

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290796** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.21

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.04

(54) ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫЕ Т-КЛЕТКИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ УЛУЧШЕННОЙ ПЕРСИСТЕНЦИЕЙ В КУЛЬТУРЕ

(31) 62/897,016; 62/927,764; 63/034,646

(32) 2019.09.06; 2019.10.30; 2020.06.04

(33) US

(86) PCT/IB2020/058280

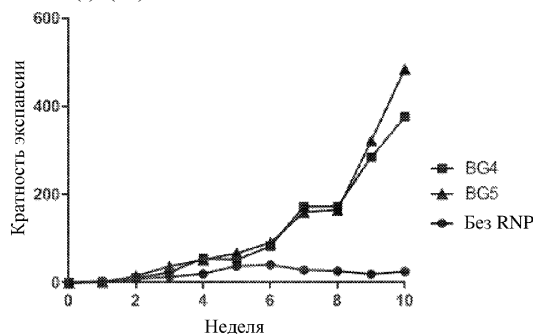
(87) WO 2021/044378 2021.03.11

(71) Заявитель:
КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Терретт Джонатан Александр,
Калаицидис Деметриос, Вальднер
Ханспетер (US)**

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

(57) Банк Т-клеток, содержащий генетически сконструированные Т-клетки, которые по сравнению с аналогичными Т-клетками, не являющимися генетически сконструированными, характеризуются одним или несколькими из следующих признаков: (a) повышенной способностью к экспансии в культуре, (b) повышенной способностью к пролиферации, (c) сниженным уровнем апоптоза и (d) повышенной частотой активации. Такие генетически сконструированные Т-клетки могут предусматривать (i) мутированный ген, участвующий в самообновлении клеток; (ii) нарушенный ген, участвующий в апоптозе; (iii) нарушенный ген, участвующий в регуляции истощения Т-клеток; или (iv) комбинацию любых из (i)-(iii).



A1

202290796

202290796

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573388EA/025

ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫЕ Т-КЛЕТКИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ УЛУЧШЕННОЙ ПЕРСИСТЕНЦИЕЙ В КУЛЬТУРЕ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/927016, поданной 6 сентября 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/927264, поданной 30 октября 2019 г., и предварительной заявки на патент США № 63/034646, поданной 4 июня 2020 г. Каждая из предшествующих заявок тем самым включена посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В терапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) используют генетически модифицированные Т-клетки для более специфичного и эффективного нацеливания и уничтожения раковых клеток. После сбора Т-клеток из крови их конструируют с возможностью размещения CAR на их поверхности. CAR можно вводить в Т-клетки с использованием технологии редактирования генов CRISPR/Cas9. Когда эти аллогенные Т-клетки с CAR вводят путем инъекции пациенту, рецепторы позволяют Т-клеткам уничтожать раковые клетки.

Т-клетки, характеризующиеся улучшенной персистенцией в культуре, требуются для терапии на основе Т-клеток с CAR. Продолжительность жизни таких Т-клеток является более высокой как *in vitro*, так и *in vivo*, что обеспечивает преимущества применительно к изготовлению Т-клеток с CAR и вариантам клинического применения. Однако улучшение персистенции Т-клеток в культуре остается затруднительным.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на разработке банка Т-клеток, содержащего Т-клетки, подвергнутые генетическому редактированию определенных генов (например, генов, участвующих в самообновлении клеток, таких как TET2, апоптозе, таких как FAS, Т-клеточном истощении или репликативном старении, таких как CD70, или их комбинации), для улучшения персистенции Т-клеток в культуре клеток. Генетически отредактированные Т-клетки, раскрытые в данном документе, продемонстрировали усиленную экспансию и способность к пролиферации клеток в культуре, сниженный апоптоз (например, индуцированный лигандом FAS), повышенную частоту активации (например, усиленную цитотоксичность) и усиленную эффективность CAR-T в моделях на животных (посредством, например, более длительной персистенции). Например, Т-клетки с CAR, характеризующиеся нарушенным геном TET2, демонстрировали оба эффекта из улучшенного роста и обогащения CAR-T *in vitro* и обеспечивали более продолжительную персистенцию клеток в моделях на животных, характеризующихся наличием как гемобластозов, так и солидных опухолей. Кроме того, генетически отредактированные Т-клетки, характеризующиеся нарушенным геном TET2, продемонстрировали цитокин-зависимый рост, что указывает на безопасность. Такой банк

Т-клеток (например, характеризующихся нарушенным геном *TET2*) можно использовать для получения терапевтических Т-клеток, например Т-клеток с CAR.

Соответственно, один аспект по настоящему изобретению предусматривает популяцию генетически сконструированных Т-клеток (банк Т-клеток), содержащих (i) мутированный ген, участвующий в самообновлении клеток; (ii) нарушенный ген, участвующий в апоптозе; (iii) нарушенный ген, участвующий в регуляции истощения Т-клеток или репликативном старении; или (iv) комбинацию любых из (i)-(iii). Популяция генетически сконструированных Т-клеток по сравнению с аналогичными Т-клетками, не являющимися генетически сконструированными, характеризуется одной или несколькими следующими превосходными характеристиками: (a) повышенной способностью к экспансии в культуре, (b) повышенной способностью к пролиферации, (c) сниженным уровнем апоптоза и (d) повышенной частотой активации. Банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, можно получать из первичных Т-клеток от одного или нескольких доноров, например, одного или нескольких доноров-людей.

В некоторых вариантах осуществления гены, участвующие в самообновлении клеток могут предусматривать ген *TET2*. Мутированный ген *TET2* может представлять собой нарушенный ген *TET2*, который не обеспечивает экспрессию функционального белка TET2. В качестве альтернативы ген *TET2* может представлять собой модулированный ген *TET2*, который обеспечивает экспрессию усеченной версии *TET2* (например, усеченной версии, характеризующейся молекулярным весом, составляющим около 170 кДа). Любой из мутированных генов *TET2* можно генетически редактировать посредством CRISPR/Cas-опосредованного редактирования генов, например, с применением направляющей РНК (gRNA), нацеливающейся на требуемый сайт в гене *TET2* (либо в кодирующей области, либо в некодирующей области). В некоторых примерах мутированный ген *TET2* может характеризоваться одним или несколькими событиями генетического редактирования в одном или нескольких из экзона 1, экзона 3, экзона 4, экзона 5 и экзона 6. В конкретных примерах мутированный ген *TET2* является генетически отредактированным с применением gRNA, предусматривающей SEQ ID NO: 14, 18, 22, 26, 112, 116 или 120.

В некоторых вариантах осуществления гены, участвующие в апоптозе, могут предусматривать FAS и/или гены, участвующие в истощении Т-клеток, могут предусматривать CD70. Такие гены могут являться нарушенными, например, посредством CRISPR/Cas-опосредованного редактирования генов. Иллюстративные gRNA, нацеливающиеся на FAS, могут предусматривать SEQ ID NO: 69, 73, 77, 81 или 85. Иллюстративные gRNA, нацеливающиеся на CD70, могут предусматривать SEQ ID NO: 34, 38, 42, 46, 50, 54 или 58.

В некоторых вариантах осуществления популяция генетически сконструированных Т-клеток, описанных в данном документе, может предусматривать комбинацию по меньшей мере одного мутированного гена, участвующего в самообновлении клеток (например, TET2), по меньшей мере одного гена, участвующего в апоптозе (например,

FAS), и/или по меньшей мере одного гена, участвующего в истощении Т-клеток (например, CD70).

Любая популяция генетически сконструированных Т-клеток, описанных в данном документе, может дополнительно предусматривать нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$), нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки можно подвергать дополнительному конструированию с обеспечением экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), например, предусматривая нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В некоторых примерах нуклеиновая кислота вставлена в геном Т-клеток. В конкретных примерах генетически сконструированные Т-клетки могут характеризоваться нарушенным геном TRAC, в который может быть вставлена нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления CAR может нацеливаться на опухолевый антиген. Примеры включают CD19, антиген созревания В-клеток (BCMA) или CD70.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе. Такой способ может включать (а) обеспечение совокупности клеток, которые представляют собой Т-клетки или их клетки-предшественники; (b) генетическое редактирование по меньшей мере одного гена, участвующего в самообновлении клеток (например, *TET2*), по меньшей мере одного гена, участвующего в апоптозе (например, FAS), и/или по меньшей мере одного гена, участвующего в регуляции истощения Т-клеток (например, CD70); и (c) получение популяции генетически сконструированных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки из стадии (а) могут быть получены от одного или нескольких подходящих доноров, например, одного или нескольких доноров-людей. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки демонстрируют цитокин-зависимый рост.

В некоторых вариантах осуществления стадию (b) можно осуществлять путем доставки по отношению к клеткам (а) одной или нескольких РНК-направляемых нуклеаз и одной или нескольких gRNA, специфичных в отношении одного или нескольких генов-мишеней, раскрытых в данном документе. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза может представлять собой нуклеазу Cas9, например, нуклеазу Cas9 S. pyogenes. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза и одна или несколько gRNA могут быть объединены в комплекс с образованием рибонуклеопротеиновой частицы (RNP). Стадию (b) можно осуществлять посредством одной процедуры электропорации. В качестве альтернативы стадию (b) можно осуществлять посредством двух последовательных процедур электропорации.

В некоторых вариантах осуществления ген-мишень предусматривает *TET2*. Иллюстративная gRNA, нацеливающаяся на *TET2*, может являться специфичной в отношении экзона 1, экзона 3, экзона 4, экзона 5 и/или экзона 6 гена *TET2*. Такие gRNA могут содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 14, 18, 22 или 26. В

качестве альтернативы или в дополнение гены-мишени могут предусматривать FAS и/или CD70. Иллюстративные gRNA, нацеливающиеся на FAS, могут содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 69, 73, 77, 81 или 85. Иллюстративные gRNA, нацеливающиеся на CD70, могут содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 34, 38, 42, 46, 50, 54 или 58.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), с применением генетически сконструированных Т-клеток из любого из банков Т-клеток, раскрытых в данном документе. Такой способ может включать (а) обеспечение совокупности Т-клеток из банка Т-клеток, которая может предусматривать генетически сконструированные Т-клетки, характеризующиеся по меньшей мере одним геном, участвующим в самообновлении клеток (например, *TET2*), по меньшей мере одним геном, участвующим в апоптозе (например, FAS), и/или по меньшей мере одним геном, участвующим в регуляции истощения Т-клеток (например, CD70); (b) доставку по отношению к совокупности Т-клеток нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR; и (c) получение генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления совокупность Т-клеток из банка Т-клеток дополнительно предусматривает нарушенный ген $\beta 2M$. В других вариантах осуществления способ может дополнительно включать генетическое редактирование гена $\beta 2M$, например, доставку по отношению к совокупности Т-клеток gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$.

В некоторых вариантах осуществления совокупность Т-клеток из банка Т-клеток дополнительно предусматривает нарушенный ген TRAC. В других вариантах осуществления способ может дополнительно включать генетическое редактирование гена TRAC, например, доставку по отношению к совокупности Т-клеток gRNA, нацеливающейся на ген TRAC.

В любом из способов, раскрытых в данном документе, РНК-направляемая нуклеаза может быть доставлена по отношению к совокупности Т-клеток из банка Т-клеток. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза может представлять собой нуклеазу Cas9, например, нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза и gRNA могут быть объединены в комплекс с образованием рибонуклеопротеиновой частицы (RNP).

Генетически отредактированные Т-клетки, полученные с помощью любого из способов получения, раскрытых в данном документе, также попадают в объем настоящего изобретения.

Любую из Т-клеток с CAR, раскрытых в данном документе, можно использовать в терапевтических целях (например, для элиминации пораженных заболеванием клеток, на которые нацеливается полипептид CAR, находящийся на Т-клетках с CAR) при дозе являющейся более низкой, чем стандартная доза средства терапии на основе Т-клеток с CAR, которая относится к дозе Т-клеток с CAR, экспрессирующих идентичный

полипептид CAR и не подвергавшихся процедурам генетического редактирования для усиления персистенции Т-клеток, как раскрыто в данном документе (например, не подвергавшихся процедурам генетического редактирования TET2, FAS и/или CD70).

Также в объем настоящего изобретения попадает направляющая РНК (gRNA), нацеливающаяся на ген *TET2*. В некоторых вариантах осуществления gRNA содержит нуклеотидную последовательность, специфичную в отношении экзона 5 гена *TET2*. В некоторых примерах ген *TET2*, отредактированный с помощью gRNA, может обеспечивать экспрессию усеченной версии TET2. Такая gRNA может нацеливаться на сайт GGGATGTCCTATTGCTAAGT (SEQ ID NO: 125) в экзоне 5 гена *TET2*. В одном примере gRNA может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 18. В качестве альтернативы gRNA может нацеливаться на сайт AGGGATGTCCTATTGCTAAG (SEQ ID NO: 126) в экзоне 5 гена *TET2*. В одном примере gRNA может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 22.

В других вариантах осуществления gRNA может содержать нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на экзон 3 гена *TET2*. Например, gRNA может содержать нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на

GATTCGCTTGGTGAAAACG (SEQ ID NO: 129) в экзоне 3 гена *TET2*. В качестве альтернативы gRNA может содержать нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на CAGGACTCACACGACTATTC (SEQ ID NO: 131) в экзоне 3 гена *TET2*. В другом примере gRNA может содержать нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на TTCCGCTTGGTGAAAACGAG (SEQ ID NO: 133) в экзоне 3 гена *TET2*. Иллюстративные gRNA могут содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 112, 116 или 120.

В некоторых вариантах осуществления gRNA может содержать нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на экзон 4 гена *TET2*. Например, gRNA может содержать нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на

CATTAGGACCTGCTCCTAGA (SEQ ID NO: 124) в экзоне 4 гена *TET2*. В одном примере gRNA может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления gRNA может содержать нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на экзон 6 гена *TET2*. Например, gRNA может содержать нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на ACGGCACGCTCACCAATCGC (SEQ ID NO: 127) в экзоне 6 гена *TET2*. В одном примере gRNA может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26.

Любая из gRNA, раскрытых в данном документе, может дополнительно содержать каркасную последовательность. В некоторых случаях gRNA может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов, например, один или несколько 2'-О-метилфосфотиоатных остатков на 5'- и/или 3'-конце gRNA. Иллюстративные gRNA, нацеливающиеся на *TET2*, представлены в **таблице 3** (в том числе немодифицированные последовательности и модифицированные последовательности), все из которых попадают в объем настоящего изобретения и могут быть использованы в любом из способов,

раскрытых в данном документе, для генетического редактирования генов *TET2* в клетке-хозяине, такой как Т-клетка.

Подробности одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения изложены в описании ниже. Другие особенности или преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующих графических материалов и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A-1D включают диаграммы, демонстрирующие, что мутации, ведущие либо к нокауту (КО) гена *TET2*, либо к усечению белка, повышали пролиферацию и экспансию первичных Т-клеток человека. На **фиг. 1A** представлено изображение, демонстрирующее наличие белков TET2 в первичных Т-клетках человека, отредактированных по целевому для gRNA экзону 5 гена *TET2*, как определено посредством вестерн-блот-анализа. Наличия белка не было выявлено в клетках, трансфицированных одной из gRNA, включающих TET2-экзон 5_T1 и TET2-экзон 5_T2. gRNA TET2-экзон 5_T1 обеспечивала продуцирование усеченной формы белка TET2. На **фиг. 1B** представлено изображение, демонстрирующее наличие белков TET2 в первичных Т-клетках человека, отредактированных по целевым для gRNA экзону 4 или экзону 6 гена *TET2*, как определено посредством вестерн-блот-анализа. Полноразмерный белок не был выявлен в клетках, трансфицированных TET2-экзон 4_BG4 и TET2-экзон 6_BG5. Обработка с помощью TET2-экзон 6_BG5 также обеспечивает продуцирование усеченной формы белка TET2. На **фиг. 1C** представлен график, демонстрирующий, что модуляция TET2 значительно усиливала пролиферацию и экспансию Т-клеток в культуре. Делеция в TET2, введенная с помощью TET2-экзон 5_T1 и TET2-экзон 5_T2, повышала пролиферацию Т-клеток по сравнению с имитационной группой. Т-клетки с усеченным TET2 (TET2-экзон 5_T1) характеризовались более высоким уровнем пролиферации по сравнению со всеми другими группами. На **фиг. 1D** представлен график, демонстрирующий, что модуляция TET2 значительно усиливала пролиферацию Т-клеток в культуре. Делеция в TET2, введенная с помощью либо TET2-экзон 4_BG4 (BG4), либо TET2-экзон 6_BG5 (BG5), повышала пролиферацию и экспансию Т-клеток по сравнению с клетками, не подвергавшимися воздействию RNP Cas9:sgRNA.

Фиг. 2A-2C включают диаграммы, демонстрирующие, что нокаут (КО) FAS повышал управляемую цитокином пролиферацию и обеспечивал устойчивость к апоптозу Т-клеток с CAR к BCMA *in vitro*. На **фиг. 2A** представлен график, демонстрирующий высокоэффективное редактирование гена FAS в первичных Т-клетках человека. Группа FMO-FAS представляет собой группу флуоресценции с комбинацией детектируемых меток без одной, являющейся отрицательным контролем для сигнала FAS. На **фиг. 2B** представлен график, демонстрирующий, что нокаут FAS улучшал управляемую IL-2/IL-7 пролиферацию Т-клеток с CAR к BCMA *in vitro*. На **фиг. 2C** представлен график,

демонстрирующий, что нокаут FAS обеспечивал устойчивость Т-клеток CAR+ к BCMA к апоптозу, индуцируемому антителом к FAS.

Фиг. 3А и 3В включают диаграммы, демонстрирующие повышенное уничтожение клеток и пролиферацию клеток в случае Т-клеток с нокаутом трех генов (нокауты FAS/TET2/CD70). На **фиг. 3А** представлен график, демонстрирующий, что нокаут трех генов FAS/TET2/CD70 усиливал функцию уничтожения клеток (48 часов) для Т-клеток с CAR к CD19. На **фиг. 3В** представлен график, демонстрирующий, что пролиферация клеток продолжалась в случае Т-клеток с нокаутом трех генов через четыре недели в культуре.

Фиг. 4 включает график, демонстрирующий экспансию Т-клеток с CAR у мышей с острым лимфобластным лейкозом. Мышей обрабатывали с помощью Т-клеток с CAR к CD19, характеризующихся нарушенными генами TRAC и B2M, и необязательно в комбинации с нарушенными TET2, CD70 и/или FAS, как указано.

Фиг. 5А-5В включает графики, демонстрирующие повышение выживаемости и подавление опухоли с помощью Т-клеток с CAR у мышей с острым лимфобластным лейкозом. На **фиг. 5А** представлен график, демонстрирующий повышение выживаемости при добавлении КО TET2 в Т-клетках с CAR. На **фиг. 5В** представлен график, демонстрирующий, что добавление КО TET2 дополнительно уменьшает опухолевую нагрузку у мышей, обработанных с помощью Т-клеток с CAR.

Фиг. 6А-6Е включают графики, демонстрирующие защитный эффект Т-клеток с CAR, предусматривающих наличие КО TET2, когда они подвергались повторному воздействию опухоли. На **фиг. 6А** представлен график, демонстрирующий защитный эффект КО TET2 в Т-клетках с CAR к CD19 при повторном воздействии опухолью. На **фиг. 6В** представлен график, демонстрирующий защитный эффект КО TET2 в Т-клетках с CAR к BCMA. На **фиг. 6С** представлен график, демонстрирующий защитный эффект КО TET2 в Т-клетках с CAR к BCMA при повторном воздействии опухолью. На **фиг. 6Д** представлен график, демонстрирующий защитный эффект КО TET2 в Т-клетках с CAR к CD70. На **фиг. 6Е** представлен график, демонстрирующий защитный эффект КО TET2 в Т-клетках с CAR к CD70 при повторном воздействии опухолью.

Фиг. 7 включает график, демонстрирующий цитокин-независимый рост Т-клеток с CAR TRAC-/B2M-/TET2-.

Фиг. 8А-8Д включают графики, демонстрирующие преимущественные признаки, обеспечиваемые КО TET в Т-клетках с CAR к BCMA, по сравнению с Т-клетками с CAR к BCMA с TET дикого типа. На **фиг. 8А** представлена диаграмма, демонстрирующая кривые роста при экспансии Т-клеток с CAR к BCMA +/- КО TET2 после 3 циклов стимуляции клетками-мишенями MM.1S. На **фиг. 8В** представлена диаграмма, демонстрирующая кривые жизнеспособности Т-клеток с CAR к BCMA +/- КО TET2 после 3 циклов стимуляции клетками-мишенями MM.1S. На **фиг. 8С** представлена диаграмма, демонстрирующая кривые поверхностной экспрессии согласно результатам FACS для Т-клеток с CAR к BCMA +/- КО TET2 после 3 циклов стимуляции клетками-мишенями

MM.1S. На **фиг. 8D** представлена схема, демонстрирующая ответ в виде секреции цитокина (IFN γ) после стимуляции с помощью MM1S T-клеток с CAR к BCMA +/- KO TET2.

Фиг. 9A-9E включают диаграммы, демонстрирующие персистенцию аллогенных T-клеток с CAR к CD19 человека, характеризующихся нарушенными генами TET2, FAS и CD70. На **фиг. 9A** представлена диаграмма, демонстрирующая непрерывную пролиферацию клеток, которая является цитокин-зависимой. На **фиг. 9B** представлена диаграмма, демонстрирующая активность в отношении уничтожения клеток аллогенными T-клетками с CAR к CD19 человека через один месяц после выделения селезенки. На **фиг. 9C** представлен график, демонстрирующий секрецию гамма-интерферона, обеспечиваемую аллогенными T-клетками с CAR к CD19 человека. На **фиг. 9D** представлен график, демонстрирующий секрецию интерлейкина-2 (IL-2), обеспечиваемую аллогенными T-клетками с CAR к CD19 человека. На **фиг. 9E** представлена схема, демонстрирующая выживаемость аллогенных T-клеток с CAR к CD19 человека в мышинной модели Nalm6/NOG.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение направлено на создание банка T-клеток, содержащего T-клетки, характеризующиеся улучшенной персистенцией, что является давно испытываемой потребностью в терапии на основе T-клеток с CAR. Для такого банка T-клеток можно использовать T-клетки *bona fide* в качестве исходного материала, например, нетрансформированные T-клетки, терминально-дифференцированные T-клетки, T-клетки, характеризующиеся стабильным геномом, и/или T-клетки, которые зависят от цитокинов и факторов роста, для пролиферации и экспансии. В качестве альтернативы для такого банка T-клеток можно использовать T-клетки, полученные из клеток-предшественников, таких как гемопоэтические стволовые клетки (например, iPSC), например, культуры *in vitro*. Банк T-клеток, раскрытый в данном документе, может обеспечивать одно или несколько преимуществ как для изготовления T-клеток с CAR, так и для вариантов клинического применения.

