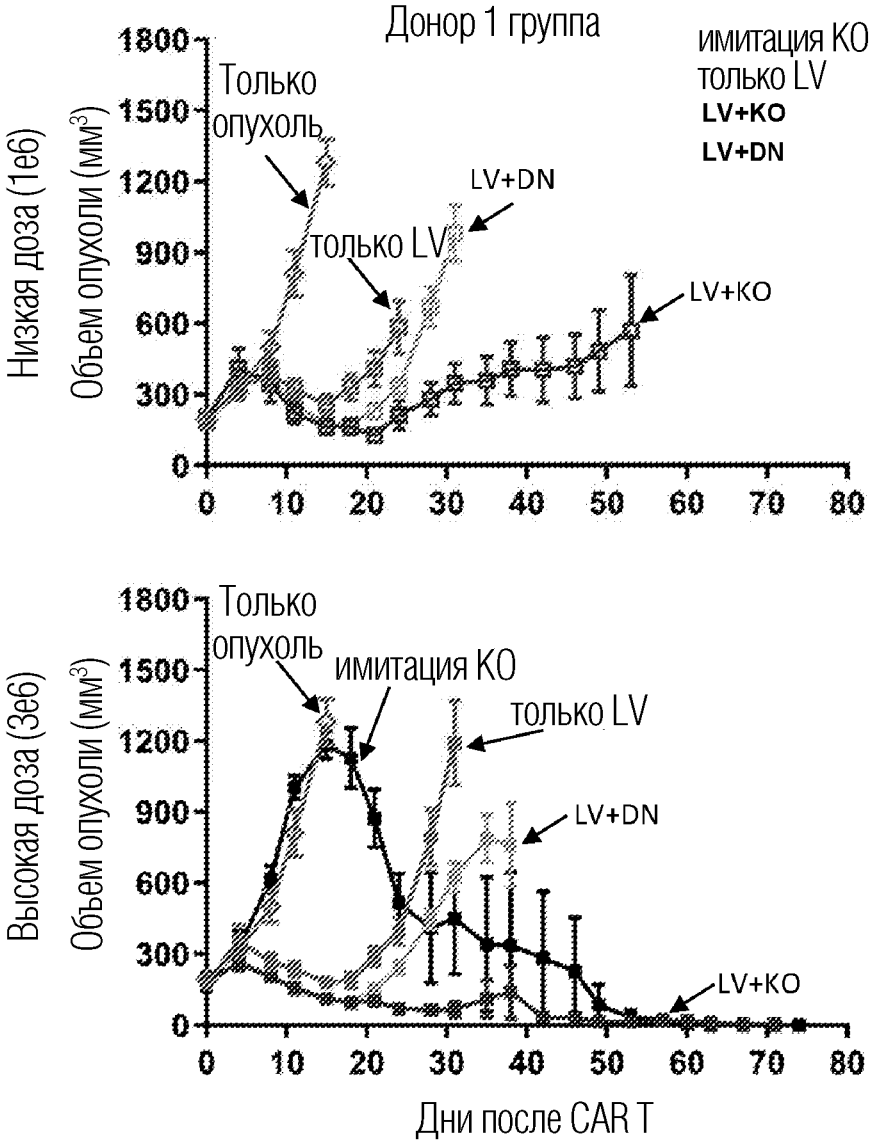
99. Набор, включающий:

один или несколько агентов, способных вызывать генетическое разрушение в сайте-мишени в локусе TGFBR2; и

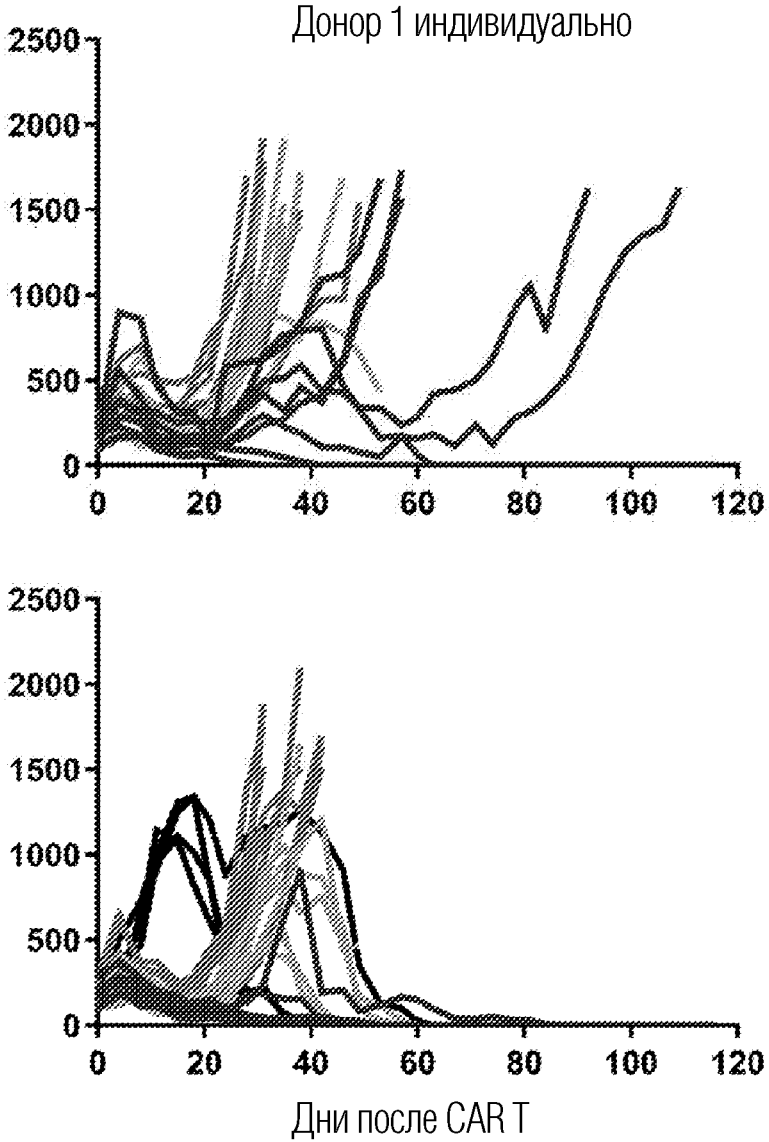
полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор или его часть, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор или его часть, направлена на интеграцию на или рядом с сайтом-мишенью посредством репарации, направляемой гомологией (HDR); и

инструкции для проведения способа по любому из пп. 59-85.

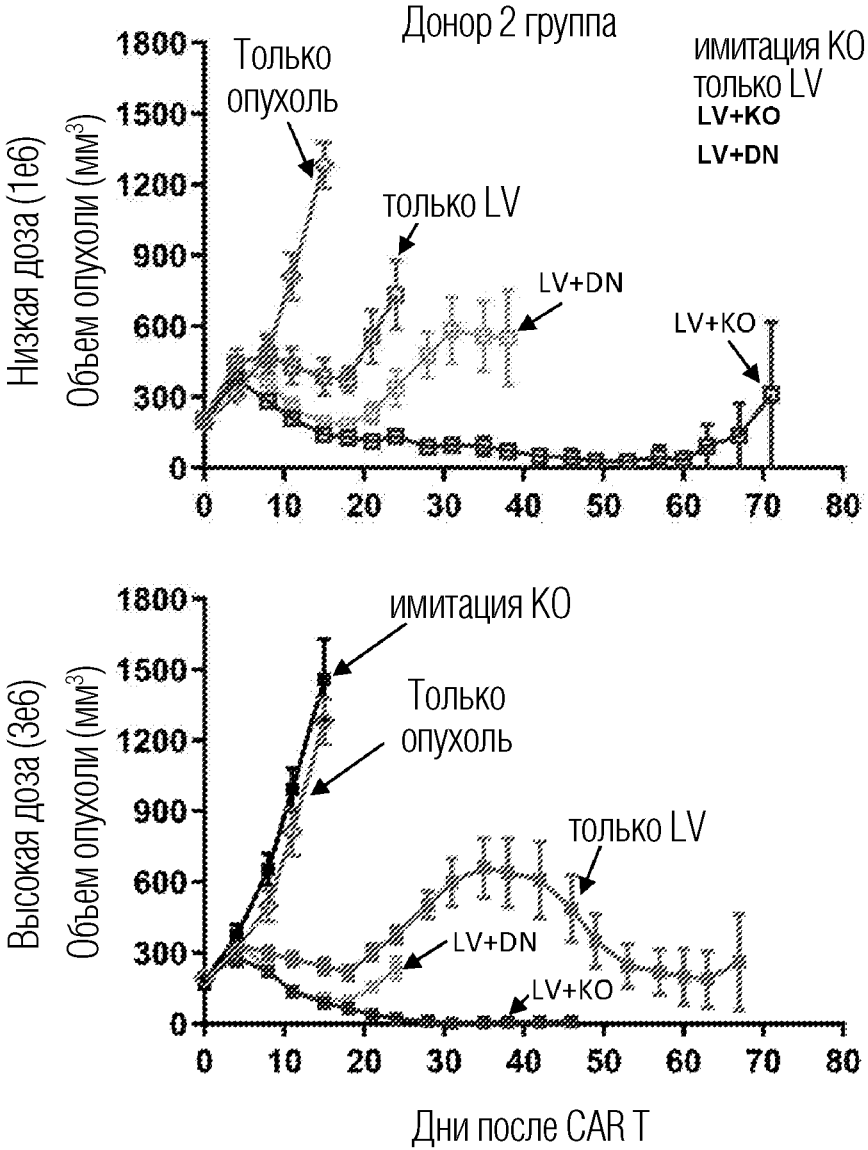
ФИГ. 1А


Донор 1 группа
Низкая доза (1e6)
Объем опухоли (мм3)
Только опухоль
только LV
LV+DN
LV+KO
Высокая доза (3e6)
Только опухоль
имитация KO
только LV
LV+DN
LV+KO
Дни после CAR T

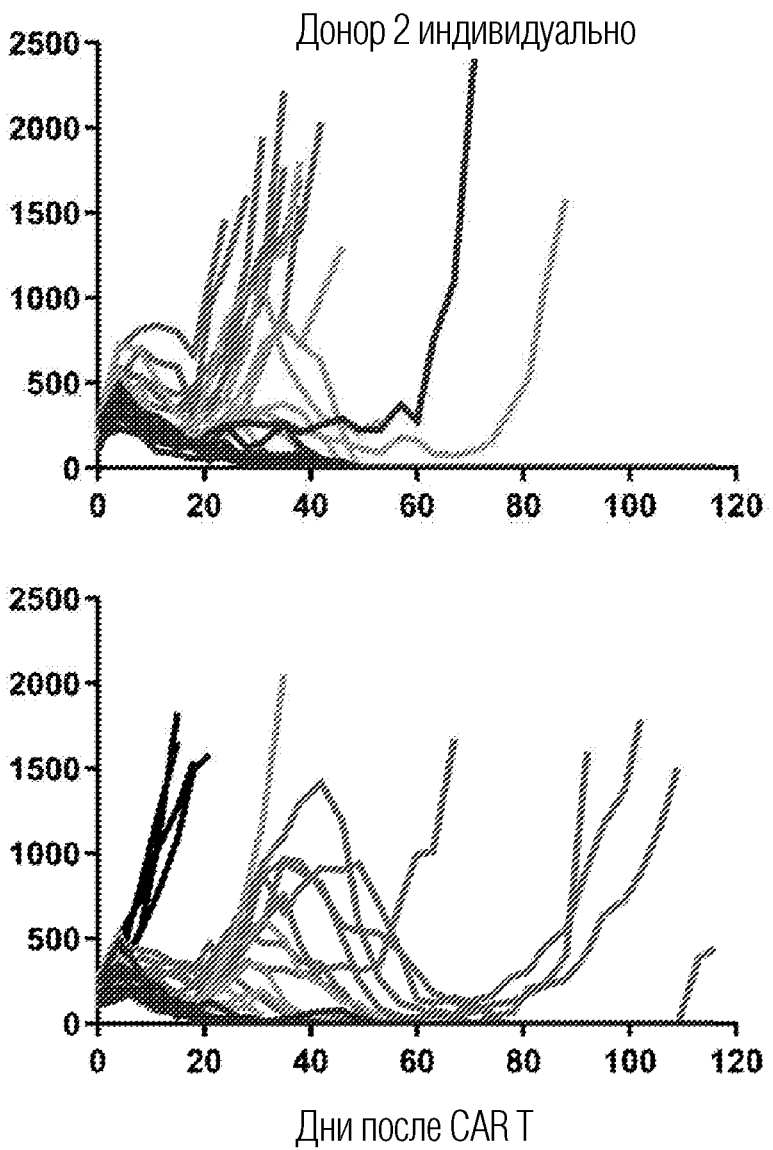
ФИГ. 1В


Донор 1 индивидуально
имитация KO
только LV
LV+KO
LV+DN
Дни после CAR T

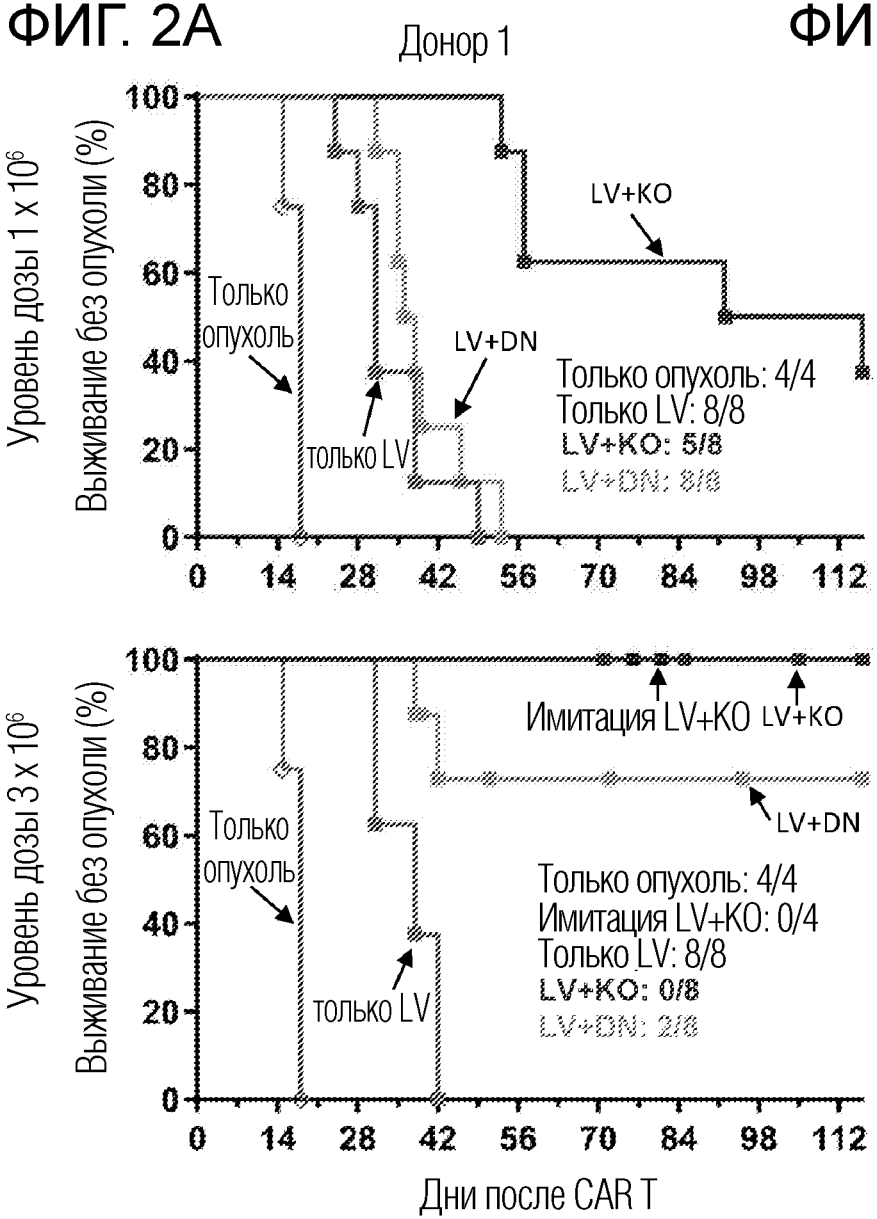
ФИГ. 1C


Донор 2 группа
Низкая доза (1e6)
Объем опухоли (мм3)
Только опухоль
только LV
LV+DN
LV+KO
имитация KO
только LV
LV+KO
LV+DN
Высокая доза (3e6)
Объем опухоли (мм3)
имитация KO
Только опухоль
только LV
LV+DN
LV+KO
Дни после CAR T

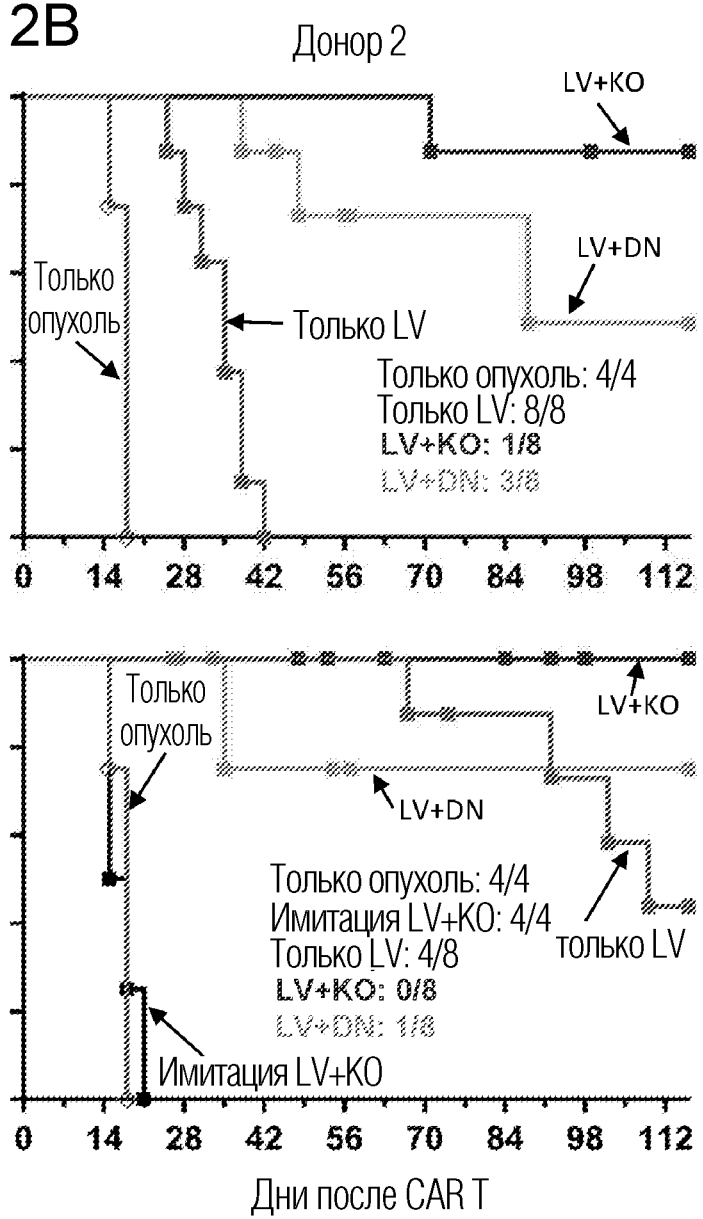
ФИГ. 1D


Донор 2 индивидуально
Дни после CAR T

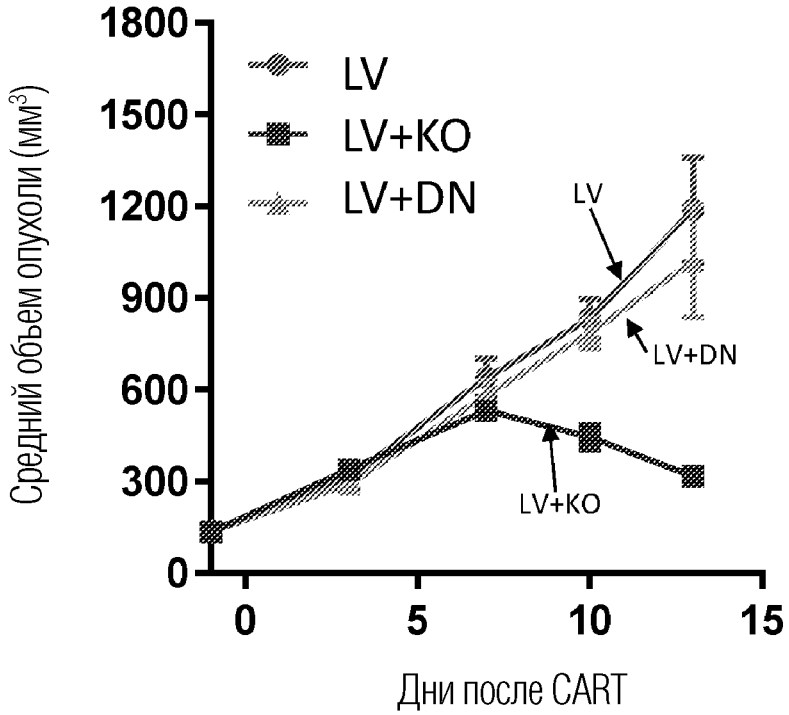
ФИГ. 2А


Донор 1
Уровень дозы 1 x 10^6
Выживание без опухоли (%)
100
80
60
40
20
0
0 14 28 42 56 70 84 98 112
Только опухоль
только LV
LV+DN
LV+KO
Только опухоль: 4/4
Только LV: 8/8
LV+KO: 5/8
LV+DN: 8/8
Уровень дозы 3 x 10^6
Выживание без опухоли (%)
Только опухоль
только LV
Имитация LV+KO
LV+KO
LV+DN
Только опухоль: 4/4
Имитация LV+KO: 0/4
Только LV: 8/8
LV+KO: 0/8
LV+DN: 2/8
Дни после CAR T