Осуществляют получение обычных аллогенных T-клеток с CAR, при этом один донорский лейкопак редактируют в большинстве случаев таким образом, чтобы клетки могли избегать взаимодействия с компонентами иммунной системы пациента и, таким образом, не вызывать GvHD. Способ экспансии данных T-клеток с CAR может обеспечивать от 10-ки до 100-ни единиц лекарственного продукта во флаконах. Пациенты могут получать одну дозу или несколько доз. В ходе процедуры изготовления данные T-клетки с CAR теряют потенциальную эффективность вследствие различных механизмов, например, апоптоза, истощения, репликативного старения и других процессов, где клетка становится менее приспособленной.

Банк отредактированных T-клеток, раскрытый в данном документе, может обеспечивать способ, посредством которого один лейкопак может обеспечить создание банка клеток, состоящего от 10-ков до 100-ен "флаконов" клеток, каждый из которых

можно использовать для создания лекарственного продукта на основе аллогенных Т-клеток с CAR во множестве флаконов. Ожидается, что как клетки банка, так и Т-клетки с CAR, полученные из них, сохраняют более высокую потенциальную эффективность, чем Т-клетки с CAR, полученные с помощью стандартного (без использования банка клеток) способа (без одного или нескольких событий генетического редактирования, раскрытых в данном документе).

Другие преимущественные признаки, которыми характеризуется банк Т-клеток, предусмотренный в данном документе, без ограничения включают:

(a) Улучшенное качество и стабильность лекарственных продуктов, таких как продукты на основе Т-клеток с CAR.

(b) Большую эффективность и более продолжительную эффективность Т-клеток с CAR, полученных из клеток банка Т-клеток от людей-пациентов.

(c) Сниженные требования к величине дозы. Поскольку Т-клетки, раскрытые в данном документе, характеризуются усиленными способностями к пролиферации и экспансии, их продолжительность жизни *in vivo* является более высокой. Соответственно, более низкая доза относительно стандартного средства терапии на основе Т-клеток с CAR могла бы достичь по сути аналогичных терапевтических эффектов, что и обычные Т-клетки с CAR, не подвергавшиеся процедурам редактирования генов, раскрытых в данном документе (например, нарушениям *TET2*).

(d) Повышение безопасности. Было обнаружено, что рост генетически сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе, зависит от цитокина, указывая на отсутствие трансформации. Кроме того, поскольку более низкие дозы могут быть достаточными, ожидается, что применение Т-клеток с CAR, раскрытых в данном документе, будет снижать побочные эффекты, обычно связанные со средством терапии на основе Т-клеток с CAR, например, синдром высвобождения цитокинов (CRS), синдром активации макрофагов (MAS), синдром лизиса опухоли (TLS) и/или нейротоксические эффекты.

(e) Повышенная эффективность, обеспечиваемая в результате усиленных пролиферации и экспансии Т-клеток с CAR, раскрытых в данном документе, усиленной цитотоксичности и пролонгированной персистенции *in vivo*. Кроме того, банк Т-клеток обеспечит преимущество титруемых доз у пациентов для оптимизации безопасности и эффективности, как отмечалось выше.

(f) Длительные терапевтические эффекты вследствие сниженного истощения и/или репликативного старения и пролонгированной персистенции Т-клеток из банка Т-клеток как *in vitro*, так и *in vivo*.

(g) Повышение количества лекарственного продукта во флаконах, как например продукты на основе аллогенных Т-клеток с CAR, которые можно создать из подходящего естественного источника, такого как отдельный лейкопак.

Соответственно, в данном документе предусмотрены банки Т-клеток, которые содержат Т-клетки, характеризующиеся улучшенной персистенцией в культуре, способы

получения таких банков Т-клеток и способы использования таких банков Т-клеток для получения терапевтических Т-клеток, таких как Т-клетки с CAR. Компоненты и способы (например, опосредованный CRISPR/Cas подход для редактирования генов и компоненты, используемые в данном документе) для получения банков Т-клеток, раскрытых в данном документе, также попадают в объем настоящего изобретения.

I. Банк Т-клеток, характеризующийся усиленной персистенцией

Банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержит генетически сконструированные Т-клетки, характеризующиеся усиленной персистенцией в культуре. Такие генетически сконструированные Т-клетки могут характеризоваться подвергнутыми генетическому редактированию одним или несколькими генами, участвующими в самообновлении клеток, одним или несколькими генами, участвующими в апоптозе, и/или одним или несколькими генами, участвующими в истощении Т-клеток. Как показали исследования, раскрытые в данном документе, такие генетически сконструированные Т-клетки демонстрируют одну или несколько следующих превосходных характеристик относительно не подвергавшейся редактированию аналогичной Т-клетки: усиленную способность к экспансии в культуре (например, возможность осуществления экспансии в культуре в течение по меньшей мере 4 недель, например, по меньшей мере 6 недель; и/или возможность по меньшей мере 10-кратной экспансии, например, по меньшей мере 15-кратной экспансии, относительно не подвергавшегося редактированию аналога), усиленную способность к пролиферации, более высокий уровень активации Т-клеток и сниженные уровни апоптоза.

(i) Генетически сконструированные Т-клетки из банков Т-клеток

Генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, предусматривают редактирование генов, относящихся к одному или нескольким генам, связанным с персистенцией Т-клеток в культуре. Термин "персистенция Т-клеток", используемый в данном документе, относится к склонности Т-клеток к продолжению роста, пролиферации, самообновления, экспансии и сохранению здоровой активности в культуре. В некоторых случаях персистенция Т-клеток может быть представлена продолжительностью периода, в течение которого Т-клетки могут расти и осуществлять экспансию *in vitro*, что можно измерить с помощью традиционных способов и/или анализов, описанных в данном документе. В других случаях персистенция Т-клеток может быть представлена снижением клеточной гибели (например, апоптоза) или снижением выраженности состояний клеток, характеризующихся истощением или репликативным старением. В еще других случаях персистенция Т-клеток может быть представлена сохранением способности Т-клеток к активации в культуре.

Персистенции генетически сконструированных Т-клеток можно достичь с помощью генетического редактирования одного или нескольких генов, которые участвуют в регуляции персистенции клеток посредством различных путей, например, модуляции самообновления клеток, апоптоза и/или истощения клеток. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки могут

предусматривать редактирование генов, выполненное в отношении нескольких генов, участвующих в нескольких путях, которые регулируют персистенцию клеток. Такие генетически сконструированные Т-клетки могут характеризоваться увеличенной продолжительностью роста в культуре. Кроме того, Т-клетки с CAR, полученные из таких генетически сконструированных Т-клеток, могут также характеризоваться усиленной терапевтической эффективностью *in vivo*.

Генетически сконструированные Т-клетки могут быть получены из родительских Т-клеток (например, не подвергавшихся редактированию Т-клеток дикого типа), полученных из подходящего источника, например, от одного или нескольких доноров-млекопитающих. В некоторых примерах родительские Т-клетки представляет собой первичные Т-клетки (например, нетрансформированные и терминально-дифференцированные Т-клетки), полученные от одного или нескольких доноров-людей. В качестве альтернативы родительские клетки могут быть дифференцированы из Т-клеток-предшественников, полученных от одного или нескольких подходящих доноров или из стволовых клеток, таких как гемапоэтические стволовые клетки или индуцируемые плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), которые можно культивировать *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки содержат один или несколько мутированных генов, участвующих в самообновлении клеток, один или несколько нарушенных генов, участвующих в апоптозе, и/или один или несколько нарушенных генов, участвующих в истощении клеток. Такие Т-клетки можно получать посредством редактирования генов (в том числе редактирования генома), являющегося типом генной инженерии, при котором нуклеотид(-ды)/нуклеиновую(-ые) кислоту(-ы) вставляют, удаляют и/или замещают в последовательности ДНК, как например в геноме целевой клетки. Целевое редактирование гена позволяет осуществлять вставку, делецию и/или замену в предварительно выбранных сайтах в геноме целевой клетки (например, в целевом гене или целевой последовательности ДНК). При редактировании последовательности эндогенного гена, например, путем делеции, вставки или замены нуклеотида(-ов)/нуклеиновой(-ых) кислоты(-от) эндогенный ген, содержащий затронутую последовательность, может быть подвергнут нокауту или нокдауну из-за изменения последовательности. Следовательно, целевое редактирование может использоваться для нарушения экспрессии эндогенных генов. "Целевая интеграция" относится к процессу, предусматривающему вставку одной или нескольких экзогенных последовательностей с или без делеции эндогенной последовательности в сайте вставки. Целевая интеграция может быть результатом целевого редактирования гена, если присутствует донорная матрица, содержащая экзогенную последовательность.

Как используется в данном документе, "мутированный ген" охватывает любой тип генетических мутаций, введенных в ген-мишень. В некоторых случаях термин "мутированный ген" может включать генетическую мутацию, которая приводит к экспрессии продукта мутированного гена (например, продукта усеченного гена). В других случаях термин "мутированный ген" может представлять собой нарушенный ген, который

может содержать генетическую мутацию, которая существенно или полностью устраняет экспрессию продукта гена.

Используемый в данном документе термин "нарушенный ген" относится к гену, содержащему вставку, делецию или замену относительно эндогенного гена, так что экспрессия функционального белка из эндогенного гена снижается или подавляется. Используемый в данном документе термин "нарушение гена" относится к способу вставки, делеции или замещения по меньшей мере одного(-ой) нуклеотида/нуклеиновой кислоты в эндогенном гене, так что экспрессия функционального белка из эндогенного гена снижается или подавляется. Способы нарушения гена известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления клетка, которая предусматривает нарушенный ген, не экспрессирует (например, на клеточной поверхности) на обнаруживаемом уровне (например, согласно иммунному анализу с применением антитела, связывающегося с кодируемым белком, или как установлено посредством проточной цитометрии) белок, кодируемый геном. Клетка, которая не экспрессирует белок на обнаруживаемом уровне, может называться нокаутной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, могут содержать мутированный ген *TET2*, нарушенный ген *FAS*, нарушенный ген *CD70* или их комбинацию. В некоторых случаях также можно предусматривать генетическое редактирование дополнительных генов (например, *β2M* и/или *TRAC*).

Редактирование гена *Tet*-метилцитозиндиоксигеназы 2 (*TET2*)

Самообновление представляет собой процесс, посредством которого клетки (например, Т-клетки) делятся и сохраняют такое же состояние/идентичность клеток. Гены, участвующие в самообновлении клеток, относятся к генам, которые либо положительно регулируют, либо отрицательно регулируют самообновление клеток. Генетически сконструированные Т-клетки, раскрытые в данном документе, могут предусматривать генетическое редактирование гена, который положительно регулирует самообновление клеток, для усиления его экспрессии и/или биоактивности кодируемого белкового продукта. В качестве альтернативы или в дополнение генетически сконструированные Т-клетки могут предусматривать генетическое редактирование гена, который отрицательно регулирует самообновление клеток, для нарушения его экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки могут содержать мутированный ген, участвующий в самообновлении клеток. Такой ген может представлять собой *TET2* (десять-одиннадцать транслокация-2), кодирующий метилцитозиндиоксигеназу. *Tet2* представляет собой диоксигеназу, которая катализирует превращение модифицированного геномного основания метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин и в дополнительные промежуточные продукты, приводя к деметилированию цитозина. Данный фермент участвует в миелопоэзе, и сообщалось, что дефекты в *TET2* связаны с несколькими миелопролиферативными нарушениями.

Структуры генов *TET2* известны из уровня техники. Например, ген *TET2* человека расположен на хромосоме 4q24. Дополнительную информацию можно найти в GenBank под идентификатором Gene ID: 54790 или под эталонной последовательностью NCBI: NM_001127208.2.

В некоторых примерах генетически сконструированные Т-клетки могут предусматривать нарушенный ген *TET2*, вследствие чего экспрессия *TET2* в Т-клетках является существенно сниженной или полностью устраненной. Нарушенный ген *TET2* может предусматривать одно или несколько генетических редактирований в одном или нескольких подходящих целевых сайтах (например, в кодирующих областях или в некодирующих регуляторных областях, таких как промоторные области), которые нарушают экспрессию гена *TET2*. Такие целевые сайты можно идентифицировать на основе подхода редактирования генов для применения в получении генетически сконструированных Т-клеток. Иллюстративные целевые сайты для генетических редактирований могут включать экзон 1, экзон 3, экзон 4, экзон 5, экзон 6 или их комбинацию. В некоторых примерах одно или несколько событий генетического редактирования могут происходить в экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5 или экзоне 6. Такое генетическое редактирование может быть индуцировано посредством технологии CRISPR/Cas с применением подходящей направляющей РНК, например тех, которые перечислены в **таблице 3**. Полученный в результате ген *TET2*, отредактированный с применением gRNA, перечисленной в **таблице 3**, может содержать одну или несколько отредактированных последовательностей, представленных в **таблицах 15-21** ниже.

В других примерах генетически сконструированные Т-клетки могут содержать мутированный ген *TET2*, экспрессирующий усеченную версию белка *TET2*, которая может представлять собой вариант *TET2* с приобретением функции. Такой мутированный ген *TET2* может характеризоваться подвергнутым генетическому редактированию экзоном 5 и обеспечивать продуцирование усеченного варианта *TET2*, характеризующегося молекулярным весом, составляющим приблизительно 170 кДа, что можно определить посредством традиционного способа, такого как SDS-PAGE.

Термин "приблизительно", используемый в данном документе, означает нахождение конкретного значения в пределах приемлемого диапазона ошибок, определенного специалистом в данной области техники, который будет зависеть частично от того, каким образом значение измеряют или определяют, т. е. ограничений системы измерения. Например, термин "приблизительно" может означать в пределах приемлемого стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. В качестве альтернативы термин "приблизительно" может означать диапазон вплоть до $\pm 20\%$, предпочтительно вплоть до $\pm 10\%$, более предпочтительно вплоть до $\pm 5\%$ и еще более предпочтительно вплоть до $\pm 1\%$ от определенного значения. В случаях, где определенные значения описаны в заявке и формуле изобретения, если не указано иное, наличие термина "приблизительно" является подразумеваемым, и в данном контексте для конкретного значения он означает нахождение в пределах приемлемого диапазона

ошибок.

В некоторых примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, может содержать генетически сконструированные Т-клетки, по меньшей мере 50% из которых предусматривают нарушенный ген *TET2* (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или больше). В некоторых примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, может содержать генетически сконструированные Т-клетки, по меньшей мере 50% из которых предусматривают мутированный ген *TET2* (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или больше), который может обеспечивать экспрессию усеченной версии TET2, такую как раскрытая выше.

Редактирование гена FAS

Апоптоз представляет собой процесс запрограммированной клеточной гибели, который происходит во многоклеточных организмах. Гены, участвующие в апоптозе, относятся к генам, которые либо положительно регулируют, либо отрицательно регулируют данный биологический процесс. Генетически сконструированные Т-клетки, раскрытые в данном документе, могут предусматривать генетическое редактирование гена, который положительно регулирует апоптоз клеток, для нарушения его экспрессии. В качестве альтернативы или в дополнение генетически сконструированные Т-клетки могут предусматривать генетическое редактирование гена, который отрицательно регулирует апоптоз клеток, для усиления его экспрессии и/или биологической активности продукта гена.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки могут содержать отредактированный ген, участвующий в апоптозе клеток, например, подвергнутый нарушению ген, который положительно регулирует апоптоз. Такой ген может представлять собой ген FAS, также известный как рецептор FAS, CD95 или антиген 1 апоптоза (APO-1). Ген FAS кодирует рецептор смерти, находящийся на клеточной поверхности, что приводит к апоптозу при индуцировании лигандом FAS. Индуцированный FASL-FAS апоптоз представляет собой один из множества апоптотических сигнальных путей в клетке (другим основным сигнальным путем является митохондриальный сигнальный путь). Структуры генов FAS известны из уровня техники. Например, ген FAS человека расположен на хромосоме 10q24.1. Дополнительную информацию можно найти в GenBank под идентификатором Gene ID: 355.

В некоторых примерах генетически сконструированные Т-клетки могут предусматривать нарушенный ген FAS, вследствие чего экспрессия FAS в Т-клетках является существенно сниженной или полностью устраненной. Нарушенный ген FAS может предусматривать одно или несколько генетических редактирований в одном или нескольких подходящих целевых сайтах (например, в кодирующих областях или в некодирующих регуляторных областях, таких как промоторные области), которые нарушают экспрессию гена FAS. Такие целевые сайты можно идентифицировать на

основе подхода редактирования генов для применения в получении генетически сконструированных Т-клеток. Иллюстративные целевые сайты для генетических редактирований могут включать экзон 2, экзон 3 или их комбинацию.

В некоторых примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, может содержать генетически сконструированные Т-клетки, по меньшей мере 50% из которых предусматривают нарушенный ген FAS (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или больше).

Редактирование гена CD70

Истощение Т-клеток представляет собой процесс поэтапной и прогрессирующей потери функций Т-клеток, который может быть индуцирован пролонгированной стимуляцией антигеном или другими факторами. Гены, участвующие в истощении Т-клеток, относятся к генам, которые либо положительно регулируют, либо отрицательно регулируют данный биологический процесс. Генетически сконструированные Т-клетки, раскрытые в данном документе, могут предусматривать генетическое редактирование гена, который положительно регулирует истощение Т-клеток, для нарушения его экспрессии. В качестве альтернативы или в дополнение генетически сконструированные Т-клетки могут предусматривать генетическое редактирование гена, который отрицательно регулирует истощение Т-клеток, для усиления его экспрессии и/или биологической активности продукта гена.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки могут содержать отредактированный ген, участвующий в истощении Т-клеток, например, подвергнутый нарушению ген, который положительно регулирует истощение Т-клеток. Такой ген может представлять собой ген кластера дифференцировки 70 (CD70). CD70 является представителем суперсемейства факторов некроза опухоли, и его экспрессия ограничена активированными Т- и В-лимфоцитами и зрелыми дендритными клетками. CD70 участвует в выживаемости опухолевых клеток и регуляторных Т-клеток посредством взаимодействия со своим лигандом CD27. CD70 и его рецептор CD27 играют множество ролей в иммунной функции во множестве типов клеток, в том числе Т-клеток (активированных клеток и клеток T_{reg}) и В-клеток.

Также было обнаружено, что нарушение гена CD70 в иммунных клетках, сконструированных с обеспечением экспрессии нацеливающегося на антиген фрагмента, усиливает противоопухолевую эффективность в отношении крупных опухолей и индуцирует стойкий противораковый вторичный иммунный ответ. В частности, противораковый вторичный иммунный ответ предупреждает рост опухоли при повторном воздействии. Кроме того, было продемонстрировано, что нарушение гена CD70 приводит к усилению цитотоксичности иммунных клеток, сконструированных с обеспечением экспрессии нацеливающегося на антиген фрагмента, при более низких соотношениях сконструированных иммунных клеток и клеток-мишеней, что указывает на потенциальную эффективность низких доз сконструированных иммунных клеток. См.,

например, WO 2019/215500, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе.

Структуры генов CD70 известны из уровня техники. Например, ген CD70 человека расположен на хромосоме 19p13.3. Ген содержит четыре кодирующих белок экзона. Дополнительную информацию можно найти в GenBank под идентификатором Gene ID: 970.

В некоторых примерах генетически сконструированные Т-клетки могут предусматривать нарушенный ген CD70 вследствие чего экспрессия CD70 в Т-клетках является существенно сниженной или полностью устраненной. Нарушенный ген CD70 может предусматривать одно или несколько генетических редактирований в одном или нескольких подходящих целевых сайтах (например, в кодирующих областях или в некодирующих регуляторных областях, таких как промоторные области), которые нарушают экспрессию гена CD70. Такие целевые сайты можно идентифицировать на основе подхода редактирования генов для применения в получении генетически сконструированных Т-клеток. Иллюстративные целевые сайты для генетических редактирований могут включать экзон 1, экзон 2, экзон 3, экзон 4 или их комбинацию. См. также WO 2019/215500, соответствующие раскрытия которой включены посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе.

В некоторых примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, может содержать генетически сконструированные Т-клетки, по меньшей мере 50% из которых предусматривают нарушенный ген CD70 (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или больше).

Редактирование гена $\beta 2M$

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, могут дополнительно предусматривать нарушенный ген $\beta 2M$. $\beta 2M$ представляет собой общий (инвариантный) компонент комплексов МНС I. Нарушение его экспрессии вследствие редактирования генов будет предотвращать реакции "хозяин против терапевтических аллогенных Т-клеток", что приведет к увеличению персистенции аллогенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления экспрессия эндогенного гена $\beta 2M$ элиминируется для предупреждения реакции "хозяин против трансплантата".

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или больше) генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления отредактированный ген $\beta 2M$ может содержать нуклеотидную последовательность, выбранную из следующих последовательностей в **таблице 1**. Специалистам в данной области техники известно, что

различные нуклеотидные последовательности в отредактированном гене, таком как отредактированный ген $\beta 2M$ (например, последовательности в **таблице 1**), можно получать с помощью одной gRNA. См. также WO 2019097305, соответствующие раскрытия которой включены посредством ссылки для заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе.

Таблица 1 Последовательности иллюстративных gRNA, нацеливающих на $\beta 2M$

Последовательности	SEQ ID NO:
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGAGG STATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	1
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCGCCTGGAGGC TATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	2
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGAGGCTAT CCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	3
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGATAGCCT GGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	4
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTAC CCTCCCGCT	5
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGTGGCCTGG AGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	6

Генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, могут дополнительно предусматривать одно или несколько дополнительных редактирований гена (например, нокин или нокаут гена) для улучшения функции Т-клеток. Примеры включают нокин или нокаут генов для улучшения лизиса клеток-мишеней, нокин или нокаут генов для повышения эффективности терапевтических Т-клеток, таких как Т-клетки с CAR, полученные из клеток из банка Т-клеток. Примеры включают нокаут гена контрольной точки иммунного ответа, как например PD-1.

Редактирование гена TRAC

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, могут дополнительно предусматривать нарушенный ген TRAC. Это нарушение приводит к потере функции TCR и делает сконструированную Т-клетку неаллореактивной и пригодной для аллогенной трансплантации, сводя к минимуму риск развития заболевания "хозяин против трансплантата". В некоторых вариантах осуществления экспрессия эндогенного гена TRAC элиминируется для предупреждения реакции "хозяин против трансплантата". См. также WO 2019097305, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе.

Следует понимать, что более чем один подходящий целевой сайт/gRNA можно использовать для каждого гена-мишени, раскрытого в данном документе, например, генов-мишеней, известных из уровня техники или раскрытых в данном документе. Дополнительные примеры можно найти в, например, WO 2019097305, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе.