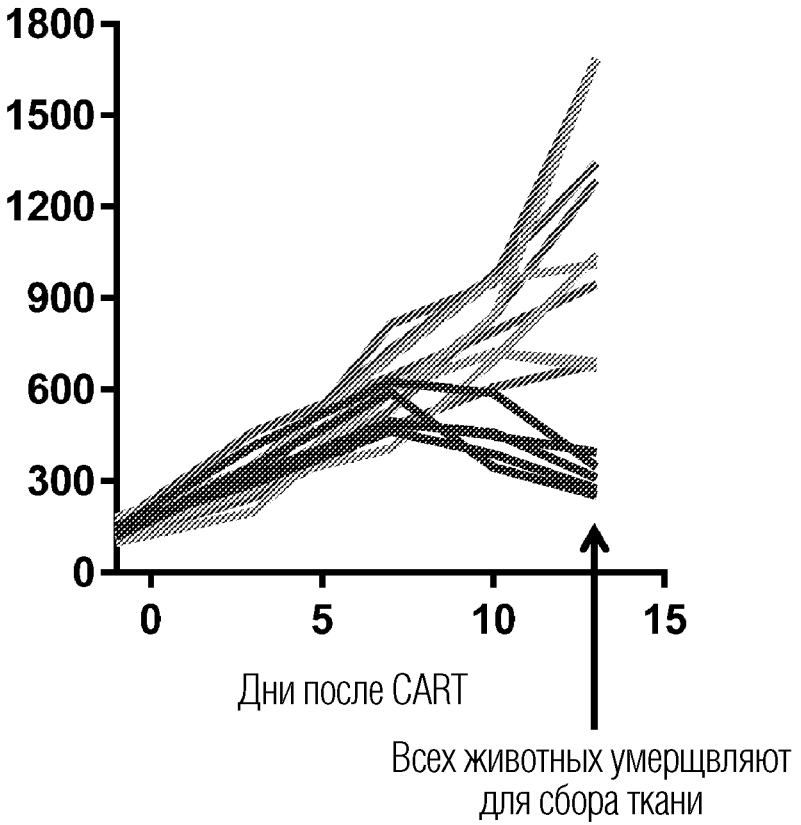
ФИГ. 2В


Донор 2
LV+KO
LV+DN
Только опухоль
Только LV
Только опухоль: 4/4
Только LV: 8/8
LV+KO: 1/8
LV+DN: 3/8
Только опухоль
LV+KO
LV+DN
только LV
Имитация LV+KO
Только опухоль: 4/4
Имитация LV+KO: 4/4
Только LV: 4/8
LV+KO: 0/8
LV+DN: 1/8
0 14 28 42 56 70 84 98 112
Дни после CAR T

ФИГ. 3А


Группа
1800
1500
1200
900
600
300
0
LV
LV+KO
LV+DN
Средний объем опухоли (мм3)
LV
LV+DN
LV+KO
0
5
10
15
Дни после CART

ФИГ. 3В


Индивидуально
1800
1500
1200
900
600
300
0
0
5
10
15
Дни после CART
Всех животных умерщвляют
для сбора ткани

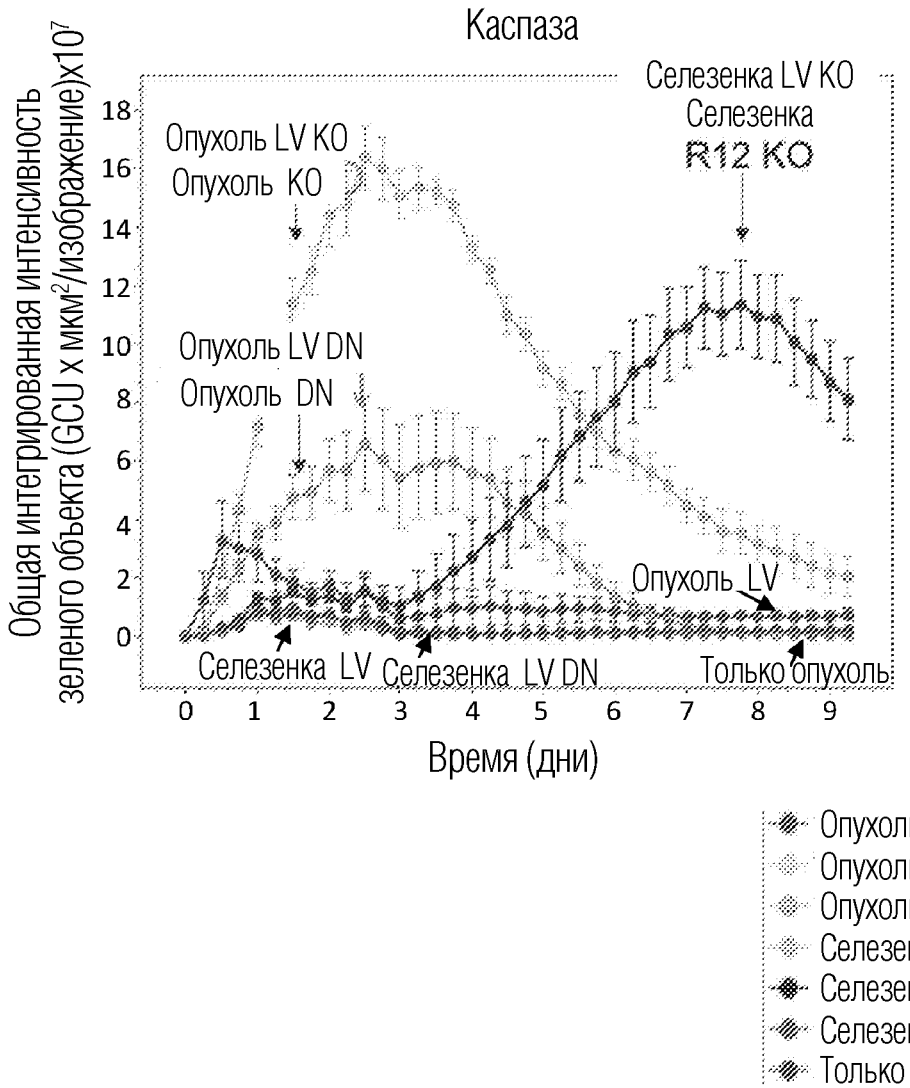
ФИГ. 4A

ФИГ. 4B

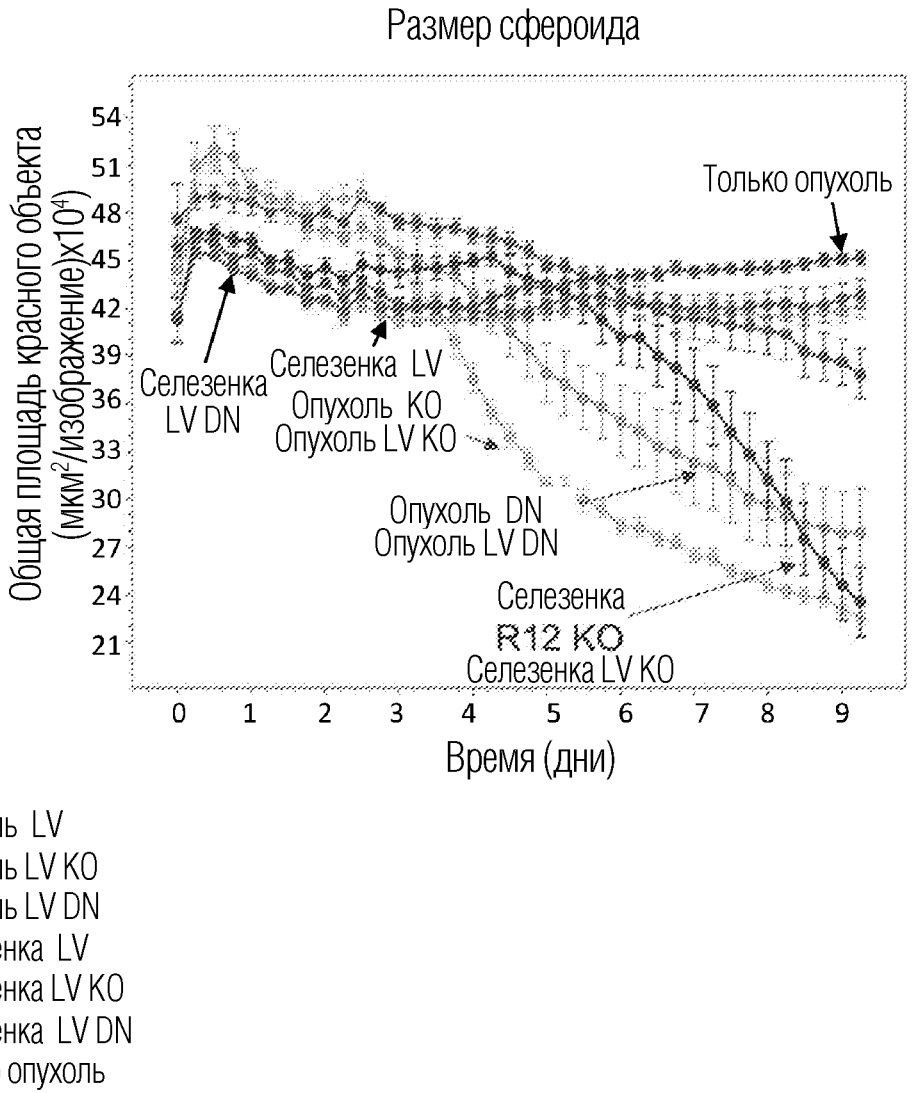
ФИГ. 4C

ФИГ. 4D

ФИГ. 5A

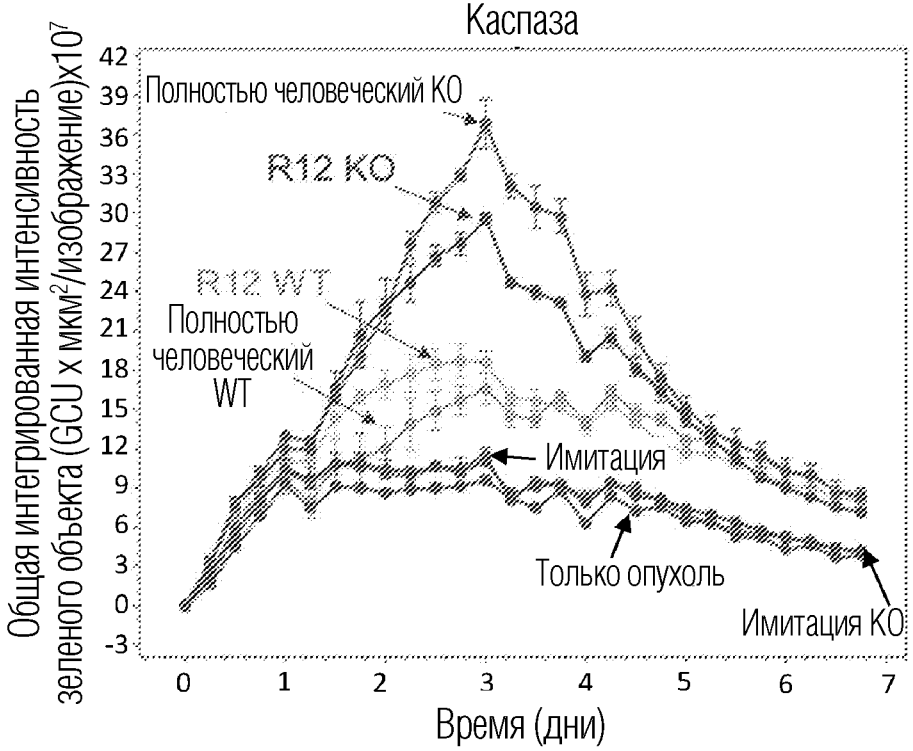

Каспаза
Общая интегрированная интенсивность зеленого объекта (GCU x мкм²/изображение)x10⁷
Опухоль LV KO
Опухоль KO
Селезенка LV KO
Селезенка
R12 KO
Опухоль LV DN
Опухоль DN
Опухоль LV
Селезенка LV
Селезенка LV DN
Только опухоль
Время (дни)

ФИГ. 5B

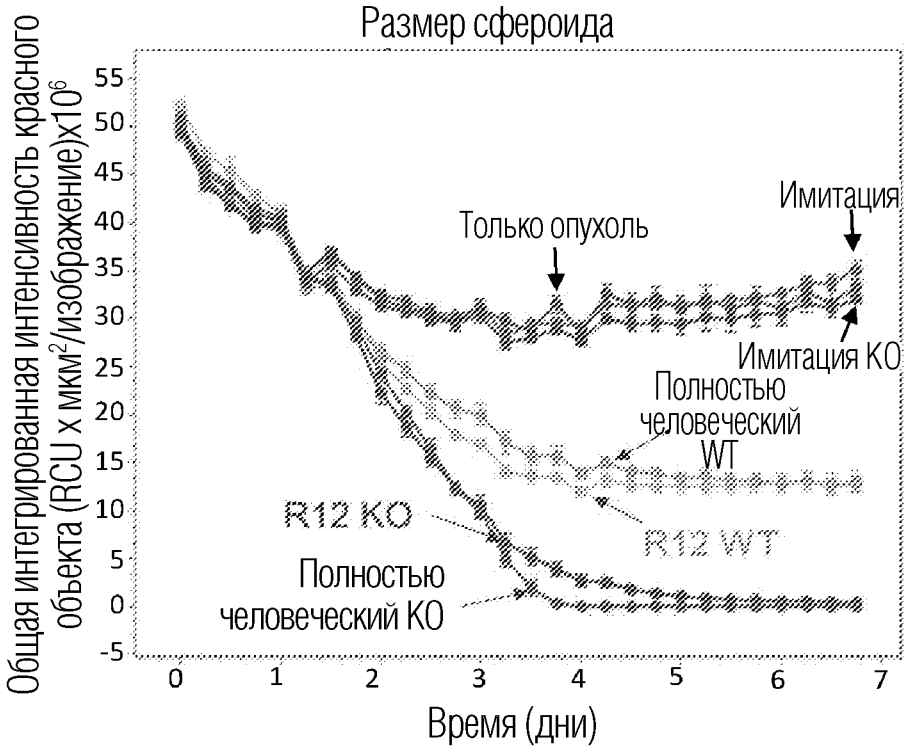

Размер сфероида
Общая площадь красного объекта (мкм²/изображение)x10⁴
Только опухоль
Селезенка LV DN
Селезенка LV
Опухоль KO
Опухоль LV KO
Опухоль DN
Опухоль LV DN
Селезенка
R12 KO
Селезенка LV KO
Время (дни)

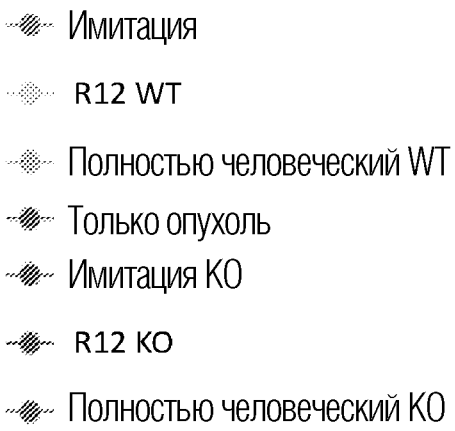
Опухоль LV
Опухоль LV KO
Опухоль LV DN
Селезенка LV
Селезенка LV KO
Селезенка LV DN
Только опухоль

ФИГ. 6А

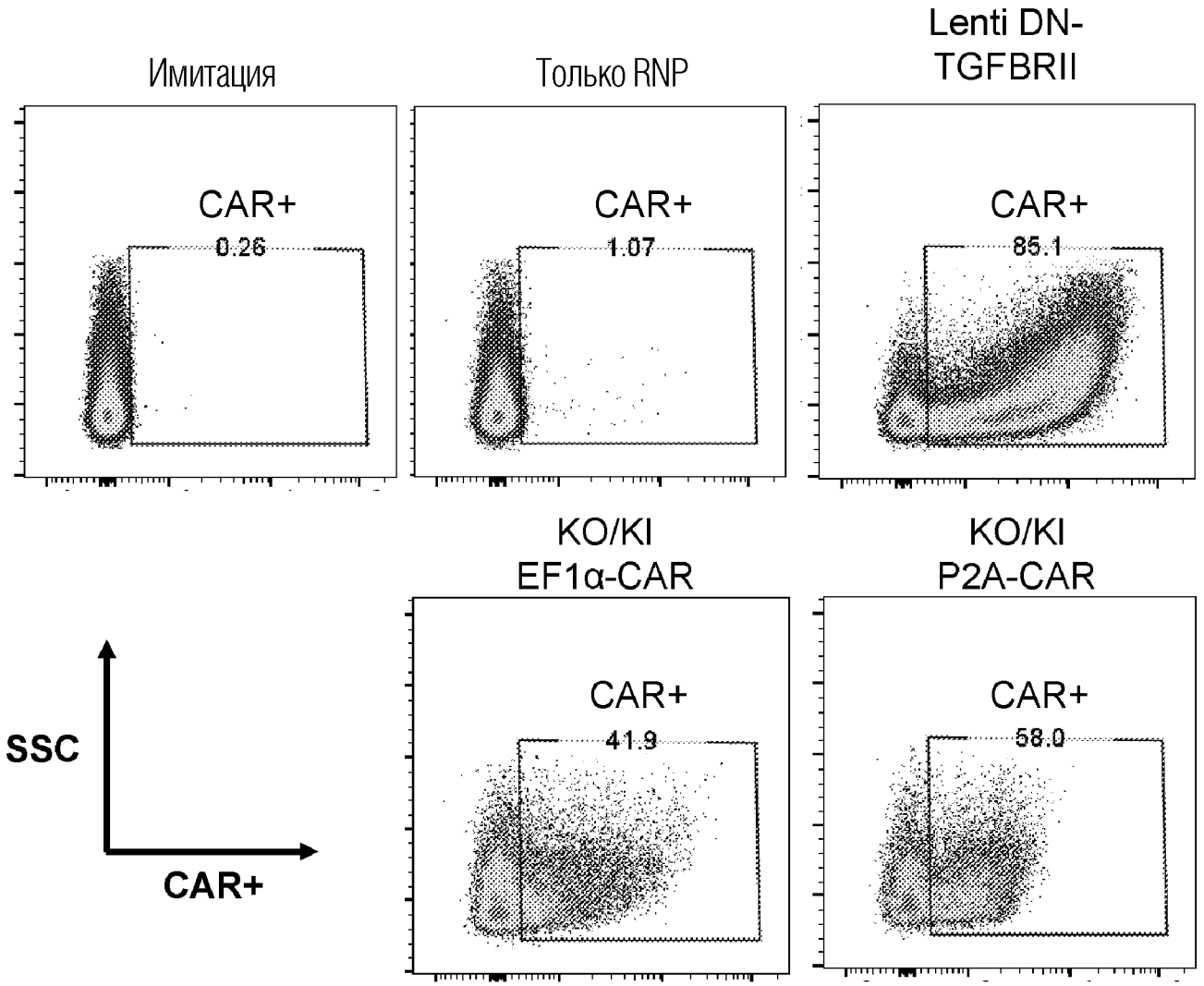

Каспаза
Общая интегрированная интенсивность зеленого объекта (GCU x мкм²/изображение)x10⁷
Полностью человеческий KO
R12 KO
R12 WT
Полностью человеческий WT
Имитация
Только опухоль
Имитация KO
Время (дни)