Иллюстративные генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток

В некоторых вариантах осуществления банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые предусматривают нарушенный ген *TET2*. Такие генетически сконструированные Т-клетки могут дополнительно предусматривать нарушенный ген *FAS*, нарушенный ген *CD70* или оба из них. В некоторых вариантах осуществления банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, может содержать популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые содержат комбинацию по меньшей мере двух генетически отредактированных генов, выбранных из мутированного гена *TET2*, нарушенного гена *FAS* и нарушенного гена *CD70*. Такие генетически сконструированные Т-клетки необязательно могут дополнительно предусматривать нарушенный ген $\beta 2M$, нарушенный ген *TRAC* или оба из них.

В некоторых примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержащий популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые предусматривают нарушенный ген *TET2*, раскрытый в данном документе. В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток не экспрессируют поверхностный *TET2* на обнаруживаемом уровне, как измерено с помощью традиционного анализа.

В некоторых примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые предусматривают нарушенный ген *TET2* и нарушенный ген *FAS*. В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток предусматривают нарушенный ген *TET2* и нарушенный ген *FAS*.

В некоторых примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые предусматривают нарушенный ген *TET2* и нарушенный ген *CD70*. В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток содержат мутированный или нарушенный ген *TET2* и нарушенный ген *CD70*.

В конкретных примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые предусматривают нарушенный ген *TET2*, нарушенный ген *FAS* и нарушенный ген *CD70*. В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток содержат мутированный или нарушенный

ген *TET2*, нарушенный ген *FAS* и нарушенный ген *CD70*.

В некоторых примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые предусматривают мутированный ген *TET2*, обеспечивающий экспрессию любого усеченного полипептида *TET2*, раскрытого в данном документе, и нарушенный ген *FAS*. В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток предусматривают мутированный ген *TET2* и нарушенный ген *FAS*.

В некоторых примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые предусматривают мутированный ген *TET2*, обеспечивающий экспрессию усеченного полипептида *TET2*, раскрытого в данном документе, и нарушенный ген *CD70*. В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток предусматривают мутированный ген *TET2* и нарушенный ген *CD70*.

В конкретных примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые предусматривают нарушенный ген *TET2*, нарушенный ген *FAS* и нарушенный ген *CD70*. В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток предусматривают нарушенный ген *TET2*, нарушенный ген *FAS* и нарушенный ген *CD70*.

В конкретных примерах банк Т-клеток, раскрытый в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые предусматривают мутированный ген *TET2*, обеспечивающий экспрессию любого усеченного полипептида *TET2*, раскрытого в данном документе, нарушенный ген *FAS* и нарушенный ген *CD70*. В некоторых случаях по меньшей мере 50% (например, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток предусматривают мутированный ген *TET2*, нарушенный ген *FAS* и нарушенный ген *CD70*.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток, которые могут предусматривать одно или несколько из мутированного гена *TET2* (например, нарушенного или мутированного с обеспечением экспрессии усеченной версии *TET2*, как раскрыто в данном документе), нарушенного гена *FAS* и нарушенного *CD70*, могут характеризоваться возможностью осуществления экспансии в культуре в течение более чем 4 недель, например, более чем 5 недель, более чем 6 недель, более чем 8 недель и более чем 10 недель. В некоторых примерах генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток предусматривают мутированный ген *TET2*, обеспечивающий экспрессию усеченного полипептида *TET2*, как раскрыто в данном документе (необязательно с нарушениями в *FAS* и/или *CD70*), и характеризуются возможностью осуществления экспансии через 6 недель (например, через 7 недель, через 8 недель, через 9 недель или через 10 недель) в культуре. Такие генетически

сконструированные Т-клетки могут сохранять способность к активированию через 6 недель (например, через 7 недель, через 8 недель, через 9 недель или через 10 недель) в культуре. Кроме того, такие генетически сконструированные Т-клетки характеризуются повышенной способностью к экспансии, которая может быть в по меньшей мере 10 раз (например, в по меньшей мере 15 раз) выше, чем у не являющихся генетически сконструированными аналогов. Не являющиеся генетически сконструированными аналоги относятся к Т-клеткам с таким же генетическим фоном, за исключением гена, участвующего в самообновлении клеток (например, TET2), апоптозе (например, FAS) и/или истощении Т-клеток (например, CD70), как раскрыто в данном документе, т. е. нарушенного/мутированного по сравнению с диким типом.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток могут предусматривать нарушенный ген FAS (необязательно мутированный ген TET2, например, нарушенный или обеспечивающий экспрессию усеченного полипептида TET2, раскрытый в данном документе, и/или нарушенный ген CD70), которые при этом могут характеризоваться сниженной склонностью к апоптозу относительно не являющихся генетически сконструированными аналогов. Например, уровень индуцированного FAS/FAS-лигандом апоптоза генетически сконструированных Т-клеток в культуре может составлять менее 50% (например, менее 40%, менее 30%, менее 20% или меньше) относительно уровня индуцированного FAS/FAS-лигандом апоптоза не являющихся генетически сконструированными аналогов.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки с CAR, полученные с применением генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток, предусматривающие нарушенный ген CD70 (необязательно мутированный ген TET2, например, нарушенный или обеспечивающий экспрессию усеченного полипептида TET2, как раскрыто в данном документе, и/или нарушенный ген FAS), могут характеризоваться улучшенной эффективностью (например, на по меньшей мере 50% выше, в по меньшей мере один раз выше, в по меньшей мере 2 раза выше, в по меньшей мере 5 раз выше или в по меньшей мере 10 раз выше) как *in vitro*, так и *in vivo* относительно не являющихся генетически сконструированными аналогов.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки из банка Т-клеток можно подвергать дополнительному конструированию с обеспечением экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), что описано подробно ниже.

(ii) Способы получения банков Т-клеток

Генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, можно получать с помощью генетического редактирования родительских Т-клеток или их клеток-предшественников посредством традиционного способа редактирования генов или способов, описанных в данном документе.

(a) Т-клетки

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки для применения в получении банка Т-клеток могут быть получены от одного или нескольких подходящих

млекопитающих, например, одного или нескольких доноров-людей. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая без ограничения мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимус, ткань из очага инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В определенных вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта с использованием любого числа методов, известных специалисту в данной области техники, таких как осаждение, например, разделение с помощью FICOLL™.

В некоторых примерах Т-клетки могут быть выделены из смеси иммунных клеток (например, клеток, описанных в данном документе) для получения выделенной популяции Т-клеток, которую можно применять для получения банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе. Например, после выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты могут быть отсортированы на субпопуляции необученных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо до, либо после активации, экспансии и/или генетической модификации.

Специфическая субпопуляция Т-клеток, экспрессирующая один или несколько из следующих маркеров клеточной поверхности: TCRab, CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD122, CD95, CD197, CCR7, KLRG1, белки MCH-I и/или белки MCH-II, может быть дополнительно выделена с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления конкретную субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующую один или несколько из маркеров, выбранных из группы, состоящей из TCRab, CD4 и/или CD8, дополнительно выделяют с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления субпопуляции Т-клеток могут быть выделены путем положительного или отрицательного отбора до процедуры генной инженерии и/или после процедуры генной инженерии.

Выделенная популяция Т-клеток для применения в получении банка Т-клеток может экспрессировать один или несколько маркеров Т-клеток, в том числе без ограничения CD3+, CD4+, CD8+ или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют у донора или субъекта и сначала активируют и стимулируют для пролиферации *in vitro* перед редактированием гена.

В некоторых случаях популяция Т-клеток для применения в получении банка Т-клеток содержит первичные Т-клетки, выделенные от одного или нескольких доноров-людей. Такие Т-клетки являются терминально-дифференцированными, не являются трансформированными, зависят от цитокинов и/или факторов роста для обеспечения своего роста и/или характеризуются стабильными геномами.

В качестве альтернативы Т-клетки для применения в получении банка Т-клеток могут быть получены из стволовых клеток (например, HSC или iPSC) посредством дифференцировки *in vitro*.

Для достижения достаточного количества Т-клеток для получения банка Т-клеток

Т-клетки из подходящего источника могут быть подвергнуты одному или нескольким циклам стимуляции, активации и/или экспансии. Т-клетки могут быть активированы и экспандированы, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514 и 6867041. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки можно активировать и осуществлять их экспансию в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 3 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 4 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 4 дней или приблизительно 1 дня, приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней или приблизительно 4 дней до введения редактирующих геном композиций в Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и осуществляют их экспансию в течение приблизительно 4 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 24 часов, приблизительно 36 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 60 часов или приблизительно 72 часов до введения редактирующих геном композиций в Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют одновременно с введением редактирующих геном композиций в Т-клетки. В некоторых случаях популяцию Т-клеток можно экспандировать и/или активировать после генетического редактирования, раскрытого в данном документе. Популяции Т-клеток или выделенные Т-клетки, полученные с помощью любого из способов редактирования гена, описываемых в данном документе, также попадают в объем настоящего изобретения.

(b) Способы редактирования генов

Любые их генетически сконструированных Т-клеток могут быть получены с применением традиционных способов редактирования генов или способов, описанных в данном документе, для редактирования одного или нескольких генов-мишеней, раскрытых в данном документе (целевое редактирование). Целевое редактирование может быть достигнуто либо с помощью независимого от нуклеазы подхода, либо с помощью зависимого от нуклеазы подхода. В подходе независимого от нуклеазы целевого редактирования гомологичная рекомбинация управляется гомологичными последовательностями, фланкирующими экзогенный полинуклеотид, который вводится в эндогенную последовательность посредством ферментативного механизма клетки-хозяина. С помощью экзогенного полинуклеотида можно осуществлять введение делеции, вставки или замены нуклеотидов в эндогенную последовательность.

В качестве альтернативы, зависимый от нуклеазы подход может обеспечить целевое редактирование с более высокой частотой за счет специфического введения двухнитевых разрывов (DSB) с помощью определенных редкощепящих нуклеаз (например, эндонуклеаз). В таком зависимом от нуклеазы целевом редактировании также

используются механизмы репарации ДНК, например, нехомологичное соединение концов (NHEJ), которое происходит в ответ на DSB. Репарация ДНК с помощью NHEJ часто приводит к случайным вставкам или делециям (инсерционно-делеционным мутациям) небольшого числа эндогенных нуклеотидов. В отличие от опосредованной NHEJ репарации репарация также может представлять собой репарацию, направляемую гомологией (HDR). Если присутствует донорная матрица, содержащая экзогенный генетический материал, фланкированный парой плеч гомологии, экзогенный генетический материал может быть введен в геном с помощью HDR, что приводит к целевой интеграции экзогенного генетического материала.

В некоторых вариантах осуществления нарушение гена может происходить путем делеции геномной последовательности с использованием двух направляющих РНК. Известны способы применения технологии редактирования гена с помощью CRISPR-Cas для получения геномной делеции в клетке (например, для нокаута гена в клетке) (Bauer DE et al. *Vis. Exp.* 2015;95:e52118).

Доступные эндонуклеазы, способные вводить специфические и нацеленные DSB, включают без ограничения нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN) и РНК-направляемую нуклеазу, такую как CRISPR-Cas (например, белок 9, ассоциированный с кластеризованными регулярно-расположенными короткими палиндромными повторами, или CRISPR/Cas9). Кроме того, для целевой интеграции также может использоваться система DICE (обмен кассетами с помощью двойной интегразы), использующая интегразы *phiC31* и *Bxb1*. Некоторые иллюстративные подходы подробно раскрыты ниже.

Система редактирование генов с помощью CRISPR-Cas9

Система CRISPR-Cas9 представляет собой встречающийся в природе защитный механизм у прокариот, который был переориентирован в управляемую РНК платформу для нацеливания на ДНК, используемую для редактирования гена. Она основана на ДНК-нуклеазе Cas9 и двух некодирующих РНК, *crisprRNA* (*crRNA*) и транс-активирующей РНК (*tracrRNA*), для нацеливания на расщепление ДНК. CRISPR является сокращением от кластеризованных регулярно расположенных коротких палиндромных повторов, семейства последовательностей ДНК, обнаруженных в геномах бактерий и архей, которые содержат фрагменты ДНК (спейсерную ДНК), сходные с чужеродной ДНК, ранее подвергавшейся воздействию клетки, например, вирусами, которые инфицировали или атаковали прокариоты. Эти фрагменты ДНК используются прокариотами для обнаружения и уничтожения аналогичной чужеродной ДНК при повторном введении, например, из аналогичных вирусов во время последующих атак. Транскрипция локуса CRISPR приводит к образованию молекулы РНК, содержащей спейсерную последовательность, которая связывается с белками Cas (ассоциированные с CRISPR), способными распознавать и разрезать чужеродную экзогенную ДНК, и нацеливается на них. Были описаны многочисленные типы и классы систем CRISPR/Cas (см., например, Koonin et al., (2017) *Curr Opin Microbiol* 37:67-78).

CrRNA управляет распознаванием последовательности и специфичностью комплекса CRISPR-Cas9 посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, как правило, с 20-нуклеотидной (нукл.) последовательностью в целевой ДНК. Изменение последовательности 20 нуклеотидов на 5'-конце в crRNA позволяет нацеливать комплекс CRISPR-Cas9 на конкретные локусы. Комплекс CRISPR-Cas9 связывает только последовательности ДНК, которые содержат последовательность, соответствующую первым 20 нуклеотидам crRNA, если за целевой последовательностью следует конкретный короткий мотив ДНК (с последовательностью NGG), называемый мотивом, примыкающим к протоспейсеру (PAM).

ТгасrRNA гибридизируется с 3'-концом crRNA с образованием структуры РНК-дуплекса, которая связывается эндонуклеазой Cas9 с образованием каталитически активного комплекса CRISPR-Cas9, который затем может расщеплять целевую ДНК.

Как только комплекс CRISPR-Cas9 связывается с ДНК в целевом сайте, каждый из двух независимых нуклеазных доменов в ферменте Cas9 расщепляет одну из нитей ДНК выше сайта PAM, оставляя двухнитевый разрыв (DSB), при этом обе нити ДНК заканчиваются парой оснований (тупым концом).

После связывания комплекса CRISPR-Cas9 с ДНК в определенном целевом сайте и образования сайт-специфического DSB следующим ключевым шагом является репарация DSB. Клетки используют два основных пути репарации ДНК для репарации DSB: негомологичное соединение концов (NHEJ) и направляемая гомологией репарация (HDR).

NHEJ представляет собой надежный механизм репарации, который проявляет высокую активность в большинстве типов клеток, включая неделящиеся клетки. NHEJ подвержен ошибкам и часто может приводить к удалению или добавлению от одного до нескольких сотен нуклеотидов в сайте DSB, хотя такие модификации обычно составляют < 20 нуклеотидов. Полученные в результате вставки и делеции (инсерционно-делеционные мутации) могут нарушать кодирующие или некодирующие области генов. В качестве альтернативы, HDR использует длинный отрезок гомологичной донорной ДНК, представленной эндогенно или экзогенно, для репарации DSB с высокой точностью. HDR активна только в делящихся клетках и происходит с относительно низкой частотой в большинстве типов клеток. Во многих вариантах осуществления настоящего изобретения NHEJ используется в качестве операнта репарации.

Эндонуклеаза для применения при использовании CRISPR

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9) используют в способе CRISPR для получения генетически сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе. Фермент Cas9 может представлять собой фермент из *Streptococcus pyogenes*, хотя также можно использовать другие гомологи Cas9. Следует учитывать, что могут быть использованы Cas9 дикого типа или могут быть использованы модифицированные версии Cas9 (например, развитые версии Cas9, или ортологи, или варианты Cas9), представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть замещена другой РНК-

направляемой эндонуклеазой, такой как Cpf1 (из системы CRISPR/Cas II класса).

В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas содержит компоненты, полученные из системы типа I, типа II или типа III. Обновленные схемы классификации локусов CRISPR/Cas определяют системы CRISPR/Cas 1 класса и 2 класса, имеющие типы от I до V или VI (Makarova et al., (2015) *Nat Rev Microbiol*, 13(11):722-36; Shmakov et al., (2015) *Mol Cell*, 60:385-397). Системы CRISPR/Cas 2 класса имеют единичные белковые эффекторы. Белки Cas типов II, V и VI представляют собой однобелковые РНК-направляемые эндонуклеазы, называемые в данном документе "нуклеазами Cas 2 класса". К нуклеазам Cas 2 класса относятся, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 и C2c3. Нуклеаза Cpf1 (Zetsche et al., (2015) *Cell* 163: 1-13) гомологична Cas9 и содержит RuvC-подобный нуклеазный домен.

В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа II (например, белок Cas9 из системы CRISPR/Cas9). В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas 2 класса (однобелковая нуклеаза Cas, такая как белок Cas9 или белок Cpf1). Семейство белков Cas9 и Cpf1 представляет собой ферменты с ДНК-эндонуклеазной активностью, и они могут быть направлены на расщепление необходимой целевой нуклеиновой кислоты путем получения соответствующей направляющей РНК, как описано дополнительно в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может содержать более чем один нуклеазный домен. Например, нуклеаза Cas9 может содержать по меньшей мере один RuvC-подобный нуклеазный домен (например, Cpf1) и по меньшей мере один HNH-подобный нуклеазный домен (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 вводит DSB в целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 модифицирована для содержания только одного функционального нуклеазного домена. Например, нуклеаза Cas9 модифицирована так, что один из нуклеазных доменов является мутантным или полностью, или частично удален со снижением ее активности расщепления нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 модифицирована с отсутствием функционального RuvC-подобного нуклеазного домена. В других вариантах осуществления нуклеаза Cas9 модифицирована с отсутствием функционального HNH-подобного нуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления, в которых функционален только один из нуклеазных доменов, нуклеаза Cas9 представляет собой никазу, способную вводить односторонний разрыв ("ник") в целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислота в нуклеазном домене нуклеазы Cas9 замещается для снижения или изменения активности нуклеазы. В некоторых вариантах осуществления никаза нуклеазы Cas содержит аминокислотную замену в RuvC-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе нуклеазы Cas9 *S. pyogenes*). В некоторых вариантах осуществления никаза содержит аминокислотную замену в HNH-подобном

нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе нуклеазы Cas9 *S. pyogenes*).

В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas является компонентом комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. Например, нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas3. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа IV. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа V. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas происходит из системы CRISPR/Cas типа VI.

Направляющие РНК (gRNA)

Технология CRISPR предусматривает применение нацеливающейся на геном нуклеиновой кислоты, которая может направлять эндонуклеазу к конкретной целевой последовательности в пределах гена-мишени для обеспечения редактирования гена в конкретной целевой последовательности. Нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, может представлять собой РНК. РНК, нацеливающаяся на геном, в данном документе называется "направляющей РНК" или "gRNA". Направляющая РНК содержит по меньшей мере спейсерную последовательность, которая гибридизуется с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты в пределах гена-мишени для редактирования и с последовательностью повтора CRISPR.

В системах типа II gRNA также содержит вторую РНК, называемую последовательностью tracrRNA. В gRNA типа II последовательность повтора CRISPR и последовательность tracrRNA гибридизуются друг с другом с образованием дуплекса. В gRNA типа V crRNA образует дуплекс. В обеих системах дуплекс связывает сайт-направленный полипептид таким образом, что направляющая РНК и сайт-направленный полипептид образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, обеспечивает специфичность комплекса к мишени благодаря его ассоциации с сайт-направленным полипептидом. Таким образом, нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, направляет активность сайт-направленного полипептида.

Как понятно специалисту в данной области техники, каждая направляющая РНК сконструирована таким образом, что она содержит спейсерную последовательность, которая комплементарна ее геномной целевой последовательности. См. Jinek et al., *Science*, 337, 816-821 (2012) и Deltcheva et al., *Nature*, 471, 602-607 (2011).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном (например, gRNA), представляет собой направляющую РНК, состоящую из двух молекул. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном (например, gRNA), представляет собой направляющую РНК, состоящую из одной молекулы.

Направляющая РНК, состоящая из двух молекул, содержит две нити молекул РНК. Первая нить содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность и минимальную последовательность повтора CRISPR. Вторая нить содержит минимальную последовательность tracrRNA (комплементарную минимальной последовательности повтора CRISPR), 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA.

Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (называемая "sgRNA"), в системе типа II содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность, минимальную последовательность повтора CRISPR, линкер направляющей молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, минимальную последовательность tracrRNA, 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, может содержать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительные функциональные свойства (например, стабильность). Линкер направляющей нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, связывает минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность tracrRNA с образованием шпильчатой структуры. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, содержит одну или несколько шпилек. Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы, в системе типа V содержит в направлении 5'-3' минимальную последовательность повтора CRISPR и спейсерную последовательность.

Спейсерная последовательность в gRNA представляет собой последовательность (например, последовательность из 20 нуклеотидов), которая определяет целевую последовательность (например, последовательности ДНК-мишени, такие как геномная целевая последовательность) гена-мишени, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления размер спейсерной последовательности находится в диапазоне от 15 до 30 нуклеотидов. Например, спейсерная последовательность может содержать 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит 20 нуклеотидов.

"Целевая последовательность" находится в гене-мишени, который примыкает к последовательности РАМ и представляет собой последовательность, подлежащую модификации с помощью РНК-направляемой нуклеазы (например, Cas9). "Целевая последовательность" находится на так называемой РАМ-нити в "целевой нуклеиновой кислоте", которая представляет собой двухнитевую молекулу, содержащую РАМ-нить и комплементарную нить, отличную от РАМ. Специалист в данной области техники поймет, что спейсерная последовательность gRNA гибридизуется с комплементарной последовательностью, расположенной в нити, отличной от РАМ, целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Таким образом, спейсерная последовательность gRNA представляет собой РНК-эквивалент целевой последовательности. Например, если

целевая последовательность представляет собой 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 7), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 8). Спейсер gRNA взаимодействует с целевой нуклеиновой кислотой, представляющей интерес, специфичным в отношении последовательности образом посредством гибридизации (т. е. спаривания оснований). Таким образом, нуклеотидная последовательность спейсера варьируется в зависимости от целевой последовательности целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес.

В системе CRISPR/Cas, описанной в данном документе, спейсерная последовательность предназначена для гибридизации с областью целевой нуклеиновой кислоты, которая расположена в 5'-направлении от PAM, распознаваемого ферментом Cas9, используемым в системе. Спейсер может полностью соответствовать целевой последовательности или может иметь несоответствия. Для каждого фермента Cas9 имеется конкретная последовательность PAM, которую он распознает в целевой ДНК. Например, *S. pyogenes* распознает в целевой нуклеиновой кислоте PAM, который содержит последовательность 5'-NRG-3', где R представляет собой А либо G, где N представляет собой любой нуклеотид, и при этом N находится непосредственно рядом с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацеливается спейсерная последовательность, в 3'-направлении от нее.