ФИГ. 6В

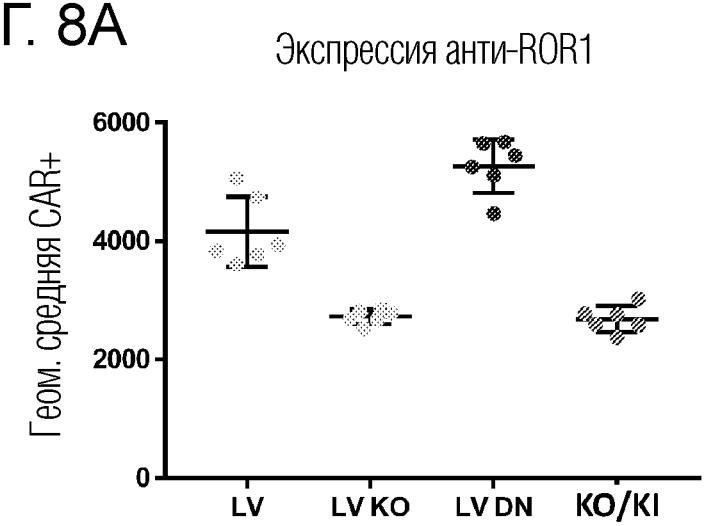

Размер сфероида
Общая интегрированная интенсивность красного объекта (RCU x мкм²/изображение)x10⁶
Имитация
Только опухоль
Имитация KO
Полностью человеческий WT
R12 KO
R12 WT
Полностью человеческий KO
Время (дни)


Имитация
R12 WT
Полностью человеческий WT
Только опухоль
Имитация KO
R12 KO
Полностью человеческий KO

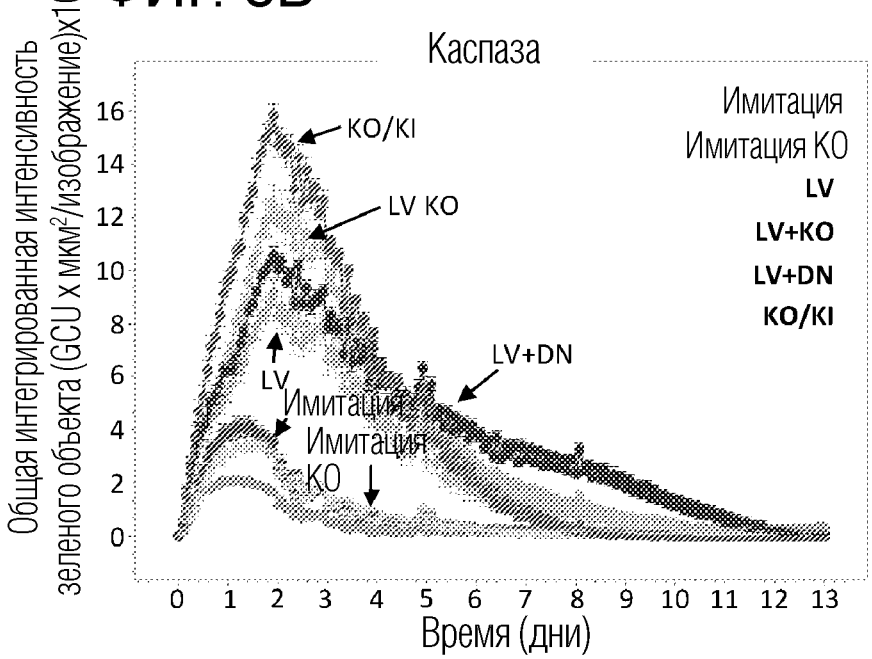
ФИГ. 7


Имитация
Только RNP
Lenti DN-TGFBRII
CAR+
0.26
CAR+
1.07
CAR+
85.1
KO/KI EF1α-CAR
KO/KI P2A-CAR
CAR+
41.9
CAR+
58.0
SSC
CAR+

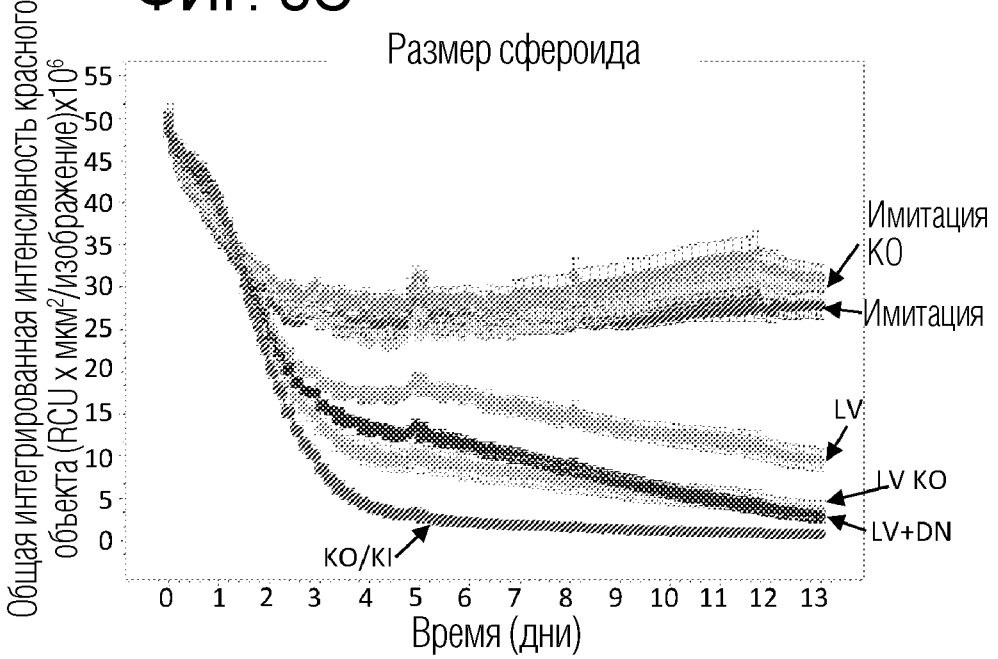
ФИГ. 8А



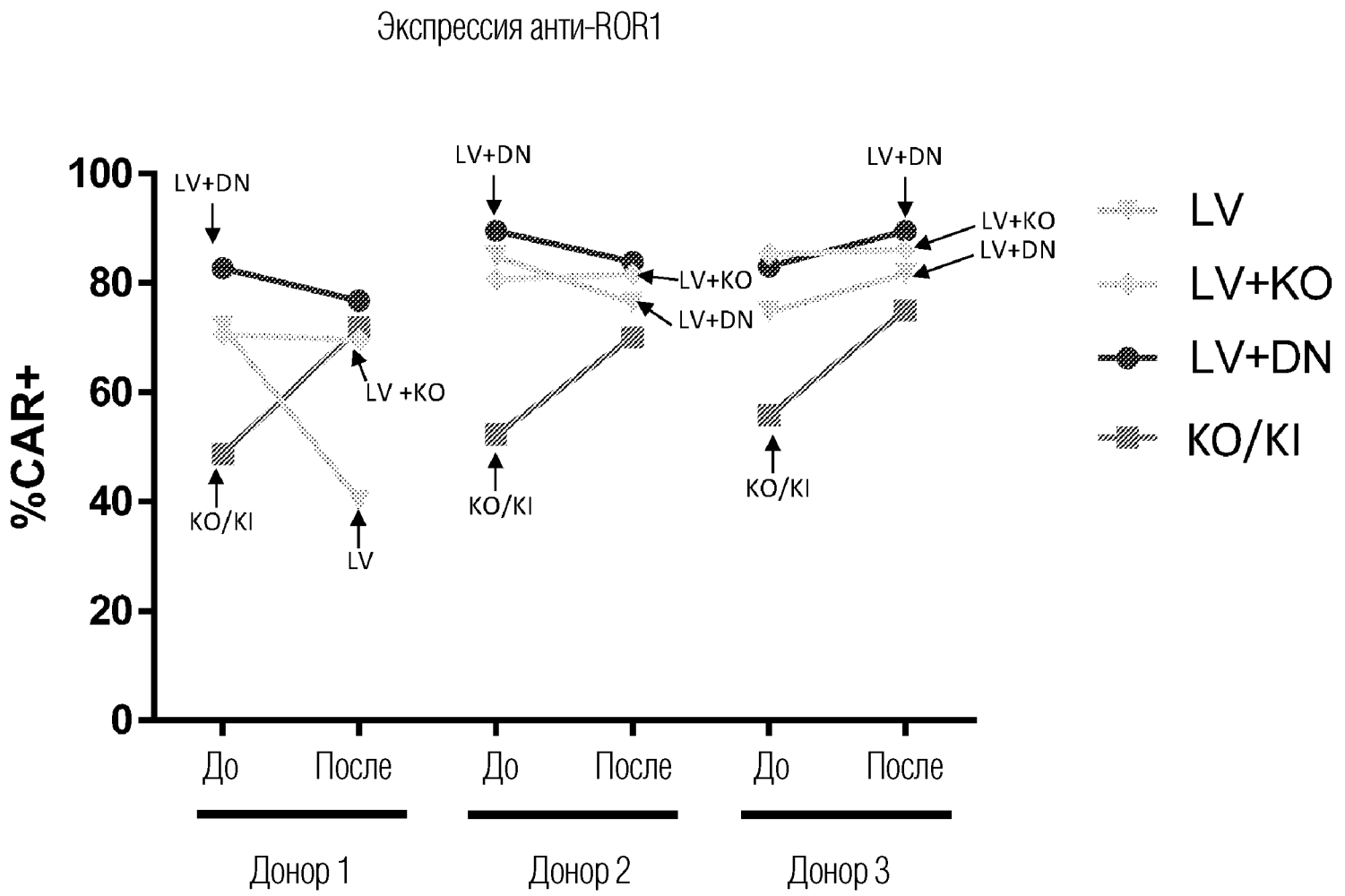
ФИГ. 8В



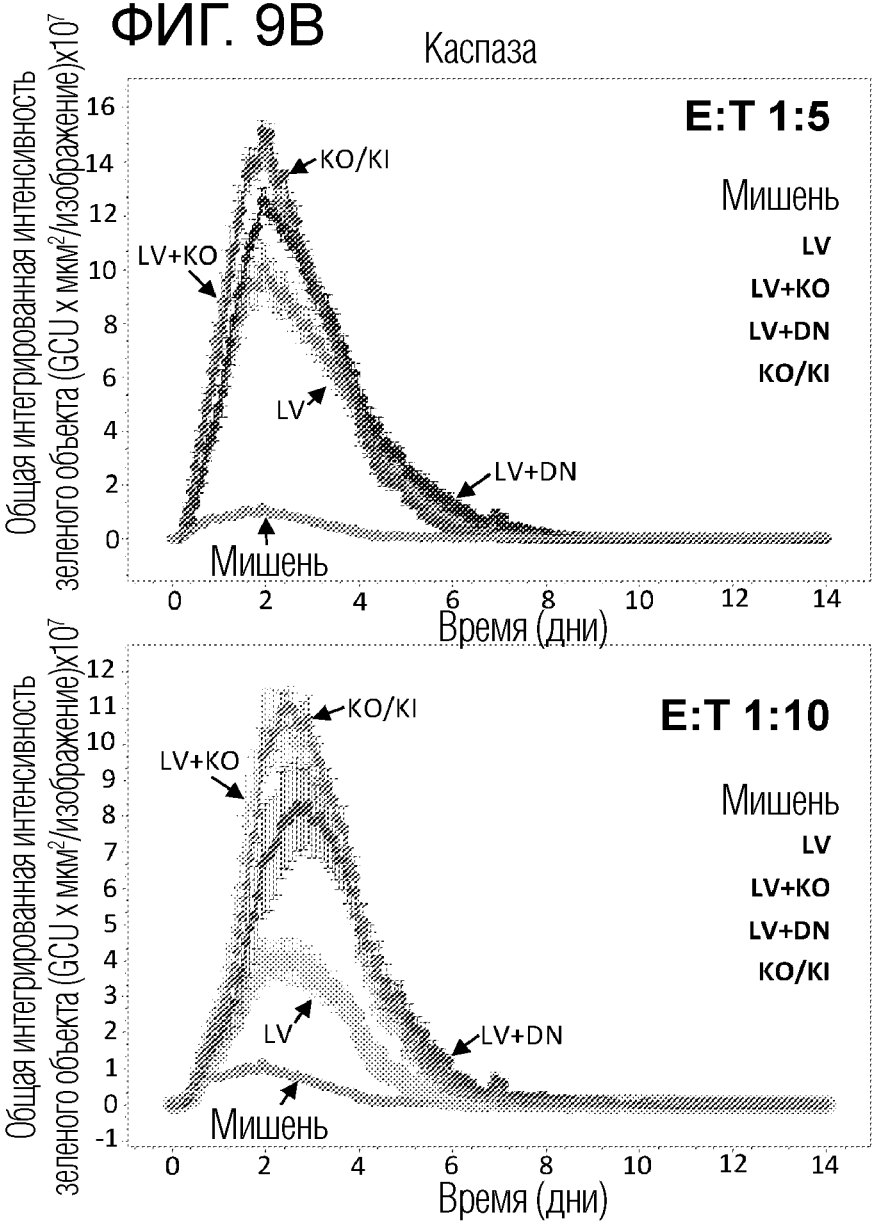
ФИГ. 8С



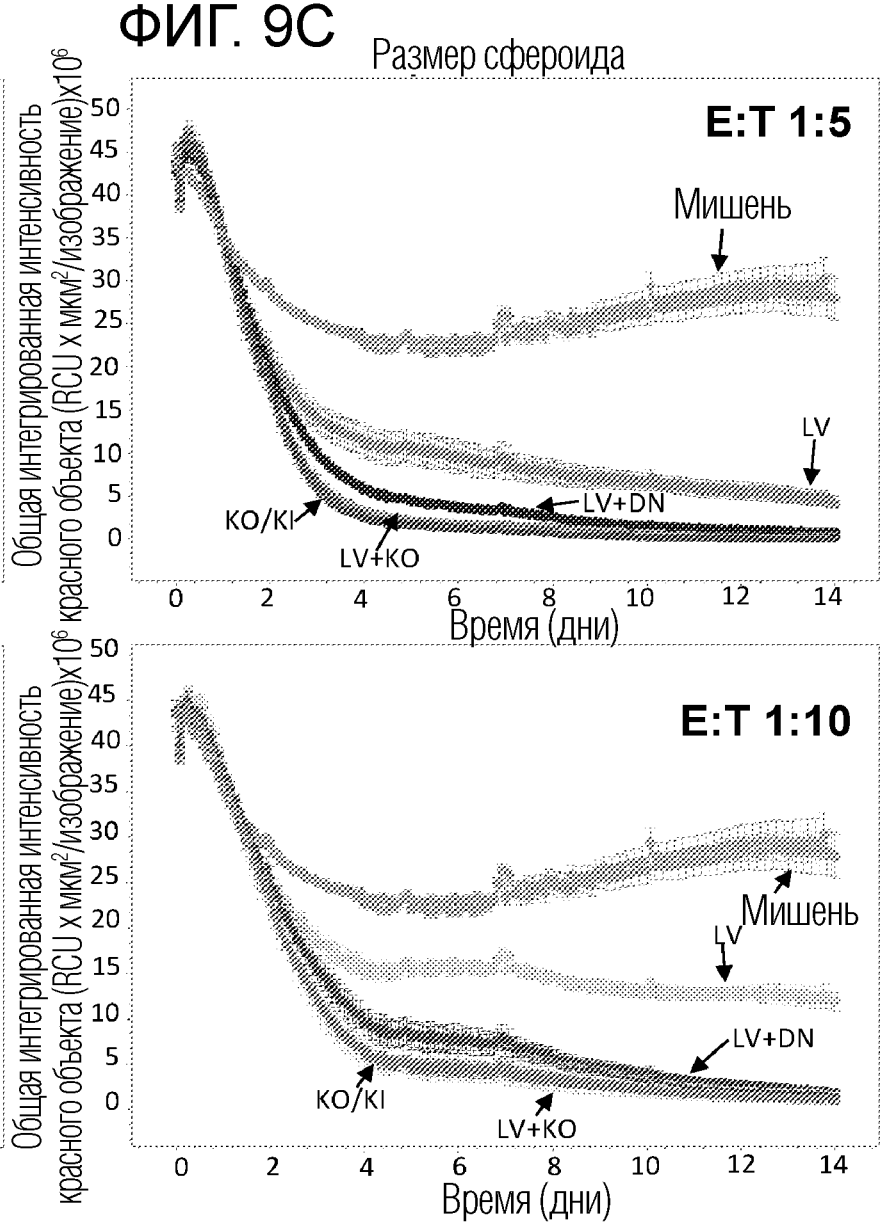
ФИГ. 9А


Экспрессия анти-ROR1
%CAR+
100
80
60
40
20
0
LV+DN
LV +KO
KO/KI
LV
LV+KO
LV+DN
До
После
Донор 1
Донор 2
Донор 3
LV
LV+KO
LV+DN
KO/KI

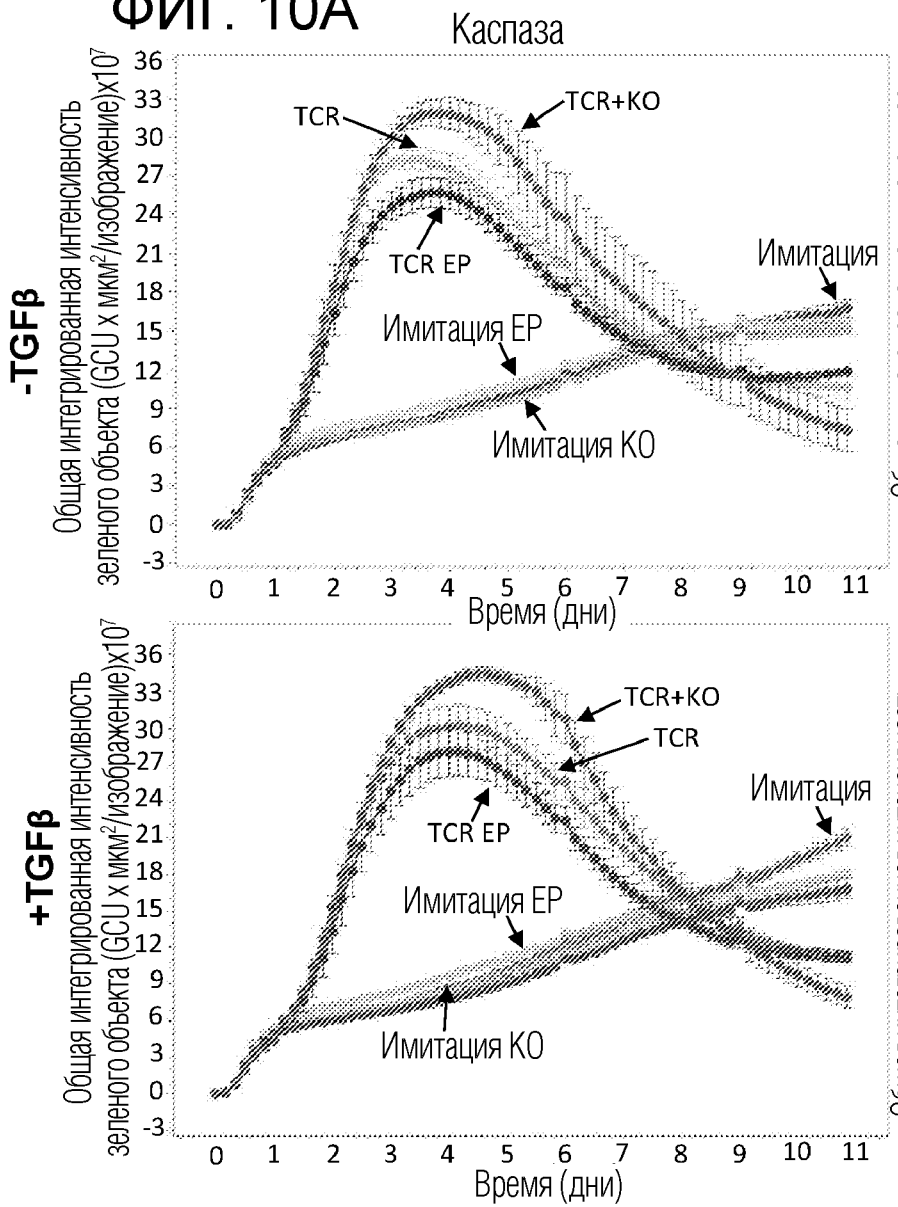
ФИГ. 9B


Каспаза
E:T 1:5
Мишень
LV
LV+KO
LV+DN
KO/KI
KO/KI
LV+KO
LV
LV+DN
Мишень
Общая интегрированная интенсивность зеленого объекта (GCU x мкм²/изображение)x10⁷
Время (дни)
E:T 1:10
Мишень
LV
LV+KO
LV+DN
KO/KI
KO/KI
LV+KO
LV
LV+DN
Мишень
Общая интегрированная интенсивность зеленого объекта (GCU x мкм²/изображение)x10⁷
Время (дни)