В некоторых вариантах осуществления длина последовательности целевой нуклеиновой кислоты составляет 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой нуклеиновой кислоты составляет менее 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой нуклеиновой кислоты составляет более 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой нуклеиновой кислоты составляет не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20 оснований непосредственно рядом с первым нуклеотидом PAM в 5'-направлении от него. Например, в последовательности, содержащей 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3', целевая нуклеиновая кислота может представлять собой последовательность, которая соответствует множеству N, где N может представлять собой любой нуклеотид, а подчеркнутая последовательность NRG представляет собой PAM *S. pyogenes*.

Направляющая РНК, раскрытая в данном документе, может нацеливаться на любую последовательность, представляющую интерес, посредством спейсерной последовательности в crRNA. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между спейсерной последовательностью направляющей РНК и целевой последовательностью в гене-мишени может составлять приблизительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность направляющей РНК и целевая

последовательность в гене-мишени являются на 100% комплементарными. В других вариантах осуществления спейсерная последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в гене-мишени могут содержать до 10 ошибочно спаренных оснований, например, до 9, до 8, до 7, до 6, до 5, до 4, до 3, до 2 или до 1 ошибочно спаренного основания.

Неограничивающие примеры gRNA, которые можно применять, как предусмотрено в данном документе, представлены в WO 2019097305, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки для целей и заявленного объекта, упомянутых в данном документе. Для любой из последовательностей gRNA, предусмотренных в данном документе, подразумевается, что последовательности, для которых явно не указано, что они содержат модификации, охватывают как немодифицированные последовательности, так и последовательности, содержащие любые подходящие модификации.

Длина спейсерной последовательности в любой из gRNA, раскрытых в данном документе, может зависеть от системы CRISPR/Cas9 и компонентов, применяемых для редактирования любого из генов-мишеней, также раскрытых в данном документе. Например, разные белки Cas9 из разных видов бактерий характеризуются варьирующими значениями длины оптимальной спейсерной последовательности. Соответственно, длина спейсерной последовательности может составлять 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или более чем 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности может составлять 18-24 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления длина нацеливающейся последовательности может составлять 19-21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности может составлять 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления gRNA может представлять собой sgRNA, которая может содержать спейсерную последовательность из 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA может содержать спейсерную последовательность из менее 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA может содержать спейсерную последовательность из более чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность варьирующей длины из 17-30 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. Примеры представлены в **таблице 2** ниже. В этих иллюстративных последовательностях фрагмент, состоящий из "n", относится к спейсерной последовательности на 5'-конце.

Таблица 2. Иллюстративные формулы sgRNA

SEQ ID NO:	Последовательность sgRNA
9	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaggcuaguccg

SEQ ID NO:	Последовательность sgRNA
	uuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuuu
10	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc
11	n ₍₁₇₋₃₀₎ guuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaggcuaguccguuaucaacuugaaa aaguggcaccgagucggugcu ₍₁₋₈₎

В некоторых вариантах осуществления sgRNA не содержит урацил на 3'-конце последовательности sgRNA. В других вариантах осуществления sgRNA может содержать один или несколько остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA. Например, sgRNA может содержать 1-8 остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA.

Любая из gRNA, раскрытых в данном документе, включая любую из sgRNA, может быть немодифицированной. В качестве альтернативы, она может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов и/или модифицированных каркасов. Например, модифицированная gRNA, такая как sgRNA, может содержать один или несколько нуклеотидов с 2'-О-метилфосфоротиоатными связями, которые могут располагаться на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах.

В определенных вариантах осуществления более чем одна направляющая РНК может быть использована с нуклеазной системой CRISPR/Cas. Каждая направляющая РНК может содержать отличающуюся нацеливающую последовательность, так что система CRISPR/Cas расщепляет более чем одну целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько направляющих РНК могут обладать одинаковыми или различающимися свойствами, такими как активность или стабильность в комплексе Cas9 RNP. При использовании более чем одной направляющей РНК направляющая РНК может быть кодирована на одном и том же или на разных векторах. Промоторы, используемые для управления экспрессией более чем одной направляющей РНК, являются одинаковыми или разными.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, раскрытые в данном документе, нацеливаются на ген *TET2*, например, нацеливаются на сайт в пределах экзона 1, экзона 2, экзона 3, экзона 4, экзона 5 или экзона 6 гена *TET2*. Такая gRNA может содержать спейсерную последовательность, комплементарную (полностью или частично) целевым последовательностям в экзоне 3 или экзоне 5 гена *TET2*, или ее фрагмент. Иллюстративные целевые последовательности *TET2* и иллюстративные последовательности gRNA представлены в **таблице 3** ниже.

Таблица 3. Иллюстративные последовательности gRNA/целевые последовательности для TET2

Последовательности gRNA		
Название	Немодифицированная	Модифицированная

	последовательность	последовательность
TET2-экзон 4_BG4 (также известная как TET2-4)	CAUUAGGACCUGCUCCU AGAGuuuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO:12)	C*A*U*UAGGACCUGCUC CUAGAGuuuuuagagcuagaaau agcaaguuaaaaaaaggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 13)
TET2-экзон 4_BG4-спейсер	CAUUAGGACCUGCUCCU AGA (SEQ ID NO: 14)	C*A*U*UAGGACCUGCUC CUAGA (SEQ ID NO: 15)
TET2-экзон 5_T1 (также известная как TET2-m5)	GGGAUGUCCUAUUGCU AAGUguuuuagagcuagaaauag caaguuaaaaaaaggcuaguccguu aucaacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcUUUU (SEQ ID NO: 16)	G*G*G*AUGUCCUAUUG CUAAGUguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 17)
TET2-экзон 5_T1-спейсер	GGGAUGUCCUAUUGCU AAGU (SEQ ID NO: 18)	G*G*G*AUGUCCUAUUG CUAAGU (SEQ ID NO: 19)
TET2-экзон 5_T2	AGGGAUGUCCUAUUGC UAAGguuuuagagcuagaaauag caaguuaaaaaaaggcuaguccguu aucaacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcUUUU (SEQ ID NO: 20)	A*G*G*GAUGUCCUAUU GCUAAGguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 21)
TET2-экзон 5_T2-спейсер	AGGGAUGUCCUAUUGC UAAG (SEQ ID NO: 22)	A*G*G*GAUGUCCUAUU GCUAAG (SEQ ID NO: 23)
TET2-экзон 6_BG5 (также известная как TET2-5)	ACGGCACGCUCACCAAU CGCGuuuuugagcuagaaauagcaa guuaaaaaaaggcuaguccguuauc aacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcUUUU (SEQ ID NO: 24)	A*C*G*GCACGCUCACCA AUCGCguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucuacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 25)
TET2-экзон 6_BG5-спейсер	ACGGCACGCUCACCAAU CGC (SEQ ID NO: 26)	A*C*G*GCACGCUCACCA AUCGC (SEQ ID NO: 27)

TET2-экзон 3_T1-спейсер (также известная как TET2-1)	GAUUCCGCUUGGUGAA AACG (SEQ ID NO: 112)	G*A*U*UCCGCUUGGUG AAAACG (SEQ ID NO: 113)
TET2-экзон 3_T1	GAUUCCGCUUGGUGAA AACGguuuuagagcuagaaauag caaguuaaaaaaaggcuaguccguu aucaacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcUUUU (SEQ ID NO: 114)	G*A*U*UCCGCUUGGUG AAAACGguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucuacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 115)
TET2-экзон 3_T2-спейсер	CAGGACUCACACGACUA UUC (SEQ ID NO: 116)	C*A*G*GACUCACACGAC UAUUC (SEQ ID NO: 117)
TET2-экзон 3_T2	CAGGACUCACACGACUA UUCguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 118)	C*A*G*GACUCACACGAC UAUUCguuuuagagcuagaaau agcaaguuaaaaaaaggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 119)
TET2-экзон 3_T3-спейсер	UUCCGCUUGGUGAAAAC GAG (SEQ ID NO: 120)	U*U*C*CGCUUGGUGAA AACGAG (SEQ ID NO: 121)
TET2-экзон 3_T3	UUCCGCUUGGUGAAAAC GAGguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 122)	U*U*C*CGCUUGGUGAA AACGAGguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucuacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 123)
Целевые последовательности		
Название	Целевая последовательность (PAM)	
TET2-экзон 4_BG4 (также известная как TET2-4)	CATTAGGACCTGCTCCTAGA (TGG) (SEQ ID NO: 28) CATTAGGACCTGCTCCTAGA (SEQ ID NO: 124)	
TET2-экзон 5_T1	GGGATGTCCTATTGCTAAGT (GGG) (SEQ ID NO: 29) GGGATGTCCTATTGCTAAGT (SEQ ID NO: 125)	
TET2-экзон 5_T2	AGGGATGTCCTATTGCTAAG (TGG) (SEQ ID NO: 30)	

	AGGGATGTCCTATTGCTAAG (SEQ ID NO: 126)
TET2-экзон 6_BG5	ACGGCACGCTCACCAATCGC (CGG) (SEQ ID NO: 31) ACGGCACGCTCACCAATCGC (SEQ ID NO: 127)
TET2-экзон 3_T1	GATTCCGCTTGGTGAAAACG (AGG) (SEQ ID NO: 128) GATTCCGCTTGGTGAAAACG (SEQ ID NO: 129)
TET2-экзон 3_T2	CAGGACTCACACGACTATTC (TGG) (SEQ ID NO: 130) CAGGACTCACACGACTATTC (SEQ ID NO: 131)
TET2-экзон 3_T3	TTCCGCTTGGTGAAAACGAG (GGG) (SEQ ID NO: 132) TTCCGCTTGGTGAAAACGAG (SEQ ID NO: 133)

*: остаток 2'-О-метилфосфориоата

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающаяся на сайт в экзоне 3 *TET2* (например, те, которые перечислены в **таблице 3** выше) может быть использована для редактирования гена *TET2*. Например, может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт GATTCCGCTTGGTGAAAACG (SEQ ID NO: 129), например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 112 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 113 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 114 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 115 (модифицированная). Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 129, могут содержать модифицированный ген *TET2*, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в **таблице 15** ниже.

В другом конкретном примере может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт CAGGACTCACACGACTATTC (SEQ ID NO: 131), например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 116 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 117 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 118 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 119 (модифицированная). Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 131, могут содержать модифицированный ген *TET2*, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в **таблице 16** ниже.

В другом конкретном примере может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт TTCCGCTTGGTGAAAACGAG (SEQ ID NO: 133), например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 120 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 121 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 122 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 123 (модифицированная). Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 133, могут содержать модифицированный ген *TET2*, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в

таблице 17 ниже.

В других вариантах осуществления gRNA, специфичная в отношении гена *TET2*, может нацеливаться на сайт в пределах экзона 5. Например, может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт GGGATGTCCTATTGCTAAGT (SEQ ID NO: 125) в экзоне 5, например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 18 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 19 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 16 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 17 (модифицированная). Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 125, могут содержать модифицированный ген *TET2*, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в **таблице 19** ниже. В некоторых случаях генетическое редактирование гена *TET2* с применением такой gRNA может приводить к экспрессии усеченной версии белка *TET2*, который может характеризоваться молекулярным весом, составляющим приблизительно 170 кДа.

В другом примере может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт AGGGATGTCCTATTGCTAAG (SEQ ID NO: 126) в экзоне 5, например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 22 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 23 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 20 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 21 (модифицированная). Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 126, могут содержать модифицированный ген *TET2*, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в **таблице 20** ниже.

В других вариантах осуществления gRNA, специфичная в отношении гена *TET2*, может нацеливаться на сайт в пределах экзона 4. Например, может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт CATTAGGACCTGCTCCTAGA (SEQ ID NO: 124) в экзоне 4, например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 14 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 15 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 12 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 13 (модифицированная). Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 124, могут содержать модифицированный ген *TET2*, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в **таблице 21** ниже.

В других вариантах осуществления gRNA, специфичная в отношении гена *TET2*, может нацеливаться на сайт в пределах экзона 6. Например, может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт ACGGCACGCTACCAATCGC (SEQ ID NO: 127) в экзоне 6, например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 26 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 27 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 24 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 25 (модифицированная). Т-клетки,

отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 127, могут содержать модифицированный ген *TET2*, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в **таблице 18** ниже.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, раскрытые в данном документе, нацеливаются на ген CD70, например, нацеливаются на сайт в пределах экзона 1 или экзона 3 гена CD70. Такая gRNA может содержать спейсерную последовательность, комплементарную (полностью или частично) целевым последовательностям в экзоне 1 или экзоне 3 гена CD70, или ее фрагмент. Иллюстративные целевые последовательности в гене CD70 и иллюстративные gRNA, специфичные в отношении гена CD70, представлены в **таблице 4** ниже.

Таблица 4. Иллюстративные последовательности gRNA/целевые последовательности для CD70

Последовательности gRNA		
Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
sgRNA CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACC AAUguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 32)	U*C*A*CCAAGCCCGCGA CCAAUguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaauaaggcuaguccgu uaucuacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 33)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACC AAU (SEQ ID NO: 34)	U*C*A*CCAAGCCCGCGA CCAAU (SEQ ID NO: 35)
sgRNA CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGAC CAAguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 36)	A*U*C*ACCAAGCCCGCG ACCAAguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaauaaggcuaguccgu uaucuacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 37)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGAC CAA (SEQ ID NO: 38)	A*U*C*ACCAAGCCCGCG ACCAA (SEQ ID NO: 39)
sgRNA CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCC UAUguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU	C*G*G*UGCGGCGCAGGC CCUAUguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaauaaggcuaguccgu uaucuacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID

	(SEQ ID NO: 40)	NO: 41)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGGCGCAGGCCC UAU (SEQ ID NO: 42)	C*G*G*UGCGGGCGCAGGC CCUAU (SEQ ID NO: 43)
sgRNA CD70 (E1_T7); также называется: T7	GCUUUGGUCCCAUUGGU CGCguuuuagagcuagaaaagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 44)	G*C*U*UUGGUCCCAUU GGUCGCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 45)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGU CGC (SEQ ID NO: 46)	G*C*U*UUGGUCCCAUU GGUCGC (SEQ ID NO: 47)
sgRNA CD70 (E1_T8); также называется: T8	GCCCCGACGACGACCCC AUAguuuuagagcuagaaaagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 48)	G*C*C*CGCAGGACGCAC CCAUAguuuuagagcuagaaa gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 49)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCCGACGACGACCCC AUA (SEQ ID NO: 50)	G*C*C*CGCAGGACGCAC CCAUA (SEQ ID NO: 51)
sgRNA CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCG CACguuuuagagcuagaaaagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 52)	G*U*G*CAUCCAGCGCUU CGCACguuuuagagcuagaaa gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 53)
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCG CA C (SEQ ID NO: 54)	G*U*G*CAUCCAGCGCUU CGCAC (SEQ ID NO: 55)
sgRNA CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCG UGAguuuuagagcuagaaaagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 56)	C*A*G*CUACGUAUCCA CGUGAguuuuagagcuagaaa agcaaguuaaaaaaaggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 57)
Спейсер sgRNA CD70	CAGCUACGUAUCCAUCG	C*A*G*CUACGUAUCCA

(E3_T1)	UGA (SEQ ID NO: 58)	CGUGA (SEQ ID NO: 59)
Целевые последовательности		
Название	Целевая последовательность (PAM)	
Целевая последовательность CD70 с (PAM) и без него (E1_T1)	TCACCAAGCCCGCGACCAAT (GGG) (SEQ ID NO: 60) TCACCAAGCCCGCGACCAAT (SEQ ID NO:134)	
Целевая последовательность CD70 с (PAM) и без него (E1_T3)	ATCACCAAGCCCGCGACCAA (TGG) (SEQ ID NO: 61) ATCACCAAGCCCGCGACCAA (SEQ ID NO:135)	
Целевая последовательность CD70 с (PAM) и без него (E1_T4)	CGGTGCGGCGCAGGCCCTAT (GGG) (SEQ ID NO: 62) CGGTGCGGCGCAGGCCCTAT (SEQ ID NO:136)	
Целевая последовательность CD70 с (PAM) и без него (E1_T7)	GCTTTGGTCCCATTGGTCGC (GGG) (SEQ ID NO: 63) GCTTTGGTCCCATTGGTCGC (SEQ ID NO:137)	
Целевая последовательность CD70 с (PAM) и без него (E1_T8)	GCCCCGACAGGACGCACCCATA (GGG) (SEQ ID NO: 64) GCCCCGACAGGACGCACCCATA (SEQ ID NO: 138)	
Целевая последовательность CD70 с (PAM) и без него (E1_T10)	GTGCATCCAGCGCTTCGCAC (AGG) (SEQ ID NO: 65) GTGCATCCAGCGCTTCGCAC (SEQ ID NO: 139)	
Целевая последовательность CD70 с (PAM) и без него (E3_T1)	CAGCTACGTATCCATCGTGA (TGG) (SEQ ID NO: 66) CAGCTACGTATCCATCGTGA (SEQ ID NO: 140)	

*: остаток 2'-О-метилфосфориоата

В некоторых вариантах осуществления gRNA, раскрытые в данном документе, нацеливаются на ген FAS, например, нацеливаются на сайт в пределах экзона 1, экзона 2 или экзона 3 гена FAS. Такая gRNA может содержать спейсерную последовательность, комплементарную (полностью или частично) целевым последовательностям в экзоне 1, экзоне 2 или экзоне 3 гена FAS, или ее фрагмент. Иллюстративные целевые последовательности в гене FAS и иллюстративные gRNA, специфичные в отношении гена FAS, представлены в **таблице 5** ниже.

Таблица 5. Иллюстративные последовательности gRNA/целевые последовательности для FAS

Последовательности gRNA

Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
sgRNA FAS (FAS_Ex2_T1)	GUGACUGACAUAACUC CAAGuuuuagagcuagaaauagc aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 67)	G*U*G*ACUGACAUCAA CUCCAAguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 68)
Спейсер sgRNA FAS (FAS_Ex2_T1)	GUGACUGACAUAACUC CAA (SEQ ID NO: 69)	G*U*G*ACUGACAUCAA CUCCAA (SEQ ID NO: 70)
sgRNA FAS (FAS_Ex2_T2)	CACUUGGGCAUUAACAC UUUguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 71)	C*A*C*UUGGGCAUUA CACUUUguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 72)
Спейсер sgRNA FAS (FAS_Ex2_T2)	CACUUGGGCAUUAACAC UUU (SEQ ID NO: 73)	C*A*C*UUGGGCAUUA CACUUU (SEQ ID NO: 74)
sgRNA FAS (FAS_Ex2_T3)	UUGGAAGGCCUGCAUCA UGAguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 75)	U*U*G*GAAGGCCUGCA UCAUGAguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 76)
Спейсер sgRNA FAS (FAS_Ex2_T3)	UUGGAAGGCCUGCAUCA UGA (SEQ ID NO: 77)	U*U*G*GAAGGCCUGCA UCAUGA (SEQ ID NO: 78)
sgRNA FAS (FAS_Ex3_T1)	CUAGGGACUGCACAGUC AAUguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 79)	C*U*A*GGGACUGCACA GUCAAUguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 80)
Спейсер sgRNA FAS (FAS_Ex3_T1)	CUAGGGACUGCACAGUC AAU (SEQ ID NO: 81)	C*U*A*GGGACUGCACA GUCAAU (SEQ ID NO: 82)

sgRNA FAS (FAS_Ex3_T2)	ACUGCGUGCCCUGCCAA GAAGuuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 83)	A*C*U*GCGUGCCCUGCC AAGAAguuuuagagcuagaaau agcaaguuaaaaaaaggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 84)
Спейсер sgRNA FAS (FAS_Ex3_T2)	ACUGCGUGCCCUGCCAA GAA (SEQ ID NO: 85)	A*C*U*GCGUGCCCUGCC AAGAA (SEQ ID NO: 86)
Целевые последовательности		
Название	Целевая последовательность (PAM)	
Целевая последовательность FAS_Ex2_T1 с (PAM) и без него	GTGACTGACATCAACTCCAA (GGG) (SEQ ID NO: 87) GTGACTGACATCAACTCCAA (SEQ ID NO: 141)	
Целевая последовательность FAS_Ex2_T2 с (PAM) и без него	CACTTGGGCATTAACACTTT (TGG) (SEQ ID NO: 88) CACTTGGGCATTAACACTTT (SEQ ID NO: 142)	
Целевая последовательность FAS_Ex2_T3 с (PAM) и без него	TTGGAAGGCCTGCATCATGA (TGG) (SEQ ID NO: 89) TTGGAAGGCCTGCATCATGA (SEQ ID NO: 143)	
Целевая последовательность FAS_Ex3_T1 с (PAM) и без него	CTAGGGACTGCACAGTCAAT (GGG) (SEQ ID NO: 90) CTAGGGACTGCACAGTCAAT (SEQ ID NO: 144)	
Целевая последовательность FAS_Ex3_T2 с (PAM) и без него	ACTGCGTGCCCTGCCAAGAA (GGG) (SEQ ID NO: 91) ACTGCGTGCCCTGCCAAGAA (SEQ ID NO: 145)	

*: остаток 2'-О-метилфосфоротиоата

В других вариантах осуществления gRNA, специфичная в отношении гена FAS, может нацеливаться на сайт в пределах экзона 2. Например, может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт под SEQ ID NO: 142 в экзоне 2 гена FAS, например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 73 (немодифицированная) или SEQ ID NO:

74 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 71 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 72 (модифицированная) (например, gRNA FAS-экзон_2-T2). Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 142, могут содержать модифицированный ген FAS, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в **таблице 26** ниже.

В других вариантах осуществления gRNA, специфичная в отношении гена FAS, может нацеливаться на сайт в пределах экзона 3. Например, может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт под SEQ ID NO: 144 в экзоне 3 гена FAS, например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 81 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 82 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 79 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 80 (модифицированная) (например, gRNA FAS-экзон_3-T1). Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 144, могут содержать модифицированный ген FAS, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в **таблице 27** ниже.