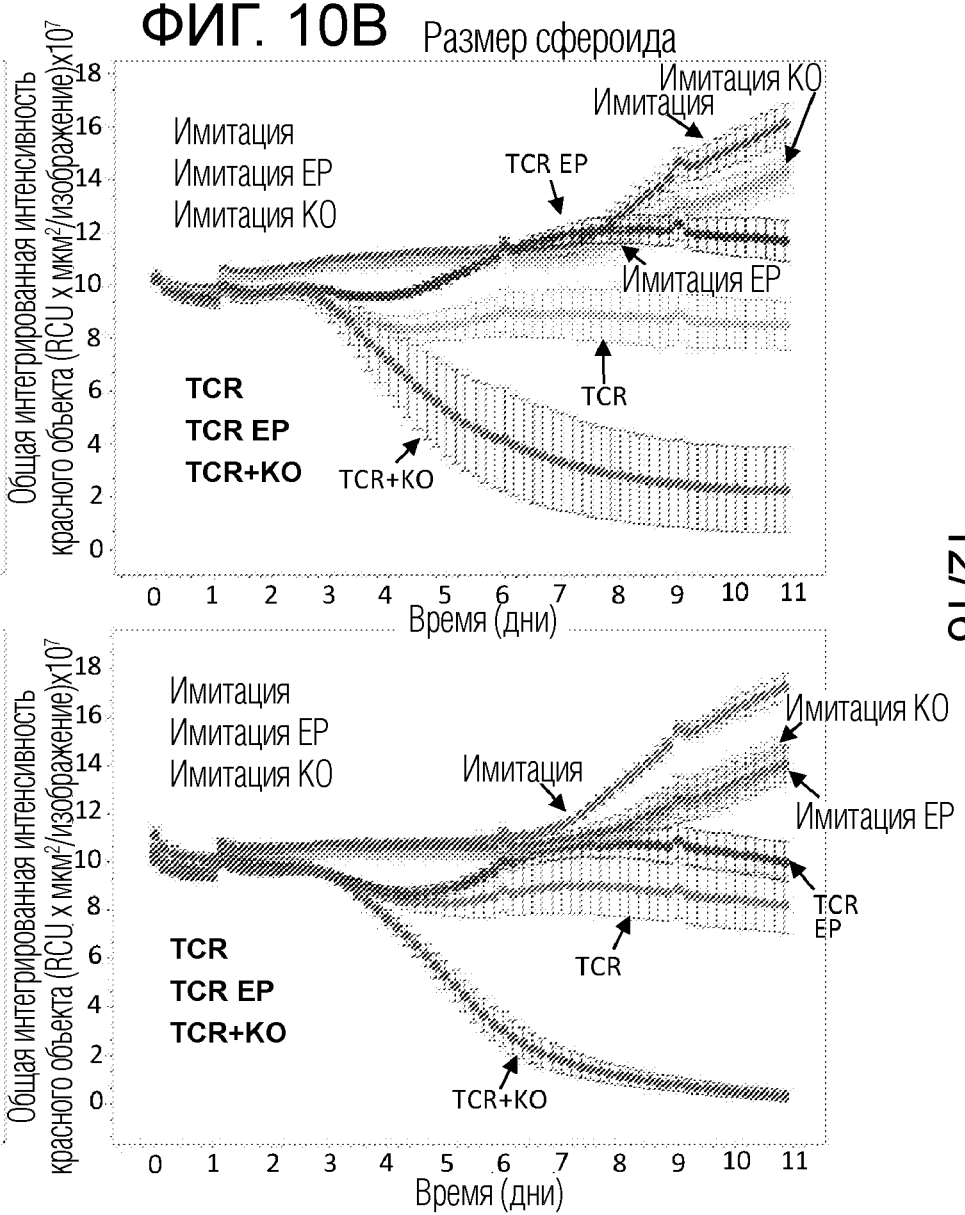
ФИГ. 9C


Размер сфероида
E:T 1:5
Мишень
LV
LV+DN
KO/KI
LV+KO
Общая интегрированная интенсивность красного объекта (RCU x мкм²/изображение)x10⁶
Время (дни)
E:T 1:10
Мишень
LV
LV+DN
KO/KI
LV+KO
Общая интегрированная интенсивность красного объекта (RCU x мкм²/изображение)x10⁶
Время (дни)