В других вариантах осуществления gRNA, специфичная в отношении гена FAS, может нацеливаться на сайт в пределах экзона 3. Например, может быть использована gRNA, нацеливающаяся на сайт под SEQ ID NO: 145 в экзоне 3 гена FAS, например, gRNA, содержащая спейсер под SEQ ID NO: 85 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 86 (модифицированная). Такая gRNA может содержать (например, состоять из) нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 83 (немодифицированная) или SEQ ID NO: 84 (модифицированная) (например, gRNA FAS-экзон_3-T2). Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA, нацеливающейся на сайт под SEQ ID NO: 145, могут содержать модифицированный ген FAS, характеризующийся по меньшей мере одной из модификаций, перечисленных в **таблице 28** ниже.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, раскрытые в данном документе, нацеливаются на ген $\beta 2M$, например, нацеливаются на подходящий сайт в пределах гена $\beta 2M$. См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 г., соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена $\beta 2M$, расположенной на хромосоме 15 (координаты GRCh38: хромосома 15: 44,711,477-44,718,877; Ensembl: ENSG00000166710). В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область $\beta 2M$, и РНК-направляемая нуклеаза создают разрывы в геномной области $\beta 2M$, что приводит к инсерционно-делеционным мутациям в гене $\beta 2M$, нарушая экспрессию mRNA или белка.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, раскрытые в данном документе, нацеливаются на ген TRAC. См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 г., соответствующие раскрытия которой включены в данный

документ посредством ссылки для заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена TRAC, расположенной на хромосоме 14 (GRCh38: хромосома 14: 22,547,506-22,552,154; Ensembl; ENSG00000277734). В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область TRAC, и РНК-направляемая нуклеаза обуславливают разрывы в геномной области TRAC, что приводит к инсерционно-делеционным мутациям в гене TRAC, нарушая экспрессию mRNA или белка.

Иллюстративные спейсерные последовательности и gRNA, нацеливающиеся на ген $\beta 2M$ или ген TRAC, представлены в **таблице 6** ниже.

Таблица 6. Последовательности gRNA/целевые последовательности

Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
sgRNA TRAC	AGAGCAACAGUGCUGU GGCCguuuuagagcuagaaauag caaguuaaaaaaaggcuaguccguu aucaacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcUUUU (SEQ ID NO: 92)	A*G*A*GCAACAGUGC GUGGCCguuuuagagcuagaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucuacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 93)
Спейсер sgRNA TRAC	AGAGCAACAGUGCUGU GGCC (SEQ ID NO: 94)	A*G*A*GCAACAGUGC GUGGCC (SEQ ID NO: 95)
sgRNA $\beta 2M$	GCUACUCUCUCUUUCUG GCCguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 96)	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCCguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 97)
Спейсер sgRNA $\beta 2M$	GCUACUCUCUCUUUCUG GCC (SEQ ID NO: 98)	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCC (SEQ ID NO: 99)
Целевые последовательности		
Название	Целевая последовательность (PAM)	
Целевая последовательность TRAC с (PAM) и без него	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 100) AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (SEQ ID NO: 146)	
Целевая последовательность $\beta 2M$ с (PAM) и без него	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 101) GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (SEQ ID NO: 147)	

*: остаток 2'-О-метилфосфоротиоата

В качестве иллюстрации, направляющие РНК, используемые в системе CRISPR/Cas/Cpf1, или другие РНК меньшего размера можно легко синтезировать химическими способами, как проиллюстрировано ниже и описано в уровне техники. Несмотря на то, что возможности процедур химического синтеза постоянно расширяются, очистка таких РНК с помощью таких процедур, как высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC, при которой не используются гели, такие как в PAGE), как правило, становится более сложной, поскольку длина полинуклеотидов значительно увеличивается, выходя за пределы примерно сотни нуклеотидов. Один из подходов, используемых для образования РНК большей длины, заключается в получении двух или более молекул, которые лигируются друг с другом. Гораздо более длинные РНК, такие как кодирующие эндонуклеазу Cas9 или Cpf1, образуются более легко ферментативным путем. Различные типы модификаций РНК могут быть введены во время или после химического синтеза и/или ферментативного образования РНК, например, модификации, которые повышают стабильность, уменьшают вероятность или степень формирования врожденного иммунного ответа и/или усиливают другие признаки, как описано в уровне техники.

В некоторых примерах gRNA по настоящему изобретению можно получать посредством способов транскрипции *in vitro* (IVT), синтеза и/или химического синтеза или их комбинации. Используют способы ферментативного (IVT), твердофазного, жидкофазного, комбинированного синтеза, синтеза небольших участков и способы лигирования. В одном варианте осуществления gRNA получают с использованием способов ферментативного синтеза IVT. Способы получения полинуклеотидов посредством IVT известны из уровня техники и описаны в WO 2013/151666. Соответственно, настоящее изобретение также включает полинуклеотиды, например, ДНК, конструкции и векторы, используемые для *in vitro* транскрибирования gRNA, описываемой в данном документе.

Различные типы модификаций РНК могут быть введены во время или после химического синтеза и/или ферментативного образования РНК, например, модификации, которые повышают стабильность, уменьшают вероятность или степень формирования врожденного иммунного ответа и/или усиливают другие признаки, как описано в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления неприродные модифицированные нуклеиновые основания могут быть введены в любую из gRNA, раскрытых в данном документе, во время синтеза или после синтеза. В определенных вариантах осуществления модификации относятся к межнуклеозидным связям, пуриновым или пиримидиновым основаниям или сахару. В некоторых вариантах осуществления модификацию вводят на конце gRNA с помощью химического синтеза или с помощью фермента полимеразы. Примеры модифицированных нуклеиновых кислот и их синтез раскрыты в WO 2013/052523. Синтез модифицированных полинуклеотидов также описан в Verma and Eckstein, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 76, 99-134 (1998).

В некоторых вариантах осуществления способы ферментативного или химического лигирования можно использовать для конъюгирования полинуклеотидов или их областей с различными функциональными фрагментами, такими как нацеливающие средства или средства доставки, флуоресцентные метки, жидкости, наночастицы и т. д. Конъюгаты полинуклеотидов и модифицированных полинуклеотидов рассматриваются в Goodchild, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 1(3), 165-187 (1990).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеазная система CRISPR/Cas для использования в генетическом редактировании любого из генов-мишеней, раскрытых в данном документе, может включать по меньшей мере одну направляющую РНК. В некоторых примерах нуклеазная система CRISPR/Cas может содержать несколько gRNA, например 2, 3 или 4 gRNA. Такие несколько gRNA могут нацеливаться на различные сайты в одном и том же гене-мишени. В качестве альтернативы несколько gRNA могут нацеливаться на различные гены. В некоторых вариантах осуществления направляющая(-ие) РНК и белок Cas могут образовывать рибонуклеопротеин (RNP), например, комплекс CRISPR/Cas. Направляющая(-ие) РНК может(-гут) направлять белок Cas к целевой(-ым) последовательности(-ям) в одном или нескольких целевых генах, как те, которые раскрыты в данном документе, при этом белок Cas расщепляет ген-мишень в целевом сайте. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas представляет собой комплекс Cpf1/направляющая РНК. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR представляет собой комплекс CRISPR/Cas9 типа II. В некоторых вариантах осуществления белок Cas представляет собой белок Cas9. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas9 представляет собой комплекс Cas9/направляющая РНК.

В некоторых вариантах осуществления частота инсерционно-делеционных мутаций (частота редактирования) для конкретной нуклеазной системы CRISPR/Cas, содержащей одну или несколько специфичных gRNA, может быть определена с использованием анализа TIDE, который можно использоваться для идентификации высокоэффективных молекул РНК для редактирования гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления высокоэффективная gRNA обеспечивает частоту редактирования гена выше 80%. Например, gRNA считается высокоэффективной, если она обеспечивает частоту редактирования гена, составляющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%.

Доставка направляющих РНК и нуклеаз в Т-клетки

Нуклеазная система CRISPR/Cas, раскрытая в данном документе, содержащая одну или несколько gRNA и по меньшей мере одну РНК-направляемую нуклеазу, необязательно донорную матрицу, раскрытую ниже, может быть доставлена в клетку-мишень (например, Т-клетку) для генетического редактирования гена-мишени посредством традиционного способа. В некоторых вариантах осуществления компоненты нуклеазной системы CRISPR/Cas, раскрытой в данном документе, могут быть отдельно доставлены в клетку-мишень либо одновременно, либо последовательно. В других

вариантах осуществления компоненты нуклеазной системы CRISPR/Cas могут быть доставлены к мишени совместно, например, в виде комплекса. В некоторых случаях gRNA и РНК-направляемая нуклеаза могут быть предварительно объединены в комплекс с образованием рибонуклеопротеина (RNP), который может быть доставлен в клетку-мишень.

RNP применимы для редактирования гена по меньшей мере потому, что они минимизируют риск беспорядочных взаимодействий в богатой нуклеиновыми кислотами клеточной среде и защищают РНК от разрушения. Способы формирования RNP известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления RNP, содержащий РНК-направляемую нуклеазу (например, нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas9) и одну или несколько gRNA, нацеливающих на один или несколько генов, представляющих интерес, может быть доставлен в клетку (например, Т-клетку). В некоторых вариантах осуществления RNP может быть доставлен в Т-клетку путем электропорации.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза может быть доставлена в клетку в ДНК-векторе, который обеспечивает экспрессию РНК-направляемой нуклеазы в клетке. В других примерах РНК-направляемая нуклеаза может быть доставлена в клетку в РНК, которая кодирует РНК-направляемую нуклеазу и обеспечивает экспрессию нуклеазы в клетке. В качестве альтернативы или в дополнение gRNA, нацеливающаяся на ген, может быть доставлена в клетку в виде РНК или ДНК-вектора, которые обеспечивают экспрессию gRNA в клетке.

Доставка РНК-направляемой нуклеазы, gRNA и/или RNP может быть осуществлена путем непосредственной инъекции или клеточной трансфекции с использованием известных способов, например, электропорации или химической трансфекции. Могут быть использованы другие способы клеточной трансфекции.

Другие способы редактирования генов

Помимо способа CRISPR, раскрытого в данном документе, дополнительные способы редактирования гена, известные из уровня техники, также могут быть использованы для получения генетически сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе. Некоторые примеры включают подходы к редактированию генов, предусматривающие нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), рестрикционные эндонуклеазы, мегануклеазы, хоуминг-эндонуклеазы и т. п.

ZFN представляют собой целевые нуклеазы, включающие нуклеазу, слитую с ДНК-связывающим доменом "цинковый палец" (ZFBF), представляющим собой полипептидный домен, который связывает ДНК специфическим для последовательности образом через один или несколько "цинковых пальцев". "Цинковый палец" представляет собой домен из приблизительно 30 аминокислот в связывающем домене "цинковый палец", структура которого стабилизируется за счет координации иона цинка. Примеры "цинковых пальцев" включают без ограничения "цинковые пальцы" C2H2, "цинковые пальцы" C3H и "цинковые пальцы" C4. Сконструированный домен "цинковый палец"

представляет собой домен, не встречающийся в природе, конструкция/состав которого является главным образом результатом рациональных критериев, например, применения правил замещения и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих конструкциях ZFP и данных связывания. См., например, патенты США №№ 6140081, 6453242 и 6534261, см. также WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496. Выбранный домен "цинковый палец" представляет собой домен, не встречающийся в природе, получение которого в основном является результатом эмпирического процесса, такого как фаговый дисплей, интерактивная ловушка или гибридный отбор. ZFN более подробно описаны в патенте США № 7888121 и в патенте США № 7972854. Наиболее известным примером ZFN является результат слияния нуклеазы FokI с ДНК-связывающим доменом "цинковый палец".

TALEN представляет собой целевую нуклеазу, содержащую нуклеазу, слитую с эффекторным ДНК-связывающим доменом TAL. "Подобный активатору транскрипции эффекторный ДНК-связывающий домен", "эффекторный ДНК-связывающий домен TAL" или "ДНК-связывающий домен TALE" представляет собой полипептидный домен эффекторных белков TAL, который отвечает за связывание эффекторного белка TAL с ДНК. Эффекторные белки TAL секретируются растительными патогенами рода *Xanthomonas* во время инфицирования. Эти белки проникают в ядро растительной клетки, связывают специфические в отношении эффектора последовательности ДНК через свой ДНК-связывающий домен и активируют транскрипцию генов на этих последовательностях через их трансактивирующие домены. Специфичность эффекторного ДНК-связывающего домена TAL зависит от вариативного среди эффекторов количества несовершенных повторов 34 аминокислот, которые содержат полиморфизмы в выбранных положениях повтора, называемые вариативными последовательностями из двух остатков (RVD). Более подробно TALEN описаны в заявке на патент США № 2011/0145940. Наиболее известным примером TALEN в уровне техники является полипептид, образующийся в результате слияния нуклеазы FokI с эффекторным ДНК-связывающим доменом TAL.

Дополнительные примеры целевых нуклеаз, подходящих для применения, как предусмотрено в данном документе, включают без ограничения Bxb1, phiC31, R4, PhiBT1 и Wβ/SPBc/TP901-1, независимо от того, используются они по отдельности или в комбинации.

Любая из нуклеаз, раскрытых в данном документе, может быть доставлена с использованием векторной системы, включающей без ограничения плазмидные векторы, миникольцевые ДНК, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы, герпесвирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы и их комбинации.

Для введения нуклеиновых кислот, кодирующих нуклеазы и донорные матрицы, в клетки (например, Т-клетки) можно использовать традиционные способы переноса генов с

участием вирусов и без них. Невирусные векторные системы доставки включают ДНК-плазмиды, миникольцевые ДНК, депротеинизированную нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома или поллоксамер. Вирусные векторные системы доставки включают ДНК- и РНК-вирусы, которые после доставки в клетку имеют либо эписомальные, либо интегрированные геномы.

Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатион или конъюгаты липида и нуклеиновой кислоты, депротеинизированную ДНК, депротеинизированную РНК, кэпированную РНК, искусственные вирионы и усиленный средством захват ДНК. Сонопорация с использованием, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar) также может быть использована для доставки нуклеиновых кислот. Ниже приведены некоторые конкретные примеры.

II. Применение банков Т-клеток для получения терапевтических Т-клеток

Генетически сконструированные Т-клетки из банка Т-клеток, раскрытого в данном документе, можно применять для получения терапевтических Т-клеток, таких как Т-клетки с CAR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтическое средство, как например CAR, может быть введена в клетки из банка Т-клеток для получения терапевтических Т-клеток. В других вариантах осуществления Т-клетки из банка Т-клеток сконструированы с обеспечением экспрессии терапевтического средства, такого как CAR. Такие Т-клетки могут быть получены из банка Т-клеток и необязательно экспансированы *in vitro* с получением терапевтических Т-клеток для применения у субъектов, нуждающихся в лечении. Ожидается, что терапевтические Т-клетки, полученные из банка Т-клеток, будут характеризоваться более высокой продолжительностью жизни и являться более эффективными *in vivo*. Соответственно, более низкая доза таких терапевтических Т-клеток будет требоваться при терапии, что будет приводить к уменьшению побочных эффектов. Кроме того, большее количество Т-клеток с CAR можно получать из Т-клеток, выделенных из подходящего природного источника, такого как отдельный лейкопак, по сравнению с традиционными подходами с использованием Т-клеток (например, с геном *TET2* дикого типа, геном *FAS* дикого типа и/или геном *CD70* дикого типа).

Химерный антигенный рецептор (CAR)

Химерный антигенный рецептор (CAR) относится к искусственному рецептору иммунных клеток, который сконструирован для распознавания и связывания антигена, экспрессируемого нежелательными клетками, например, пораженными заболеванием клетками, такими как раковые клетки. Т-клетка, которая экспрессирует полипептид CAR, называется Т-клеткой с CAR. CAR обладают способностью перенаправлять специфичность и реактивность Т-клеток в направлении выбранной мишени без рестриктирования по МНС. Распознавание антигена без рестриктирования по МНС придает Т-клеткам с CAR способность распознавать антиген независимо от

процессирования антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли. Более того, при экспрессии на Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR).

Существуют различные поколения CAR, каждое из которых содержит различные компоненты. В CAR первого поколения соединены scFv, полученный из антитела, и внутриклеточный сигнальный домен CD3дзета (ζ или z) Т-клеточного рецептора посредством шарнирного и трансмембранного доменов. В CAR второго поколения включен дополнительный костимулирующий домен, например, CD28, 4-1BB (41BB) или ICOS, для обеспечения костимулирующего сигнала. CAR третьего поколения содержат два костимулирующих домена (например, комбинацию CD27, CD28, 4-1BB, ICOS или OX40), слитых с цепью CD3 ζ TCR. Maude et al., *Blood*. 2015; 125(26):4017-4023; Kakarla and Gottschalk, *Cancer J.* 2014; 20(2):151-155). Любое из различных поколений конструкций CAR входит в объем настоящего изобретения.

Как правило, CAR представляет собой слитый полипептид, содержащий внеклеточный домен, который распознает антиген-мишень (например, одноцепочечный фрагмент (scFv) антитела или фрагмент другого антитела), и внутриклеточный домен, содержащий сигнальный домен комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) (например, CD3 ζ), и, в большинстве случаев, костимулирующий домен. (Enblad et al., *Human Gene Therapy*. 2015; 26(8):498-505). Конструкция CAR может дополнительно содержать шарнирный и трансмембранный домен между внеклеточным доменом и внутриклеточным доменом, а также сигнальный пептид на N-конце для поверхностной экспрессии. Примеры сигнальных пептидов включают MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO: 102) и MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 103). Можно использовать другие сигнальные пептиды.

(i) Антигенсвязывающий внеклеточный домен

Антигенсвязывающий внеклеточный домен представляет собой область полипептида CAR, которая подвергается воздействию внеклеточной жидкости, когда CAR экспрессируется на клеточной поверхности. В некоторых случаях сигнальный пептид может располагаться на N-конце для облегчения экспрессии на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может представлять собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv, который может содержать переменную область тяжелой цепи антитела (V_H) и переменную область легкой цепи антитела (V_L) (в любой ориентации). В некоторых случаях фрагменты V_H и V_L могут быть связаны посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидрофильные остатки с фрагментами из глицина и серина для гибкости, а также фрагментами из глутамата и лизина для дополнительной растворимости. scFv-фрагмент сохраняет антигенсвязывающую специфичность исходного антитела, из которого получен scFv-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления scFv может содержать гуманизированные домены V_H и/или V_L . В других вариантах осуществления домены V_H и/или V_L scFv являются полностью человеческими.

Антигенсвязывающий внеклеточный домен может являться специфичным в отношении антигена-мишени, представляющего интерес, например, патологического антигена, такого как опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой "ассоциированный с опухолью антиген", относящийся к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая, как правило, экспрессируется на более высоком уровне в опухолевых клетках, чем в не являющихся опухолевыми клетках, в которых она может не экспрессироваться вообще или только на низких уровнях. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью структуры, которые распознаются иммунной системой хозяина, несущего опухоль, называются ассоциированными с опухолью антигенами. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с опухолью антиген представляет собой универсальный опухолевый антиген, если он широко экспрессируется в большинстве типов опухолей. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью антигены представляют собой дифференцировочные антигены, мутационные антигены, сверхэкспрессированные клеточные антигены или вирусные антигены. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой "опухолеспецифический антиген" или "TSA", относящийся к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая является уникальной для опухолевой клетки. Опухолеспецифические антигены экспрессируются исключительно в опухолевых клетках, например, в конкретном типе опухолевых клеток.

Иллюстративные опухолевые антигены включают без ограничения CD19, CD33, BCMA и CD70. Любые известные антитела, специфичные в отношении таких опухолевых антигенов, например, антитела, одобренные для продажи, и антитела, используемые в клинических испытаниях, могут быть использованы для получения конструкций CAR, раскрытых в данном документе.

(ii) Трансмембранный домен

Полипептид CAR, раскрытый в данном документе, может содержать трансмембранный домен, который может представлять собой гидрофобную альфа-спираль, которая пронизывает мембрану. Используемый в данном документе термин "трансмембранный домен" относится к любой белковой структуре, которая термодинамически стабильна в клеточной мембране, предпочтительно в мембране эукариотической клетки. Трансмембранный домен может обеспечивать стабильность CAR, содержащему его.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR, предусмотренный в данном документе, может представлять собой трансмембранный домен CD8. В других вариантах осуществления трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD28. В еще одних вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой химеру из трансмембранного домена CD8 и CD28. Могут применяться другие трансмембранные домены, представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления

трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8a, содержащий последовательность FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR (SEQ ID NO: 104) или IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO: 105). Могут применяться другие трансмембранные домены.

(iii) Шарнирный домен

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может быть расположен между внеклеточным доменом (содержащим антигенсвязывающий домен) и трансмембранным доменом CAR или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом CAR. Шарнирный домен может представлять собой любой олигопептид или полипептид, функции которого заключаются в связывании трансмембранного домена с внеклеточным доменом и/или цитоплазматическим доменом в полипептидной цепи. Шарнирный домен может функционировать для обеспечения гибкости CAR или его доменов или для предотвращения стерических затруднений CAR или его доменов.

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может содержать до 300 аминокислот (например, от 10 до 100 аминокислот или от 5 до 20 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления один или несколько шарнирных доменов могут быть включены в другие участки CAR. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может представлять собой шарнирный домен CD8. Могут применяться другие шарнирные домены.

(iv) Внутриклеточные сигнальные домены

Любая из конструкций CAR содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов (например, CD3 ζ и необязательно один или несколько костимулирующих доменов), которые представляют собой функциональный конец рецептора. После распознавания антигена рецепторы образуют кластер и сигнал передается в клетку.

CD3 ζ представляет собой цитоплазматический сигнальный домен Т-клеточного рецепторного комплекса. CD3 ζ содержит три (3) иммунорецепторных активирующих мотива на основе тирозина (ITAM), которые передают сигнал активации Т-клетке после того, как Т-клетка взаимодействует с когнатным антигеном. Во многих случаях CD3 ζ обеспечивает первичный сигнал активации Т-клеток, но не полностью компетентный сигнал активации, который требует костимулирующей передачи сигнала.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды CAR, раскрытые в данном документе, могут дополнительно содержать один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. Например, костимулирующие домены CD28 и/или 4-1BB можно использовать для передачи полного сигнала пролиферации/выживания вместе с первичной передачей сигнала, опосредованной CD3 ζ . В некоторых примерах CAR, раскрытый в данном документе, содержит костимулирующую молекулу CD28. В других примерах CAR, раскрытый в данном документе, содержит костимулирующую молекулу 4-

1BB. В некоторых вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 ζ и костимулирующий домен CD28. В других вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 ζ и костимулирующий домен 4-1BB. В еще других вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 ζ , костимулирующий домен CD28 и костимулирующий домен 4-1BB.

В таблице 7 представлены примеры сигнальных доменов, полученных из 4-1BB, CD28 и CD3-дзета, которые могут быть использованы в данном документе.

Таблица 7. Иллюстративные последовательности внутриклеточного сигнального домена

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAC AACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAA GGAGGATGTGAACTG	106
	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL	107
CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAA TATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATT ACCAACCCTATGCCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTAC AGGTCC	108
	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR S	109
CD3 ζ	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATA TCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAAT TTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAAC GCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCG AAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTC CAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAG GTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGA TGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGAT ACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAG A	110
	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	111

Неограничивающие примеры конструкций CAR представлены в WO 2019097305, и WO 2019215500, и WO 2020/095107, соответствующие раскрытия каждой из которых включены в данный документ посредством ссылки для целей и заявленного объекта, упомянутых в данном документе. Ниже приведены некоторые примеры.

CAR к CD19 (SEQ ID NO: 148):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQKQPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP
YTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP
DYGVSWIRQPPRKLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD
TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT
ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRS
KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CAR к BCMA (SEQ ID NO: 149):

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGNTLTNY
VIHWVRQAPGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSLRSED
TAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVS
PGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGT
DFTLTISSESEDFAVYYCSQTSHIPYTFGGGKLEIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT
PAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN
HRNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CAR к CD70 (SEQ ID NO: 150):

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNY
GMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTDRDTSISTAYMELSRRLSD
DTAVYYCARDYGDYGMWYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGDIVMTQSPDSL
AVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS
GTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAP
RPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCNHRNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA
PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Иллюстративные конструкции CAR к CD33 можно найти в WO 2020095107, соответствующие раскрытия которой включены посредством ссылки для заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе.

Доставка конструкции CAR в Т-клетки

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, можно вводить в любую из сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток, как раскрыто

в данном документе, посредством способов, известных специалистам в данной области техники. Например, кодирующая последовательность CAR может быть встроена в вектор, который можно вводить в генетически сконструированные Т-клетки с обеспечением экспрессии CAR. Для введения любой из нуклеиновых кислот или векторов экспрессии, раскрытых в данном документе, в иммунную эффекторную клетку можно использовать ряд различных способов, известных из уровня техники. Неограничивающие примеры способов введения нуклеиновой кислоты в клетку включают липофекцию, трансфекцию (например, трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию с использованием широко разветвленных органических соединений, трансфекцию с использованием катионных полимеров, трансфекцию на основе дендримеров, оптическую трансфекцию, трансфекцию на основе частиц (например, трансфекцию с помощью наночастиц) или трансфекцию с использованием липосом (например, катионных липосом)), микроинъекцию, электропорацию, сжатие клеток, сонопорацию, слияние протопластов, импалефекцию, гидродинамическую доставку, генную пушку, магнитофекцию, вирусную трансфекцию и нуклеофекцию.

В конкретных примерах нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию CAR, может быть доставлена в клетку с использованием аденоассоциированного вируса (AAV). AAV представляют собой небольшие вирусы, которые сайтспецифическим образом интегрируются в геном хозяина и поэтому могут доставлять трансген, такой как CAR. Инвертированные концевые повторы (ITR) присутствуют, фланкируя геном AAV и/или представляющий интерес трансген, и служат точками начала репликации. В геноме AAV также присутствуют белки гер и сар, которые при транскрибировании образуют капсиды, которые инкапсулируют геном AAV для доставки в клетки-мишени. Поверхностные рецепторы на этих капсидах обеспечивают серотип AAV, который определяет, с какими целевыми органами капсиды будут в первую очередь связываться, и, таким образом, какие клетки будут наиболее эффективно заражаться AAV. В настоящее время известно двенадцать серотипов AAV человека. В некоторых вариантах осуществления AAV для применения для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, представляет собой AAV серотипа 6 (AAV6).

Аденоассоциированные вирусы входят в число наиболее часто используемых вирусов для генной терапии по нескольким причинам. Во-первых, AAV не вызывают иммунного ответа при введении млекопитающим, включая людей. Во-вторых, AAV эффективно доставляют в клетки-мишени, особенно при рассмотрении выбора подходящего серотипа AAV. Наконец, AAV обладают способностью инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, поскольку геном может сохраняться в клетке-хозяине без интеграции. Эта особенность делает их идеальным кандидатом для генной терапии.

Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, может быть сконструирована для вставки в геномный сайт, представляющий интерес, в Т-клетках хозяина. В некоторых вариантах осуществления целевой геномный сайт может находиться в локусе типа "safe harbor".

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR (например, посредством донорной матрицы, которая может переноситься вирусным вектором, таким как аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор), может быть сконструирована таким образом, что она может быть вставлена в участок в пределах гена TRAC с нарушением гена TRAC в генетически сконструированных Т-клетках и экспрессии полипептида CAR. Нарушение TRAC приводит к потере функции эндогенного TCR. Например, нарушение в гене TRAC может быть создано с помощью эндонуклеазы, такой как описанная в данном документе, и одной или нескольких gRNA, нацеливающих на одну или несколько геномных областей TRAC. Для этой цели можно использовать любую из gRNA, специфичных в отношении гена TRAC и целевых областей, раскрытых в данном документе.

В некоторых примерах геномная делеция в гене TRAC и замена кодирующим сегментом CAR могут быть созданы посредством репарации, направляемой гомологией, или HDR (например, с применением донорной матрицы, которая может представлять собой часть вирусного вектора, такого как аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор). В некоторых вариантах осуществления нарушение в гене TRAC может быть создано с помощью эндонуклеазы, раскрытой в данном документе, и одной или нескольких gRNA, нацеливающих на одну или несколько геномных областей TRAC, и вставки сегмента, кодирующего CAR, в ген TRAC.

Донорная матрица, раскрытая в данном документе, может содержать кодирующую последовательность CAR. В некоторых примерах последовательность, кодирующая CAR, может быть фланкирована двумя областями гомологии для обеспечения эффективной HDR в участке генома, представляющем интерес, например, в гене TRAC, с применением способа редактирования генов, известного из уровня техники. В некоторых примерах можно использовать способ на основе CRISPR. В этом случае обе нити ДНК в целевом локусе могут быть разрезаны ферментом Cas9 CRISPR, направляемым с помощью gRNA, специфичных в отношении целевого локуса. Затем происходит HDR для репарации двухнитевого разрыва (DSB) и вставки донорной ДНК, кодирующей CAR. Для того, чтобы это происходило корректно, донорная последовательность конструируется с фланкирующими остатками, которые являются комплементарными последовательности, окружающей сайт DSB в гене-мишени (далее "плечи гомологии"), таком как ген TRAC. Эти плечи гомологии служат матрицей для репарации DSB и позволяют HDR быть практически безошибочным механизмом. Скорость репарации, направляемой гомологией (HDR), зависит от расстояния между мутацией и сайтом разрезания, поэтому важно выбрать перекрывающиеся или близлежащие сайты-мишени. Матрицы могут включать дополнительные последовательности, фланкированные гомологичными областями, или могут содержать последовательность, которая отличается от геномной последовательности, тем самым обеспечивая возможность ее редактирования.

В качестве альтернативы, донорная матрица может не иметь областей гомологии с целевым местоположением в ДНК и может быть интегрирована посредством NHEJ-зависимого соединения концов после расщепления в целевом сайте.

Донорная матрица может представлять собой ДНК или РНК, быть одностречевой и/или двухстречевой, и может быть введена в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы донорной последовательности можно защитить (например, от экзонуклеолитического разрушения) с помощью способов, известных специалистам в данной области техники. Например, один или несколько дидезоксинуклеотидных 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 разрушения включают без ограничения добавление концевой(ых) аминокислот(групп) и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфотриэтиловые, фосфорамидатные, и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы.

Донорная матрица может быть введена в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Более того, донорная матрица может быть введена в клетку в виде депротеинизированной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты со средством, таким как липосома или полксамер, или может быть доставлена вирусами (например, аденовирусом, AAV, вирусом герпеса, ретровирусом, лентивирусом и лентивирусом с дефектной интегразой (IDLV)).

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица может быть вставлена в сайт рядом с эндогенным промотором (например, ниже или выше) таким образом, что ее экспрессия может управляться эндогенным промотором. В других вариантах осуществления донорная матрица может содержать экзогенный промотор и/или энхансер, например, конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифический промотор для контроля экспрессии гена CAR. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор EF1 α . Могут быть использованы другие промоторы.

Кроме того, экзогенные последовательности также могут включать транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, внутренние участки посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды 2A и/или сигналы полиаденилирования.

При необходимости дополнительное редактирование генов (например, нокин или нокаут) можно выполнять в отношении терапевтических Т-клеток, полученных из банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, для улучшения функции и терапевтической эффективности Т-клеток. Например, в случае нокаута $\beta 2M$ его можно осуществлять для снижения риска или предупреждения реакции "хозяин против трансплантата" Другие

примеры включают нокин или нокаут генов для улучшения лизиса клеток-мишеней, нокин или нокаут генов для повышения эффективности терапевтических Т-клеток, таких как Т-клетки с CAR, полученные из клеток из банка Т-клеток. Примеры включают нокаут гена контрольной точки иммунного ответа, как например PD-1.

III. Варианты терапевтического применения

Ожидается, что терапевтические Т-клетки, полученные с использованием генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток, будут поддерживать здоровое состояние Т-клеток, обеспечиваемое наличием мутации в гене *TET2*, нарушения гена *FAS*, нарушения гена *CD70* или их комбинации. Например, поддержание здорового состояния Т-клеток может продлевать экспансию во время изготовления, тем самым повышая выход и стабильность. В другом примере поддержание здорового состояния Т-клеток может обеспечивать сохранение истощенных/нездоровых Т-клеток, что, таким образом, потенциально обеспечивает снижение доз для пациентов и более устойчивые ответы.

Терапевтические Т-клетки, полученные с использованием банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, можно вводить субъекту для терапевтических целей, например, лечения солидной опухоли, на которую нацелена конструкция CAR, экспрессируемая терапевтическими Т-клетками.

Стадия введения может включать размещение (например, трансплантацию) терапевтических Т-клеток в организме субъекта посредством способа или пути, которые приводят к по меньшей мере частичной локализации терапевтических Т-клеток в требуемом местоположении, таком как местоположение опухоли, таким образом, что достигается(-ются) требуемый(-ые) эффект(-ы). Терапевтические Т-клетки можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимое местоположение в организме субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от такого короткого, как от нескольких часов, например, двадцати четырех часов, до нескольких дней, до такого длинного, как несколько лет или даже вся продолжительность жизни субъекта, т. е. при долгосрочном приживлении. Например, в некоторых аспектах, описанных в данном документе, эффективное количество терапевтических Т-клеток можно вводить посредством системного пути введения, такого как интраперитонеальный или внутривенный путь.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические Т-клетки вводят системно, что относится к введению популяции клеток не напрямую в целевой участок, ткань или орган, а таким образом, что вместо этого они достигают кровеносной системы субъекта и, следовательно, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам. Подходящие способы введения включают инъекцию, инфузию, введение по каплям или проглатывание. Инъекция включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную,

транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, внутриспинномозговую и внутригрудинную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления путь является внутривенным.

Субъектом может быть любой субъект, для которого необходим диагноз, лечение или терапия. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

В некоторых случаях терапевтические Т-клетки могут являться аутологичными ("своими") по отношению к субъекту, т. е. клетки происходят из организма этого же субъекта. В качестве альтернативы терапевтические Т-клетки могут являться неаутологичными ("чужими", например, аллогенными, сингенными или ксеногенными) по отношению к субъекту. "Аллогенный" означает, что терапевтические Т-клетки не происходят из организма субъекта, который получает лечение, а происходят из организма других индивидуумов (доноров) такой же видовой принадлежности, что и субъект. Донор представляет собой индивидуума, который не является подлежащим лечению субъектом. Донор представляет собой индивидуума, который не является пациентом. В некоторых вариантах осуществления донор является индивидуумом, у которого отсутствует рак, подлежащий лечению, или не имеется подозрение на него. В некоторых вариантах осуществления используют нескольких доноров, например, двух или более доноров.

В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных Т-клеток, вводимая согласно способам, описанным в данном документе, содержит аллогенные Т-клетки, полученные от одного или нескольких доноров. Термин "аллогенный" означает клетку, популяцию клеток или биологические образцы, содержащие клетки, полученные от одного или нескольких разных доноров из одного и того же вида, в которых гены в одном или нескольких локусах не являются идентичными генам реципиента (например, субъекта). Например, популяция сконструированных Т-клеток, вводимая субъекту, может быть получена от одного или нескольких неродственных доноров или от одного или нескольких неидентичных сиблингов. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться популяции сингенных клеток, такие как популяции, полученные от генетически идентичных доноров (например, идентичных близнецов). В некоторых вариантах осуществления клетки являются аутологичными клетками; то есть сконструированные Т-клетки получают или выделяют от субъекта и вводят этому же субъекту, т. е. донором и реципиентом является один и тот же субъект.

Термин "эффективное количество" означает количество сконструированных Т-клеток в популяции, необходимое для предупреждения или уменьшения выраженности по меньшей мере одного или нескольких признаков или симптомов медицинского состояния (например, рака), и относится к количеству композиции, достаточному для обеспечения необходимого эффекта, например, для лечения субъекта, имеющего медицинское состояние. Эффективное количество также включает количество, достаточное для предупреждения или задержки развития симптома заболевания, изменения хода развития

симптома заболевания (например, без ограничения, замедления прогрессирования симптома заболевания) или устранения симптома заболевания. Понятно, что для любого данного случая подходящее эффективное количество может быть определено специалистом в данной области техники посредством проведения стандартных экспериментов.

Вследствие повышенной персистенции и эффективности терапевтических Т-клеток, полученных из банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, доза терапевтических Т-клеток, предусмотренных в данном документе, может являться более низкой, чем стандартная доза Т-клеток с CAR, полученных посредством традиционных подходов (например, с применением Т-клеток, которые не подвергались одной или нескольким процедурам редактирования генов, как раскрыто в данном документе, включая мутированный ген TET2, нарушенный ген FAS и/или нарушенный ген CD70). В некоторых примерах эффективное количество терапевтических Т-клеток, раскрытых в данном документе, может быть в по меньшей мере 2 раза ниже, в по меньшей мере 5 раз ниже, в по меньшей мере 10 раз ниже, в по меньшей мере 20 раз ниже, в по меньшей мере 50 раз ниже или в по меньшей мере 100 раз ниже, чем стандартная доза средства терапии на основе Т-клеток с CAR. В некоторых примерах эффективное количество терапевтических клеток, раскрытых в данном документе, может составлять менее 10^6 клеток, например, 10^5 клеток, 5×10^4 клеток, 10^4 клеток, 5×10^3 клеток или 10^3 клеток. В некоторых примерах, описанных в данном документе, осуществляют экспансию клеток в культуре перед их введением субъекту, нуждающемуся в этом.

Эффективность лечения с применением терапевтических Т-клеток, раскрытых в данном документе, может определить квалифицированный врач. Лечение считается "эффективным", если какой-либо один или все признаки или симптомы, представляющие собой, в качестве лишь одного примера, уровни функциональной мишени, изменяются благоприятным образом (например, повышаются на по меньшей мере 10%), или происходит уменьшение или облегчение тяжести других клинически приемлемых симптомов или маркеров заболевания (например, рака). Эффективность также можно измерить по отсутствию ухудшения состояния субъекта, что оценивается по госпитализации или необходимости в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование заболевания останавливается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе. Лечение включает любое лечение заболевания у субъекта и включает: (1) ингибирование заболевания, например, остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение заболевания, например, вызывание регрессии симптомов; и (3) предупреждение или снижение вероятности развития симптомов.

Комбинированные терапевтические средства также охватываются настоящим изобретением. Например, терапевтические Т-клетки, раскрытые в данном документе, можно применять совместно с другими терапевтическими средствами для лечения,

осуществляемого в соответствии с таким же показанием, или для повышения эффективности терапевтических Т-клеток и/или снижения проявления побочных эффектов, обусловленных терапевтическими Т-клетками.

НАБОРЫ

В настоящем изобретении также предусмотрены наборы для применения в получении банка Т-клеток, терапевтических Т-клеток и для вариантов терапевтического применения.

В некоторых вариантах осуществления набор, предусмотренный в данном документе, может содержать компоненты для проведения генетического редактирования одного или нескольких из гена *TET2*, гена *FAS* и гена *CD70* и необязательно популяцию иммунных клеток, в отношении которых можно проводить генетическое редактирование (например, лейкопак). Образец лейкопака может являться обогащенным продуктом лейкофереза, который был собран из периферической крови. Обычно он содержит ряд различных клеток крови, в том числе моноциты, лимфоциты, тромбоциты, плазму крови и эритроциты. Компоненты для генетического редактирования одного или нескольких генов-мишеней могут содержать подходящую эндонуклеазу, такую как РНК-направляемая эндонуклеаза, и одну или несколько направляющих нуклеиновых кислот, которые направляют расщепление одного или нескольких подходящих геномных сайтов посредством эндонуклеазы. Например, набор может содержать фермент Cas, такой как Cas9, и одну или несколько gRNA, нацеливающих на ген *TET2*, ген *FAS* и/или ген *CD70*. Любая из gRNA, специфичных в отношении этих генов-мишеней, может быть включена в набор. Такой набор может дополнительно содержать компоненты для дополнительного редактирования генов, например, gRNA и необязательно дополнительные эндонуклеазы для редактирования других генов-мишеней, таких как *β2M* и/или *TRAC*.

В некоторых вариантах осуществления набор, предусмотренный в данном документе, может содержать популяцию генетически сконструированных Т-клеток из банка Т-клеток, как раскрыто в данном документе, и один или несколько компонентов для получения терапевтических Т-клеток, также раскрытых в данном документе. Такие компоненты могут включать эндонуклеазу, подходящую для редактирования генов, и нуклеиновую кислоту, кодирующую конструкцию CAR, представляющую интерес. Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, может являться частью донорной матрицы, раскрытой в данном документе, которая может содержать гомологичные плечи, фланкирующие последовательность, кодирующую CAR. В некоторых случаях донорную матрицу может нести вирусный вектор, такой как вектор на основе AAV. Набор может дополнительно содержать gRNA, специфичную в отношении гена *TRAC*, для обеспечения вставки последовательности, кодирующей CAR, в ген *TRAC*.

В еще других вариантах осуществления набор, раскрытый в данном документе, может содержать популяцию терапевтических Т-клеток, раскрытых для предполагаемых терапевтических целей.

Любой из наборов, раскрытых в данном документе, дополнительно содержит инструкции по получению банка Т-клеток, терапевтических Т-клеток или вариантов терапевтического применения терапевтических Т-клеток. В некоторых примерах включенные инструкции могут содержать описание применения компонентов, обеспечивающих редактирование генов, предназначенных для генетического конструирования одного или нескольких генов-мишеней (например, TET2, FAS, CD70 или их комбинации) для получения банка Т-клеток из родительских Т-клеток из подходящего источника (например, тех, что описаны в данном документе). В других примерах включенные инструкции могут содержать описание того, каким образом вводить нуклеиновую кислоту, кодирующую конструкцию CAR, в Т-клетки из банка Т-клеток для получения терапевтических Т-клеток.

В качестве альтернативы набор может дополнительно содержать инструкции по введению терапевтических Т-клеток, раскрытых в данном документе, для достижения предполагаемой активности, например, для элиминации пораженных заболеванием клеток, на которые нацелен CAR, экспрессируемый на терапевтических Т-клетках. Набор может дополнительно содержать описание выбора субъекта, подходящего для лечения, на основе идентификации того, нуждается ли субъект в лечении. Инструкции, относящиеся к применению терапевтических Т-клеток, описанных в данном документе, как правило, включают информацию о дозировке, графике введения доз и пути введения для предполагаемого средства лечения. Контейнеры могут представлять собой однократные дозы, объемные упаковки (например, упаковки со множеством доз) или частичные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах по настоящему изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или листке-вкладыше. На этикетке или в листке-вкладыше указывают, что терапевтические Т-клетки применяют для лечения, задержки начала и/или уменьшения выраженности заболевания или нарушения у субъекта.

Наборы, предусмотренные в данном документе, находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает без ограничения флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т. п. Также рассматриваются упаковки для применения в комбинации со специфическим устройством, таким как инфузионное устройство для введения терапевтических Т-клеток. Набор может иметь отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также иметь отверстие для стерильного доступа.

Наборы необязательно могут содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и пояснительная информация. Обычно набор содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш(листки-вкладыши) в контейнере или на нем. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены изделия, содержащие содержимое наборов, описанных выше.

Общие методики

При осуществлении настоящего изобретения на практике будут использоваться, если не указано иное, общепринятые методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. Такие методики полностью объяснены в литературе, такой как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds. 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practice approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985»; *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984»; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986»; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986»; и B. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.).

Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области может на основании приведенного выше описания применять настоящее изобретение в его наиболее полном объеме. Следовательно, следующие конкретные варианты осуществления должны толковаться как исключительно иллюстративные и никоим образом не ограничивающие остальную часть настоящего изобретения. Все публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки для целей или заявляемого объекта, упомянутых в данном документе.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Эффект нокаута (КО) или мутации TET2 в отношении первичных Т-клеток человека

(i) Эффективные нокаут или мутация TET2 с помощью RNP Cas9:sgRNA в Т-клетках

В данном примере описывается эффективное редактирование гена *TET2* в Т-клетках, полученных из первичных клеток РВМС человека, осуществляемое ex vivo с

использованием редактирования генов посредством CRISPR/Cas9. Геномные сегменты гена *TET2*, содержащие четвертый, пятый и шестой экзоны, кодирующие белок, использовали в качестве исходного материала в программном обеспечении для конструирования gRNA. Требуемыми gRNA являлись те, которые обеспечивали бы делеции в кодирующей последовательности с нарушением аминокислотной последовательности *TET2* и приводили бы к выходу аллеля за пределы рамки считывания/потере функции аллеля (называемых аллелями с "нокаутом *TET2*" или усечением белка *TET2*). Синтезировали четыре (4) идентифицированные *in silico* спейсерные последовательности gRNA, нацеливающиеся на ген *TET2*, и gRNA специфически модифицировали, как указано в **таблице 1**. Хотя gRNA в **таблице 1** модифицировали с 2'-О-метилфосфоротиоатными модификациями, можно использовать немодифицированные gRNA или gRNA с другими модификациями. См. также W O2019097305, соответствующие раскрытия которой включены посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе.

Активированные Т-клетки, полученные из первичных клеток PBMC человека, трансфицировали (электропорировали) с помощью рибонуклеопротеиновой частицы (RNP), содержащей нуклеазу Cas9 и синтетическую модифицированную sgRNA, нацеливающуюся на ген *TET2* (последовательности в **таблице 3** выше), или контролей (без Cas9, без gRNA). Через шесть (6) дней после трансфекции клетки подвергали иммуноблоттингу для оценки эффективности инсерционно-делеционных мутаций.