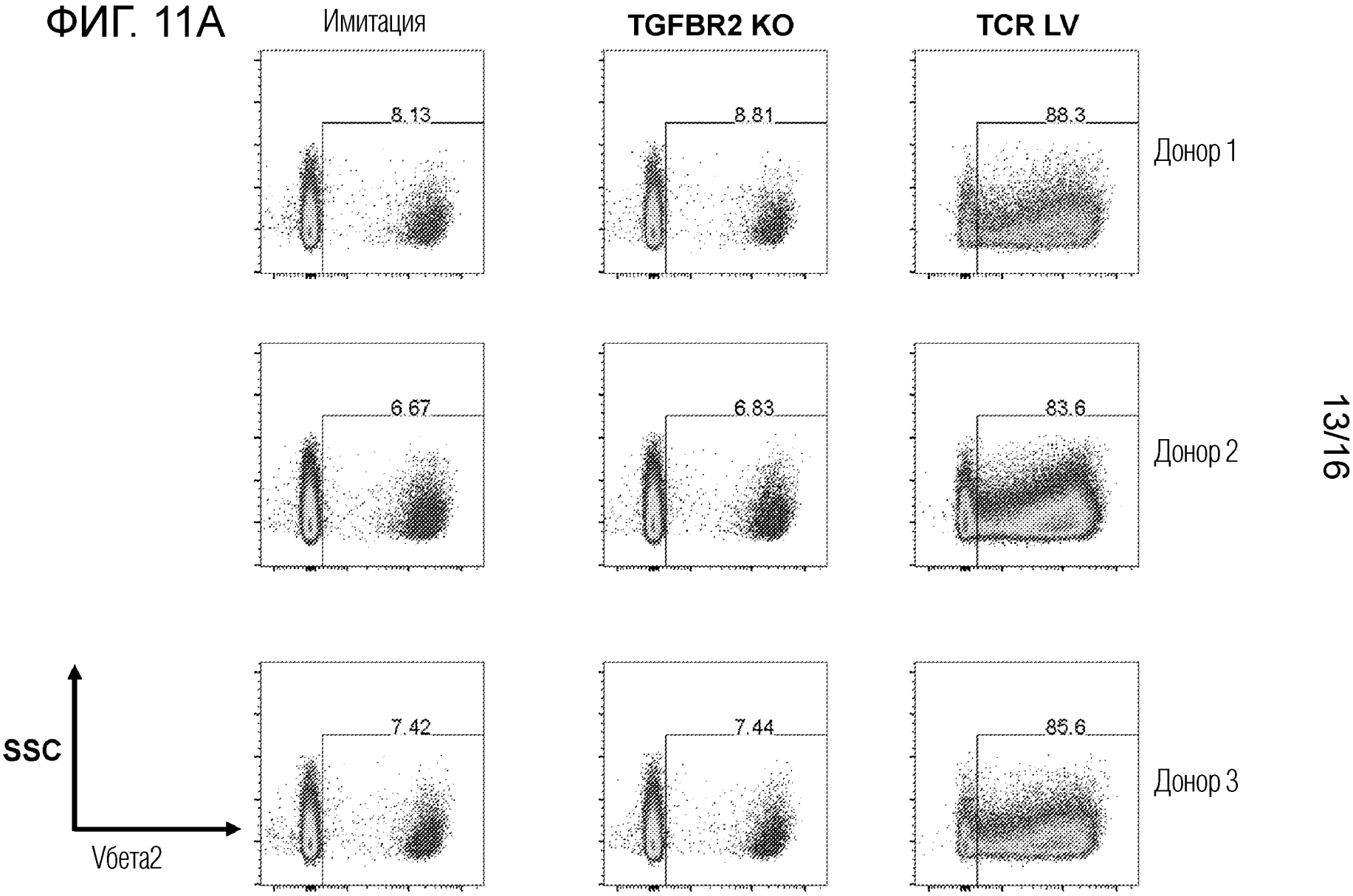
ФИГ. 10A



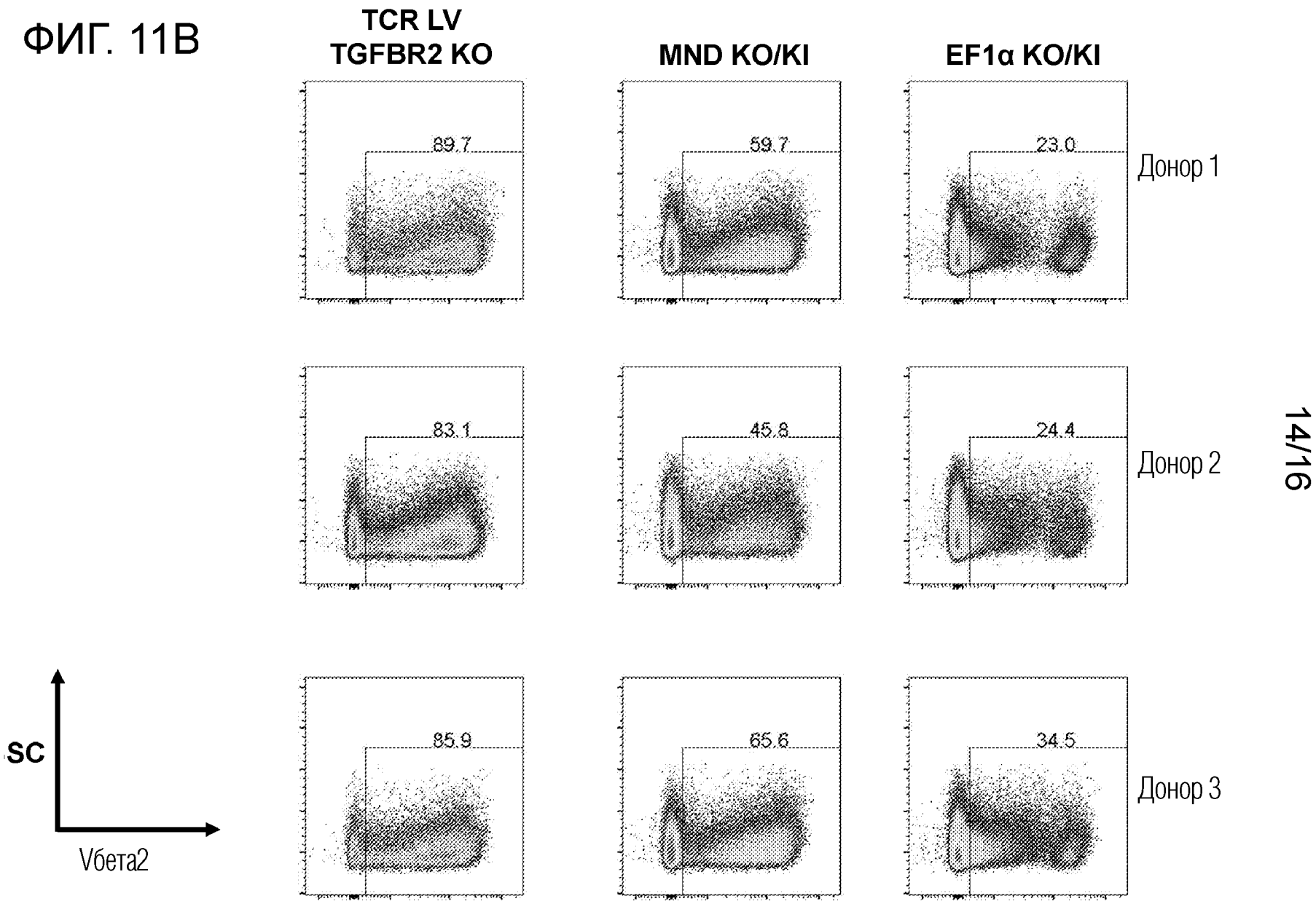
ФИГ. 10B



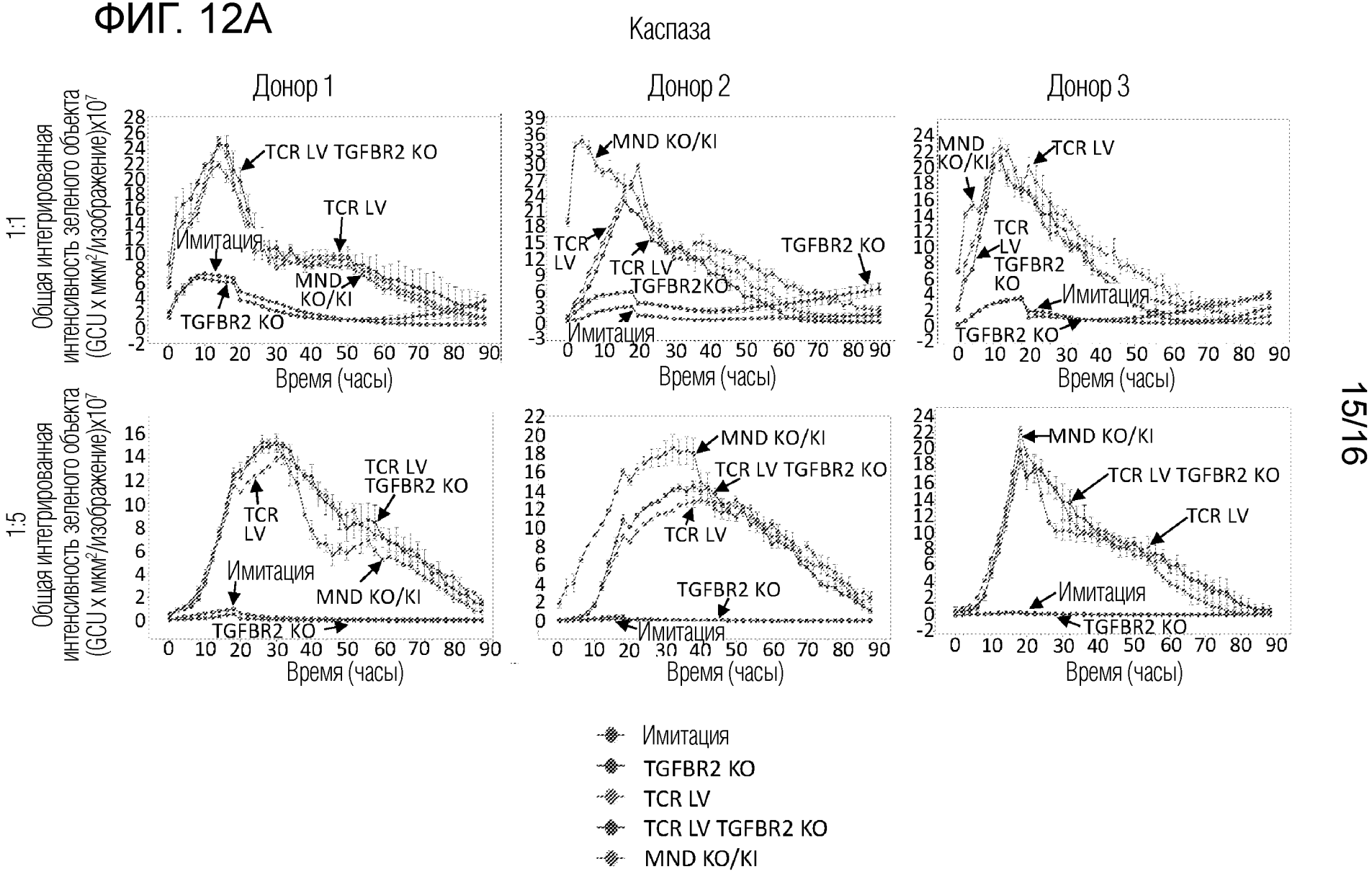
ФИГ. 11А


Имитация
TGFBR2 KO
TCR LV
8.13
8.81
88.3
Донор 1
6.67
6.83
83.6
Донор 2
7.42
7.44
85.6
Донор 3
SSC
Vбета2

ФИГ. 11B

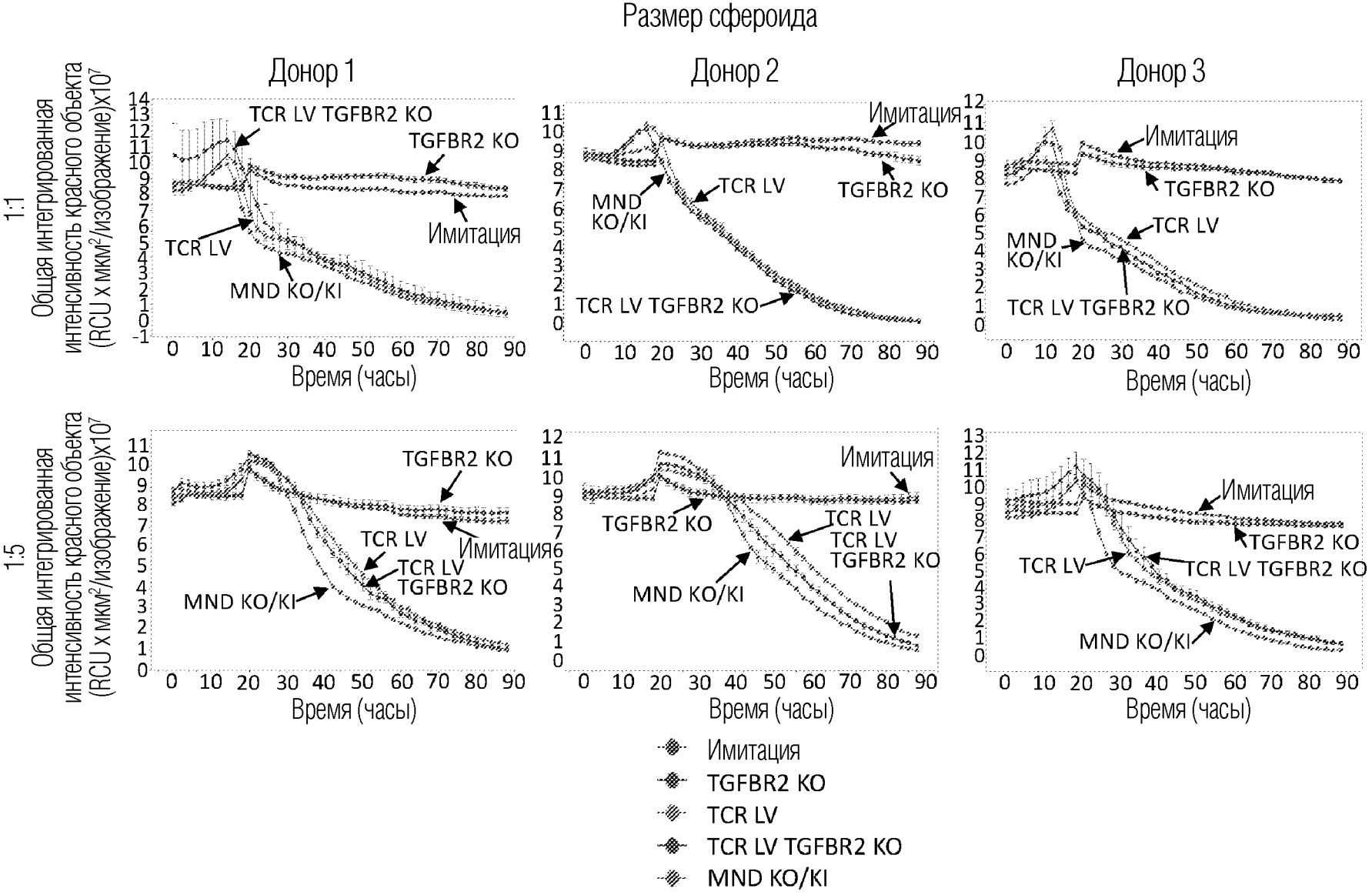

TCR LV
TGFBR2 KO
MND KO/KI
EF1α KO/KI
89.7
59.7
23.0
Донор 1
83.1
45.8
24.4
Донор 2
85.9
65.6
34.5
Донор 3
SC
Vбета2

ФИГ. 12A


Каспаза
Донор 1
Донор 2
Донор 3
1:1
1:5
Общая интегрированная интенсивность зеленого объекта (GCU x мкм²/изображение)x10⁷
Время (часы)
TCR LV TGFBR2 KO
TCR LV
Имитация
MND KO/KI
TGFBR2 KO
TCR LV
TGFBR2 KO
MND KO/KI
TCR LV
TGFBR2 KO
Имитация

15/16

ФИГ. 12B


Размер сфероида
Донор 1
Донор 2
Донор 3
1:1
1:5
Общая интегрированная интенсивность красного объекта (RCU x мкм²/изображение)x10⁷
Время (часы)
TCR LV TGFBR2 KO
TGFBR2 KO
Имитация
TCR LV
MND KO/KI
Имитация
TGFBR2 KO
TCR LV
MND KO/KI
TCR LV TGFBR2 KO
Имитация
TGFBR2 KO
TCR LV
MND KO/KI
TCR LV TGFBR2 KO
TGFBR2 KO
TCR LV
Имитация
TCR LV
TGFBR2 KO
MND KO/KI
Имитация
TGFBR2 KO
TCR LV
TCR LV
TGFBR2 KO
MND KO/KI
Имитация
TGFBR2 KO
TCR LV
TCR LV TGFBR2 KO
MND KO/KI
Имитация
TGFBR2 KO
TCR LV TGFBR2 KO
MND KO/KI