Как показано на **фиг. 1A-1B** не было выявлено наличия белка *TET2* при определении с помощью капиллярного иммуноанализа с разделением по размерам, называемого Simple Western (protein simple, Сан-Хосе, Калифорния), в клетках, обработанных с помощью gRNA *TET2*-экзон 4_BG4, *TET2*-экзон 5_T1, *TET2*-экзон 5_T2 или *TET2*-экзон 6_BG5, и усеченную(-ые) форму(-ы) белка *TET2* (с более низким кажущимся молекулярным весом, чем у белка *TET2* дикого типа) выявляли в клетках, обработанных с помощью либо gRNA *TET2*-экзон 5_T1, либо gRNA экзон 6_BG5

(ii) *КО или мутация TET2 повышали пролиферацию и экспансию Т-клеток*

Для оценки эффекта модуляции *TET2* (в том числе нарушения или мутации с усечением) в отношении способности Т-клеток осуществлять экспансию в содержащей цитокин среде (IL-2+IL-7) клетки с нарушенным или мутированным геном *TET2* получали, как описано выше. Равные количества клеток высевали при $1,5 \times 10^6$ клеток/мл содержащей цитокин среды (IL-2+IL-7), количество клеток регистрировали каждые 2-3 дня, и плотность клеток доводили до $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в свежей содержащей цитокин среде (IL-2+IL-7). Т-клетки, содержащие нарушение в гене *TET2*, индуцированное посредством *TET2*-экзон 5_T1 или *TET2*-экзон 5_T2, характеризовались более высокими уровнями осуществляемой экспансии по сравнению с контрольными клетками без нарушения гена *TET2* (**фиг. 1B**). Более чем через 6 недель после трансфекции клетки, отредактированные по *TET2* с помощью gRNA *TET2*-экзон 5_T1 или *TET2*-экзон 5_T2, продолжали пролиферировать, и модуляция *TET2* с помощью gRNA *TET2*-экзон 5_T1

(приводящая к получению усеченной формы TET2) приводила к более высоким значениям выхода клеток в культуре по сравнению с другими группами, а также вызывала увеличение выхода клеток в более чем 250 раз по сравнению с нетрансфицированными клетками (WT). **Фиг. 1В.**

Для оценки того, приводят ли нарушения других кодирующих TET2 экзонов к более высокому уровню Т-клеточной экспансии,

Т-клетки с наличием нарушений в гене TET2 получали после обработки с помощью gRNA TET2-экзон 4_BG4 и TET2-экзон 6_BG5. После редактирования Т-клеток их выращивали в течение 4 недель в стандартных для культуры Т-клеток условиях (среда X-vivo (04-744, Lonza), дополненная 5% сывороткой крови группы АВ человека (HP1022, Valley Biomedical), 50 нг/мл IL-2 (rhIL-2; 130-097-745, Miltenyi Biotech) и 10 нг/мл IL-7 (rhIL-7; Cellgenix 001410-050). Через четыре недели 3×10^6 клеток высевали в 6-луночный планшет G-Rex (газопроницаемый для быстрой экспансии, Wilson Wolf P/N80660M). Клеточную экспансию оценивали посредством подсчета жизнеспособных клеток один раз в неделю в течение десятидневного периода. Экспансию регистрировали как кратное изменение от исходного посева 3×10^6 клеток к наиболее актуальному количеству клеток (т. е. актуальное количество клеток/ 3×10^6 клеток). Клетки поддерживали при 1×10^6 клеток на мл в полной среде. Как показано на **фиг. 1D**, КО TET2, полученный посредством нарушения либо экзона 4, либо экзона 6 гена TET2, приводил к 15-19 кратной экспансии по сравнению с контрольными Т-клетками, не подвергавшимися обработке с помощью RNP, во время 10-недельного периода подсчета (в общей сложности 14 недель в культуре).

В целом, было обнаружено, что Т-клетки, модифицированные по TET2, характеризуются возможностью осуществления экспансии в культуре в течение более чем 4 недель, что является намного более продолжительным периодом, чем для немодифицированных Т-клеток.

(iii) КО или мутация с усечением TET2 снижают количество апоптозных клеток в длительно культивируемых культурах клеток

Количество дефектных по TET2 клеток, подвергающихся апоптозу, в длительно культивируемой культуре клеток оценивали в день 36 после электропорации. Вкратце, аликвоту клеток промывали и окрашивали аннексином V, конъюгированным с FITC, вместе с 7-AAD в связывающем аннексин V буфере (BioLegend) в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем клетки промывали и повторно суспендировали в связывающем аннексин V буфере для анализа посредством проточной цитометрии. Как показано в **таблице 8** ниже, Т-клетки, отредактированные с помощью gRNA TET2-экзон 5_T1 или TET2-экзон 5_T2, демонстрировали снижение количества апоптозных клеток и увеличение процента здоровых клеток в 7-8 раз по сравнению с неотредактированными клетками.

Таблица 8. Процент здоровых клеток в день 36 после электропорации

	Здоровые	Клетки аннексин-	Клетки 7-	Аннексин-V ⁺
--	----------	------------------	-----------	-------------------------

	клетки	V ⁺	AAD ⁺	Клетки 7-AAD ⁺
Имитационный контроль	8,48%	60,3%	0,48%	30,7%
TET2-экзон 5_T1	61,3%	21,1%	0,21%	17,4%
TET2-экзон 5_T2	64,3%	20,5%	0,13%	16,1%

(iv) КО и мутация с усечением TET2 повышали количество активируемых Т-клеток в длительно культивируемых культурах клеток

Для оценки способности TET2-модифицированных Т-клеток к активации в длительно культивируемых культурах клеток клетки, характеризующиеся нарушенным геном *TET2*, получали, как описано выше. В день сорок пять (45) после трансфекции $0,5 \times 10^6$ Т-клеток обрабатывали с помощью BD Golgiplug в течение одного (1) часа с последующей активацией с помощью PMA/иономицина в течение четырех (4) часов в присутствии Golgiplug. Клетки собирали и подвергали окрашиванию поверхности в отношении маркеров активации и внутриклеточному окрашиванию в отношении продуцируемого IFN- γ . Т-клетки, предусматривающие нарушение и мутацию с усечением в гене *TET2*, вызванные воздействием TET2-экзон 3_T3 и TET2-экзон 5_T1 соответственно, демонстрировали большую частоту активированных и IFN- γ -положительных клеток (CD25⁺, IFN- γ ⁺ клеток) по сравнению с контрольными клетками без нарушения гена *TET2* или Т-клетками, трансфицированными другими gRNA. См. результаты в **таблице 9** ниже.

Таблица 9. Процент IFN- γ ⁺/CD25⁺ Т-клеток среди генетически отредактированных Т-клеток

	Имитационный контроль	TET2-экзон 5_T1	TET2-экзон 5_T2
CD25 ⁺ /IFN- γ ⁺ клетки, %	0	13,1	4,75

Пример 2. Нокаут (КО) FAS повышал пролиферацию и снижал апоптоз

(i) Нокаут FAS с помощью RNP Cas9:sgRNA в Т-клетках

В данном примере описывается эффективное редактирование гена FAS в первичных Т-клетках человека ex vivo с использованием подхода, предусматривающего редактирование генов с помощью CRISPR/Cas9. Необходимыми gRNA являлись те, которые обеспечивали бы вставки или делеции в кодирующей последовательности с нарушением аминокислотной последовательности FAS, что приводит к выходу аллеля(-ей) за пределы рамки считывания/потере функции аллеля(-ей) (называемых аллелями с "нокаутом FAS"). Синтезировали все пять (5) идентифицированных in silico спейсерных последовательностей gRNA, нацеливающейся на ген FAS.

Первичные Т-клетки человека от двух здоровых доноров трансфицировали (электропорировали) с помощью рибонуклеопротеиновой частицы (RNP), содержащей

нуклеазу Cas9 и синтетическую модифицированную sgRNA (с 2'-О-метилфосфоротриоатными модификациями), нацеливающуюся на ген FAS (последовательности в **таблице 5** выше), или контролей (без Cas9, без gRNA). Через шесть (6) дней после трансфекции клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии (первичное антитело: антитело PE Dazzle 594 к FAS человека, клон DX2, Biolegend) для оценивания уровней экспрессии FAS на клеточной поверхности.

Как показано на **фиг. 2А**, все gRNA, перечисленные в **таблице 5** выше, приводили к определенному уровню нокаута FAS, при этом gRNA FAS Ex3_T2 характеризовалась самой высокой эффективностью редактирования.

(ii) *KO FAS повышал управляемую цитокином пролиферацию Т-клеток с CAR к BCMA*

Для оценки эффекта нокаута FAS и/или CD70 в отношении пролиферации клеток использовали Т-клетки с CAR к BCMA. Получали следующие группы отредактированных Т-клеток с BCMA-CAR:

TRAC-/B2M-/CAR+ к BCMA (контроль; 2KO, BCMA CAR+),

TRAC-/B2M-/FAS-/CAR+ к BCMA (3KO (FAS), BCMA CAR+),

TRAC-/B2M-/CD70-/CAR+ к BCMA (3KO (CD70), BCMA CAR+),

TRAC-/B2M-/FAS-/CD70-/CAR+ к BCMA (4KO, BCMA CAR+).

Отредактированные клетки обогащали TRAC-/B2M- клетками путем магнитного истощения CD3+B2M⁺ клеток. Вкратце, клетки метили антителами к CD3 с биотином (Biolegend, каталожный № 300404) и антителами к β 2М с биотином (Biolegend, каталожный № 316308), каждое по 0,5 мкг на 1×10^6 клеток в 100-мкл объеме при 4°C в течение 15 минут, промывали и инкубировали с мечеными стрептавидином магнитными микрогранулами (Miltenyi Biotec, 130-048-101) в течение 15 минут при 4°C. Клетки повторно суспендировали в буфере и пропускали через колонки LS (Miltenyi Biotec, 130-042-401) в соответствии с протоколом производителя.

Чтобы определить эффект FAS или CD70 в отношении пролиферации Т-клеток, управляемой IL-2/IL-7, отредактированные Т-клетки (1×10^6 клеток/мл) культивировали в ростовой среде (среда X-vivo (04-744, Lonza), дополненной 5% сыворотки АВ человека (HP1022, Valley Biomedical), 50 нг/мл IL-2 (rhIL-2; 130-097-745, Miltenyi Biotec) и 10 нг/мл IL-7 (rhIL-7; Cellgenix 001410-050), на протяжении периода до четырех недель. В указанные дни клетки подсчитывали и пересеивали в свежую среду при $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в соответствующие чашки для культивирования.

Как показано на **фиг. 2В**, нокаут FAS или CD70 улучшал управляемую IL-2/IL-7 пролиферацию Т-клеток с CAR к BCMA *in vitro* по сравнению с контролями (т. е. Т-клетками с CAR к BCMA, содержащими эндогенные FAS или CD70). Нокаут как FAS, так и CD70 демонстрировал синергетический эффект в отношении способности к пролиферации Т-клеток с CAR к BCMA по сравнению с нокаутом только FAS или CD70.

Фиг. 2В.

(iii) KO FAS обеспечивал устойчивость T-клеток с CAR к BCMA к апоптозу, индуцированному антителом к FAS

Оценивали эффект KO FAS в отношении апоптозной клеточной гибели T-клеток CAR+ к BCMA после воздействия антитела к FAS. Вкратце, для активации сигнального пути FAS-FASL T-клетки CAR+ к BCMA подвергали воздействию антитела к FAS (1 мкг/мл, BioLegend, каталожный № 305704) в течение 48 часов. В конце обработки аликвоты клеток промывали и окрашивали аннексином V, конъюгированным с флуорохромом, вместе с 7-AAD в связывающем аннексин V буфере (BioLegend) в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем клетки промывали и повторно суспендировали в связывающем аннексин V буфере для анализа посредством проточной цитометрии.

Как показано на **фиг. 2С**, делеция в FAS (KO FAS) обеспечивала устойчивость T-клеток CAR+ к BCMA к апоптозу, индуцированному антителом к FAS, что продемонстрировано по снижению процента апоптозных клеток как среди клеток с 3КО (TRAC-/B2M-/FAS-), так и среди клеток с 4КО (TRAC-/B2M-/FAS-/CD70-).

Пример 3. Нокаут трех генов CD70, TET2 и FAS усиливал цитолитическую активность

Т-клеток с CAR к CD19

После получения отредактированных Т-клеток с CAR к CD19 проверяли функциональную активность Т-клеток с CAR с использованием анализа цитотоксичности на основе проточной цитометрии. См. WO 2019/097305 для раскрытий клеток с CAR к CD19, соответствующие раскрытия которой включены посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе. Т-клетки с CAR к CD19 (TRAC-/β2M-/CAR+ к CD19 и TRAC-/β2M-/CD70-/TET2-/FAS-/CAR+ к CD19) совместно культивировали с линией раковых клеток, экспрессирующих CD19 (клеток-мишеней): Raji (ATCC ccl-86). Клетки-мишени метили с помощью 5 мкМ efluor670 (eBiosciences), промывали и инкубировали в совместных культурах с TRAC-/β2M-/CAR+ к CD19 или TRAC-/β2M-/CD70-/TET2-/FAS-/CAR+ к CD19 при варьирующихся соотношениях (0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1:1 Т-клетки:клетки-мишени). Клетки-мишени высевали по 100000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном. Совместную культуру инкубировали в течение 48 часов. После инкубации лунки промывали и среду заменяли 200 мкл среды, содержащей 5 мг/мл DAPI (Molecular Probes) в разведении 1:500. Затем в каждую лунку добавляли двадцать пять (25) мкл гранул CountBright (Life Technologies), и культуры клеток анализировали на жизнеспособность клеток посредством проточной цитометрии (т. е. жизнеспособные клетки были отрицательными по окрашиванию DAPI).

Процент клеточного лизиса клеток-мишеней (например, клеток Nalm6 или Raji) затем определяли с использованием следующей формулы:

процент клеточного лизиса = (1 - ((общее число клеток-мишеней в тестируемом образце) ÷ (общее число клеток-мишеней в контрольном образце))) X 100;

В этой формуле тестируемый образец относится к клеткам-мишеням (например, клеткам Raji), которые совместно культивировали с (1) Т-клетками TRAC-/β2M-/CAR+ к CD19 или (2) клетками TRAC-/β2M-/CD70-/TET2-/FAS-/CAR+ к CD19; и контрольный образец относится к клеткам-мишеням в отдельности, которые не культивировали совместно с Т-клетками с CAR

Нарушение генов CD70, TET2 и FAS приводило к усилению цитолитической активности Т-клеток с CAR к CD19 по сравнению с линией клеток Raji при низких соотношениях CAR-Т и мишени. **Фиг. 3А.** См. WO 2019097305 для описаний Т-клеток с CAR к CD19 (например, клеток TC1). Соответствующие раскрытия данной РСТ-публикации тем самым включены посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе. Повышенная активность, связанная с потерей CD70, TET2 и FAS в отношении линии клеток Raji, указывает на то, что в воздействующих на опухоль условиях, особенно когда соотношения Т-клеток с CAR и опухоли являются низкими, потеря CD70, TET2 и FAS может иметь существенное преимущество для Т-клеток с CAR при уничтожении опухолевых клеток.

Получение банка Т-клеток и последовательные процедуры редактирования после экспансии клеточного банка

Дополнительно изучается применение технологии редактирования генов CRISPR/Cas9 для получения банка Т-клеток человека, где ген TET2 изначально подвергнут нокауту, а затем дополнительно отредактирован через четыре недели в культуре. В частности, ген FAS, являющийся геном рецептора смерти, находящегося на клеточной поверхности (FAS), и ген кластера дифференцировки 70 (CD70) подвергали редактированию через четыре недели посредством редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9 с получением Т-клеток, дефектных по одному или двум и более генам. Начальное редактирование проводили в отношении активированных первичных Т-клеток человека, и оно включало электропорацию контрольных Т-клеток (без RNP) и Т-клеток с использованием комплекса RNP Cas9/gRNA TET2. Смесь для нуклеофекции содержала раствор Nucleofector™, 5×10^6 клеток, 1 мкМ Cas9 и 5 мкМ gRNA (как описано в Hendel et al., Nat Biotechnol. 2015; 33(9):985-989, PMID: 26121415).

Редактирование, проведенное через четыре недели, включало повторную электропорацию Т-клеток с нокаутом TET2 и контрольных Т-клеток без RNP. Для получения Т-клеток с нокаутом двух генов клетки с нокаутом TET2 электропорировали с помощью комплекса RNP, содержащего белок Cas9 и sgRNA для одного из следующих генов: FAS или CD70. Для получения Т-клеток с нокаутом трех генов клетки с нокаутом TET2 электропорировали с помощью двух разных комплексов RNP, при этом каждый комплекс РНК содержал белок Cas и sgRNA для одного из следующих генов: FAS и CD70. Иллюстративные gRNA для применения в редактировании генов TET2, FAS и CD70 представлены в **таблице 10** ниже.

Таблица 10. Последовательности gRNA для TET2 FAS CD70

Последовательности gRNA

Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
sgRNA TET2 (TET2-экзон 4_BG4)	cauuaggaccugcuccuagaguuu uagagcuagaaaagcaaguuaaa auaaggcuaguccguuaucaacuu gaaaaaguggcaccgagucggugc uuuu (SEQ ID NO:12)	c*a*u*uaggaccugcuccuagagu uuagagcuagaaaagcaaguuaaaa uaaggcuaguccguuaucaacuu gaaaguggcaccgagucggugcu*u*u *u (SEQ ID NO: 13)
sgRNA FAS	acugcgugcccugccaagaaguuu uagagcuagaaaagcaaguuaaa auaaggcuaguccguuaucaacuu gaaaaaguggcaccgagucggugc uuuu (SEQ ID NO: 83)	a*c*u*gcugcccugccaagaagu uuagagcuagaaaagcaaguuaaaa uaaggcuaguccguuaucaacuu gaaaguggcaccgagucggugcu*u*u *u (SEQ ID NO: 84)
sgRNA CD70	GCUUUGGUCCCAUUGG UCGCguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaagggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU (SEQ ID NO: 44)	G*C*U*UUGGUCCCAUUG GUCGCguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaagggcuaguccguu ucaacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 45)

*: остаток 2'-О-метилфосфоротиата

Чтобы оценить, влияет ли дополнительное редактирование банка клеток на экспансию клеток, подсчитывали число клеток среди Т-клеток с одним, двумя, тремя отредактированными генами (неотредактированные Т-клетки использовали в качестве контроля) в течение семинедельного периода после редактирования. Для каждого генотипа Т-клеток получали и высевали 1×10^6 клеток. После электропорации клеточную экспансию оценивали посредством подсчета жизнеспособных клеток один раз в неделю в течение семинедельного периода. Клетки поддерживали при 1×10^6 клеток на мл в полной среде.

Как показано на **фиг. 3В**, пролиферация (экспансия) клеток продолжалась после второй электропорации в условиях банка отредактированных клеток. Пролиферацию клеток наблюдали среди Т-клеток с нокаутом только одного TET2 (банк клеток), двух (TET2-/CD70-) или (TET2-/FAS-) или трех (TET2-/CD70-/FAS) генов, на что указывает количество жизнеспособных клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что последовательные процедуры редактирования генов, выполненные в отношении банка Т-клеток с TET2-, не влияют на здоровое состояние Т-клеток, как измерено по пролиферации Т-клеток после периода восстановления.

Пример 4. Эффект in vivo, оказываемый KO TET2, FAS и CD70, в отношении аллогенных Т-клеток с CAR в модели острого лимфобластного лейкоза человека на основе ксенотрансплантата опухолевых клеток Nalm-6 с внутривенной диссеминацией

Мышиную модель с диссеминацией применяли для дополнительной оценки эффективности in vivo Т-клеток с CAR, лишенных B2M и TRAC, а также TET2, FAS и/или CD70.

Модель с внутривенной диссеминацией (модель с диссеминацией), полученную с применением происходящих из CD19⁺ B-ALL опухолевых клеток острого лимфобластного лейкоза человека линии Nalm-6 у мышей линии NOG, применяли для демонстрации эффективности Т-клеток с CAR к CD19/TRAC⁻/B2M⁻ (Т-клетки с CAR к CD19) с дополнительными редактированиями генов, раскрытых в данном документе (например, TET2, FAS и/или CD70), или без них. Т-клетки с CAR к CD19 получали, как описано в примере 3. См. также WO 2019/097305.

Эффективность Т-клеток с CAR к CD19 оценивали на модели с диссеминацией с применением способов, применяемых компанией Translations Drug Development, LLC (Скоттсдейл, Аризона) и описанных в данном документе. Вкратце, 40 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. В начале исследования мышей разделяли на 8 групп обработки, как показано в **таблице 11**. Мышам внутривенно инокулировали клетки Nalm6-Fluc-GFP (Nalm6-Fluc-Neo/eGFP--Puro) для моделирования диссеминированного заболевания. В день 1 все мыши получали внутривенную инъекцию $0,5 \times 10^6$ клеток Nalm6/мышь. В день 4 группы 2-8 получали внутривенную инъекцию Т-клеток с CAR (4×10^6 клеток CAR+/мышь), как указано в **таблице 11**.

Таблица 11. Группы обработки

Группа	Опухолевые клетки Nalm6, $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь	Т-клетки с CAR (i.v.), 4×10^6 клеток/мышь	N
1	X	н. д.	5
2	X	CAR к CD19/TRAC-/B2M-	5
3	X	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/CD70-	5
4	X	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/TET2-	5
5	X	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/FAS-	5
6	X	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/TET2-/CD70-	5
7	X	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/FAS-/CD70-	5
8	X	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/FAS-/TET2- /CD70-	5

В ходе исследования мышей ежедневно контролировали, а вес тела измеряли два раза в неделю. Сбор образцов крови (0,1 мл/мышь) осуществляли для всех мышей путем забора крови из подчелюстной вены в день 2, 7, 14, 21, 42 и 50 для оценки экспансии Т-клеток с CAR в ходе исследования. Биoluminesценцию (BLI; общая ROI, фотон/с) измеряли дважды в неделю, начиная в день 4 исследования. Важной конечной точкой было время до проявления периморбидности, а также оценивали эффект приживаемости Т-клеток. Процент смертности животных и время до гибели регистрировали для каждой группы в исследовании. Мышей подвергали эвтаназии до наступления агонального состояния. Мыши могли быть определены как находящиеся в агональном состоянии и умерщвленные, если удовлетворялись один или несколько из следующих критериев:

- потеря массы тела, составляющая 20% или более, сохраняющаяся в течение периода времени, превышающего 1 неделю;
- опухоли, которые подавляют нормальные физиологические функции, такие как прием пищи, питье, подвижность и способность мочиться и/или испражняться;
- продолжительная обильная диарея, приводящая к чрезмерной потере массы (> 20%); или
- непрекращающиеся хрипы и дыхательная недостаточность.

Животных также считали находящимися в агональном состоянии, если имели место продолжительная или чрезмерная боль или дистресс, определенные посредством клинических наблюдений, такие как прострация, сутулость, паралич/парез, вздутие живота, изъязвления, абсцессы, судорожные припадки и/или кровоизлияния.

(i) Показатели выживаемости in vivo

Мыши в группах, получающих Т-клетки с CAR TRAC⁺/B2M⁺ с дополнительным нокаутом TET2 либо в отдельности, либо в комбинации с CD70 и/или FAS (группы 4, 6 и 8), демонстрировали повышение выживаемости относительно мышей, представлявших собой как необработанных (группа 1) мышей, так и мышей, обработанных с помощью аллогенных Т-клеток с CAR к CD19 TRAC⁺/B2M⁺ с аллелем TET2 дикого типа (группа 2), и они не теряли способности противостоять лейкозу, индуцированному Nalm6, даже через 153 дня после лечения. Хотя утеря CD70 (группа 3; CAR к CD19/TRAC⁺/B2M⁺/CD70⁻) не повышала выживаемость относительно мышей из группы 2, добавление нокаута TET2 продлевало выживаемость мышей в группе 6 (CAR к CD19/TRAC⁺/B2M⁺/TET2⁻/CD70⁻) и группе 8 (CAR к CD19/TRAC⁺/B2M⁺/FAS⁺/TET2⁻/CD70⁻) по сравнению с мышами из группы 2. См. таблицу 12 ниже.

Таблица 12. Выраженная в днях выживаемость мышей, обработанных с помощью Т-клеток с CAR

Группа	Т-клетки с CAR (i.v.), 4×10^6 клеток/мышь	Медианная выживаемость (дни)
1	н. д.	24
2	CAR к CD19/TRAC ⁺ /B2M ⁺ -	102

3	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/CD70-	46
4	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/TET2-	> 153
5	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/FAS-	> 153
6	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/TET2-/CD70-	> 153
7	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/FAS-/CD70-	55
8	CAR к CD19/TRAC-/B2M-/FAS-/TET2-/CD70-	137

Для оценки, являются ли эффекты КО TET2, наблюдаемые в аллогенных Т-клетках CAR+ к CD19/TRAC-/B2M-, специфическими в отношении sgRNA TET2-экзон 4 BG4, отдельную партию клеток получали от другого здорового донора и тестировали в моделях Nalm6/in vivo, как указано выше. Все мыши, обработанные с помощью 4×10^6 клеток CAR+, которые характеризовались нарушением локуса TET2, внесенным с помощью любой из следующих sgRNA (TET2-экзон 6_BG5, TET2-экзон 4_BG4 или TET2-экзон 3_T1), являлись мышами с более длительным периодом выживаемости при сравнении с мышами, получающими Т-клетки TRAC-/B2M-/CAR+ (**фиг. 5А**; все группы TET2-демонстрировали статически значимую выживаемость по сравнению с Т-клетками TRAC-/B2M-/CAR+ ($p=,0021$); логранговый критерий), а также они демонстрировали сниженную активность Nalm6-люциферазы с течением времени (**фиг. 5В**). Таким образом, TET2 улучшал эффективность Т-клеток с CAR в мышинных моделях на основе Nalm6 с диссеминацией.

В совокупности нокаут TET2 приводит к значительной клеточной экспансии, что приводит к усилению функции Т-клеток с CAR в модели in vivo CD19⁺ злокачественного новообразования. Кроме того, КО TET2 позволяет Т-клеткам с CAR нести редактирования в других генах, которые могут характеризоваться дополнительными преимуществами для клеток (например, противоапоптотическими/противостарческими), но сами по себе не продлевают выживаемость в данных моделях лейкоза.

(ii) Экспансия Т-клеток с CAR in vivo

Экспансию Т-клеток с CAR оценивали посредством измерения количества копий CAR с помощью ddPCR ДНК, выделенной из образцов крови, собранных на протяжении исследования, как описано выше.

ДНК выделяли из мышинной ткани с применением набора Qiagen Dneasy blood and tissue kit (Qiagen, Венло, Нидерланды). Общую массу нуклеиновой кислоты из образцов лизированных RBC количественно определяли с применением приборов, представляющих собой либо Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), либо DropSense96 (trinean, Гентбрюгге, Бельгия). Наборы праймеров и зондов, меченных 6-карбоксифлуоресцеином (FAM) (представленные в **таблице 12** ниже), были разработаны для количественного определения уровней интегрированной конструкции CAR в локусе TRAC человека с помощью цифровой капельной ПЦР (ddPCR). ddPCR проводили с применением прибора(-ов) Bio-Rad Automated Droplet Generator, Bio-Rad T100 Thermal Cycler и Bio-Rad QX200 Droplet Reader (Bio-rad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Программное обеспечение

QuantaSoft версии 1.7.4.0917 (Bio-rad Laboratories) применяли для подсчета абсолютного количества интегрированных копий CAR на образец. Наконец, количество выявленных аллелей CAR делили на внесенное общее количество ДНК для вычисления абсолютного количества копий CAR на массу внесенного образца. Анализ ddPCR выявляет количество копий интегрированного трансгена CAR на массу геномной ДНК (gDNA) посредством амплификации ампликона размером 866 п. о., охватывающего эндогенную последовательность TRAC и промотор кассеты экспрессии CAR (EF-1 α). Вкратце, количественное определение посредством анализа обеспечило получение линейных данных ($R^2 > 0,95$) в пределах тестируемого диапазона (от 2 до 300000 копий на мкг gDNA), а также получение % относительной ошибки (%RE) и % коэффициента вариации (% CV) в пределах нормальных диапазонов (%RE $\leq 100\%$ и %CV $\leq 20\%$) для условий $\geq$ LLOQ. LLOD и LLOQ рассчитывали на основе доступных данных, и заданное значение LLOD составляло 5 копий на 0,2 мкг gDNA, а заданное значение LLOQ составляло 40 копий на 0,2 мкг.

Таблица 13. Праймеры и зонды, применяемые для ddPCR

Праймеры и зонды для CAR	
Прямой праймер CAR к CD19-20-30_dd_1	GGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAA (SEQ ID NO: 151)
Обратный праймер CAR к CD19-20-30_dd_1	ATGTGCGCTCTGCCCACTGACGGGC (SEQ ID NO: 152)
Зонд CAR к CD19-20-30_dd_1 (FAM)	AGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCC (SEQ ID NO: 153)

Эти анализы демонстрируют, что добавление КО TET2 к аллогенным Т-клеткам с CAR (TRAC/B2M) позволяло Т-клеткам осуществлять экспансию до более высоких уровней в крови обработанной мышей (например, группы 4, 6 и 8) по сравнению с группами, обработанными с помощью аллогенных Т-клеток с CAR без КО TET2 (например, группы 2, 3, 5 и 7) (**фиг. 4**). Данная экспансия становилась очевидной в день 21 исследования и продолжалась по прошествии дня 100. КО FAS также, по-видимому, обеспечивал более умеренную экспансию Т-клеток с CAR, проявляющуюся в день 50 (например, группа 5 или 7 по сравнению с группой 2) (**фиг. 4**).

В целом, все группы с утерей TET2 характеризовались экспансированными Т-клетками с CAR в периферической крови, а группы с утерей FAS демонстрировали повышенные уровни в относительно более поздние моменты времени.

Пример 5. Нокаут TET2 повышает персистенцию функциональных Т-клеток с CAR в моделях гемобластозов и солидных опухолей

Для оценки механизма того, каким образом КО TET2 повышает эффективность CAR-Т, эффекты нарушения TET2, оказываемые в отношении персистенции Т-клеток с CAR, исследовали в нескольких моделях с повторным воздействием. В случае модели CD19⁺ злокачественного новообразования с повторным воздействием мыши линии NOG

сначала получали клетки с Nalm6-люциферазой, и им вводили дозу Т-клеток с CAR, как описано выше. Мышам вводили дозу 8×10^6 Т-клеток с CAR CAR+ к CD19, все из которых являлись TRAC-/B2M-, наряду с группами, которые характеризовались дополнительным нарушением TET2, индуцированным с применением одной из трех gRNA: TET2-экзон 4_BG4, TET2-экзон 3_T1, TET2-экзон 6_BG5. Хотя необработанные мыши быстро теряли способность противостоять лейкозу, у всех групп, получавших Т-клетки с CAR, происходило устранение лейкоза, первоначально индуцированного клетками с Nalm6-люциферазой, в течение 30-дневного периода (**фиг. 6А**). В день 35 исследования все мыши получали вторую дозу раковых клеток с применением более агрессивной линии раковых клеток. Клетки линии Raji-люцифераза, происходящие из клеток, относящихся к CD19+ лимфоме Беркитта, внутривенно (i.v.) вводили путем инъекции мышам при $0,5 \times 10^6$ клеток на мышь. Наивные мыши (мыши, которые не получали клетки Nalm-luc) быстро теряли способность противостоять лимфомам из клеток Raji. Однако, у мышей, у которых ранее происходило устранение опухолей, индуцированных клетками Nalm6, после получения клеток TRAC-/B2M-/TET2- происходил более эффективный контроль второй опухоли, чем у мышей, которые получали только Т-клетки с CAR TRAC-/B2M- (**фиг. 6А**). Эти данные свидетельствуют о том, что нарушение TET2 обеспечивает непрерывную персистенцию функциональных Т-клеток с CAR. Данный эффект не зависит от нарушенного геномного сегмента TET2, поскольку клетки, отредактированные с помощью нескольких различных sgRNA, обеспечивали сходные результаты.

Для оценки способности КО TET2 повышать персистенцию Т-клеток с CAR в другой модели гемобластоза (множественная миелома) в контексте другой конструкции CAR (CAR к BCMA) Т-клетки с CAR, нацеливающиеся на BCMA, получали от здорового донора. Т-клетки с CAR к BCMA получали, как описано ранее. Были получены группы Т-клеток с CAR, которые представляли собой TRAC-/B2M- и TRAC-/B2M-/TET2- (с применением sgRNA, представляющей собой либо TET2-экзон 4_BG4, TET2-экзон 6_BG5, либо TET2-экзон 5_T1) Мышам линии NOG изначально подкожно инокулировали в их правые боковые стороны 1×10^7 клеток RPMI-8226, происходящих из клеток, относящихся к множественной миеломе. Через 9 дней, когда опухоли были пальпируемыми, путем инъекции вводили i.v. 1×10^6 клеток CAR+. В то время как необработанные мыши быстро достигали конечной точки роста опухоли (2000 мм³), у обеих получавших TRAC-/B2M- и TRAC-/B2M-/TET2- групп происходило эффективное устранение первичных опухолей, индуцированных клетками RPMI-8226 (**фиг. 6В**). В день 32 исследования мыши, предварительно обработанные с помощью Т-клеток CAR+, подвергались повторному воздействию опухолью посредством инъекции 1×10^7 свежих клеток RPMI-8226 в левую боковую сторону мышей. Новой группе наивных мышей вводили путем инъекции 1×10^7 свежих клеток RPMI-8226 в левую боковую сторону (необработанная группа). В то время как Т-клетки с CAR TRAC-/B2M- BCMA- могли в некоторой степени обеспечивать контроль при повторном воздействии, Т-клетки с CAR TRAC-/B2M-/TET2- BCMA- быстро элиминировали эти новые опухолевые клетки (**фиг.**

6C). В совокупности нарушение TET2 обеспечивает для Т-клеток с CAR более длительную персистенцию в моделях агрессивных форм рака с повторным воздействием в случае нескольких моделей гемобластоза. Данный эффект затрагивает Т-клетки с CAR, нацеливающиеся на различные раковые антигены.

Для оценки способности утери TET2 повышать персистенцию Т-клеток с CAR в солидных опухолях Т-клетки с CAR, нацеливающиеся на CD70 (Т-клетки с CAR к CD70), получали от здорового донора. Получали группы Т-клеток с CAR, которые представляли собой TRAC-/B2M-/CD70- и TRAC-/B2M-/CD70-/TET2- (например, sgRNA TET2-экзон 4) BG4). Мышам линии NOG изначально подкожно инокулировали в их правые боковые стороны 5×10^6 клеток A498, происходящих из клеток, относящихся к почечноклеточной карциноме (RCC). Когда опухоли достигали 500 мм^3 1×10^7 Т-клеток с CAR вводили i.v. В то время как необработанные мыши быстро достигали конечной точки роста опухоли (2000 мм^3), у обеих получавших TRAC-/B2M-/CD70- и TRAC-/B2M-/CD70-/TET2- групп происходило эффективное устранение первичных опухолей, индуцированных клетками A498 (**фиг. 6D**). В день 54 исследования мышей подвергали повторному воздействию опухоли посредством инъекции 5×10^6 клеток Saki-1, полученных из клеток, относящихся к RCC, осуществляемой в левую боковую сторону мышей. Новой группе наивных мышей вводили путем инъекции 1×10^7 свежих клеток RPMI-8226 в левую боковую сторону (необработанная группа). В то время как TRAC-/B2M-/CD70-/CD70-/CAR-Т-клетки демонстрировали умеренный контроль опухолей, индуцированных клетками Saki-1, TRAC-/B2M-/CD70-/TET2-/CD70-/CAR-Т-клетки быстро элиминировали эти опухолевые клетки (**фиг. 6E**). В совокупности нарушение TET2 обеспечивает для Т-клеток с CAR более длительную персистенцию в моделях агрессивных форм рака с повторным воздействием в случае как гемобластозов, так и солидных опухолей.

Пример 6. Рост дефектных по TET2 Т-клеток с CAR зависит от цитокинов

Для оценки онкогенного потенциала Т-клеток с CAR, у которых отсутствует TET2, получали Т-клетки с CAR к CD19, которые представляли собой TRAC-/B2M- и относились либо к дикому типу по TET2, либо характеризовались нарушением TET2 (нарушение TET2 получали с применением любой из TET2-экзон 4_BG4, TET2-экзон 6_BG5, TET2-экзон 5_T1). Клетки затем применяли для оценки способности клеток с отредактированным геномом демонстрировать независимый от фактора роста и/или цитокина рост в культуре. 2×10^6 клеток помещали либо в полную среду для Т-клеток (содержащую 5% сыворотку крови человека+IL2 и IL7), либо в среду, содержащую сыворотку крови, но без IL-2 и IL-7. Затем клетки подсчитывали еженедельно с применением трипанового синего и автоматизированного счетчика клеток Countess (Thermo Fisher Scientific). В то время как все группы клеток могли расти в среде, содержащей сыворотку крови и цитокины, не было выявлено каких-либо случаев повышения количества в течение 6-недельного периода ни в одной из групп. **Фиг. 7.** Эти данные демонстрируют, что нарушение TET2 не приводит к непосредственной онкогенной трансформации Т-клеток, полученных из периферической крови человека,

поскольку рост данных клеток продолжает зависеть от цитокинов.

Пример 7. Целевое и нецелевое редактирование, обеспечиваемое направляющими РНК для TET-2

Показатели эффективности целевого и нецелевого редактирования, обеспечиваемого различными gRNA, нацеливающимися на TET2, оценивали в соответствии со способом, раскрытым в **примере 1** выше. Вкратце, активированные Т-клетки, полученные из первичных клеток РВМС человека, трансфицировали (электропорировали) с помощью рибонуклеопротеиновой частицы (RNP), содержащей нуклеазу Cas9 и синтетическую модифицированную sgRNA, нацеливающуюся на ген TET2 (последовательности в **таблице 3** выше), или контролей (без Cas9, без gRNA). Через шесть (6) дней после трансфекции клетки подвергали иммуноблоттингу для оценки эффекта целевого редактирования TET2 в отношении экспрессии белка.

Для оценки целевого и нецелевого редактирования генома применяли такие же методы электропорации для получения двух клеточных популяций отредактированных клеток, полученных из Т-клеток от двух разных доноров (называемых 1 и 2). Клетки подвергали редактированию генов с помощью каждой из семи направляющих молекул, перечисленных в таблицах 3 и 14, а затем собирали через шесть (6) дней после трансфекции. Данные образцы анализировали с помощью гибридного захвата, зависящего от гомологии способа, для обогащения целевыми и нецелевыми сайтами в сочетании с секвенированием следующего поколения. Вкратце, целевые и нецелевые сайты с гомологией по отношению к каждому целевому сайту gRNA определяли путем вычислений, зонды на основе односторонней ДНК применяли для обогащения данными сайтами из общего количества геномной ДНК, данные подвергнутые обогащению сайты секвенировали посредством секвенирования следующего поколения, и данные анализировали в отношении вставок и делеций, указывающих на репарацию, произошедшую после CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования генов.

Результаты представлены в **таблице 14** ниже.

Таблица 14. Результаты анализа посредством гибридного захвата для целевого и нецелевого редактирования

Направляющая последовательность	Целевая последовательность gRNA + (PAM)	протестированных предсказанных	целевого редактирования, гибридного захвата	редактирования в отношении экспрессии белка Tet2	Выявленные нецелевые сайты
TET2-экзон_3-T1	GATTCGCTTGGTGAAA ACG (AGG) (SEQ ID NO: 128)	36	89,0%	КО	Отсутствуют

TET2- экзон_3- T2	CAGGACTCACACGACT ATTC (TGG) (SEQ ID NO: 130)	57	87,7%	Сниженный	Отсутствуют
TET2- экзон_3- T3	TTCCGCTTGGTGAAAAC GAG (GGG) (SEQ ID NO: 132)	54	80,0%	KO/ усечение	Отсутствуют
TET2- экзон_6- BG5	ACGGCACGCTCACCAAT CGC (CGG) (SEQ ID NO: 31)	6	93,8%	KO/ усечение	Имеются, один: интронный по отношению к PRKAR1B, регуляторной субъединице РКА
TET2- экзон 5-T1	GGGATGTCCTATTGCTA AGT (GGG) (SEQ ID NO: 29)	59	93,0%	KO/ усечение	Имеются, один: экзонный по отношению к TET1 с 3 ошибочными спаривания относительно направляющей последовательн ости
TET2- экзон 5-T2	AGGGATGTCCTATTGCT AAG (TGG) (SEQ ID NO: 30)	103	96,0%	KO	Имеются, один
TET2- экзон_4- BG4	CATTAGGACCTGCTCCT AGA (TGG) (SEQ ID NO: 28)	90	94,9%	KO	Имеются, два

^aСреднее по донорам 1 и 2.

Анализ профилей направленных инсерционно-делеционных мутаций в T-клетках

Данные, используемые для количественного определения целевого редактирования, также применяли для количественного определения и обобщения наиболее частых целевых инсерционно-делеционных мутаций для всех направляющих

последовательностей для TET2, перечисленных в **таблице 14**. Эти данные получали из результатов анализа гибридного захвата в отношении локуса TET2 в сочетании с секвенированием следующего поколения для двух доноров (называемых донор 1 и донор 2).

После редактирования генов проведение анализа гибридного захвата для локуса TET2 в популяции Т-клеток после редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9 с получением Т-клеток TET2-обеспечивало получение результатов относительно значений частоты специфических инсерционно-делеционных мутаций и генетически отредактированных последовательностей в локусе TET2 (**таблицы 15-21**; делеции представлены в виде тире, а вставки выделены жирным шрифтом).

В целях количественного определения для отдельной последовательности, проводимого на основе данных по гибриднему захвату, считанные последовательности, выравненные по целевому сайту TET2, на 20 п. о. выше и ниже сайта разрезания, выбирали и рассматривали с целью количественного определения инсерционно-делеционных последовательностей. Из выбранных считанных последовательностей последовательность в пределах 10 п. о. выше и ниже каждого предполагаемого сайта разрезания (~3 п. о. выше PAM (Jinek, et al., Science 2012)) количественно определяли в качестве репрезентативной области целевого редактирования с негомولوجичным соединением концов (NHEJ). Данные в отношении этих целевых генетически отредактированных последовательностей представлены в таблицах ниже, при этом значения частоты для этих последовательностей демонстрируют процент всех последовательностей, охватывающих целевой сайт в пределах 20 п. о. выше и ниже каждого сайта разрезания. Инсерционно-делеционные мутации для каждой направляющей последовательности показаны относительно целевой эталонной последовательности в таблицах 15-21. Эталонная последовательность центрирована по сайту расщепления, простираясь на 10 п. о. в каждом направлении, заканчиваясь 4 п. о. 3'-конца PAM.

Таблица 15. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA TET2-экзон_3-T1

Эталонная целевая последовательность^a: CTTGGTGAAAACG(AGG)GGCC (SEQ ID NO: 154)

SEQ ID NO:	Генетически отредактированная ^b последовательность ^b :	Эталонная последовательность ^c (SEQ ID NO: 154)	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
155	CTTGGTGAAA- CGAGGGGCC	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	27,7	25,6	26,7	1,5
156	CTTGGTGAAAAACG AGGGGCC	CTTGGTGAAAA- CGAGGGGCC	13,7	15,5	14,6	1,3
157	CTTGGTGAA-- CGAGGGGCC	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	4,8	4,2	4,5	0,4
158	CTTGGTGA----- GGGGCC	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	4,8	3,7	4,2	0,8
	-----	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	2,9	3,2	3,0	0,2
	CTTGG-----GGCC	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	2,9	2,1	2,5	0,6
	-----AGGGGCC	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	2,4	2,4	2,4	0,0
	CTTGG-----CC	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	1,8	1,6	1,7	0,1
	C-----C	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	1,2	1,4	1,3	0,1
	CTTGG-----GCC	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	1,2	1,6	1,4	0,3
	CTT-----	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	1,2	1,7	1,4	0,3
	-----GCC	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	0,9	1,2	1,0	0,2
	-----CC	CTTGGTGAAAACGA GGGGCC	0,6	1,2	0,9	0,5

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а PAM указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Таблица 16. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA TET2-экзон_3-T2

Эталонная целевая последовательность ^a : <u>CACACGACTATTC(TGG)CTTC</u> (SEQ ID NO: 159)						
SEQ ID NO:	Генетически отредактированная последовательность ^b	Эталонная последовательность ^c (SEQ ID NO: 159)	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
160	CACACGACT-----GGCTTC	CACACGACTATTCTGGCTTC	14,1	14,7	14,4	0,4
161	CACACGACT-----TC	CACACGACTATTCTGGCTTC	11,5	11,8	11,6	0,2
162	CACACGACT--TCTGGCTTC	CACACGACTATTCTGGCTTC	5,1	3,4	4,2	1,2
163	CACACGACTAT-CTGGCTTC	CACACGACTATTCTGGCTTC	2,9	3,7	3,3	0,6
164	CACACGACTAATTCTGGCTTC	CACACGACTATTCTGGCTTC	4,1	2,5	3,3	1,1
165	CACACGACTATTTCT	CACACGACTATTCTGGCTTC	3	3,4	3,2	0,3

	GGCTTC	TATT- CTGGCTTC				
166	CACACGACT- TTCTGGCTTC	CACACGAC TATTCTGGC TTC	3,4	2,2	2,8	0,8
	CACACGACT-----	CACACGAC TATTCTGGC TTC	2,9	2,2	2,6	0,5
	-----	CACACGAC TATTCTGGC TTC	2,4	2,7	2,6	0,2
	-----CTTC	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,5	1,6	1,6	0,1
	CACAC-----	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,6	1,5	1,6	0,1
167	CACACG---- TTCTGGCTTC	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,8	1	1,4	0,6
	CAC-----	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,3	1,4	1,4	0,1
	-----TTCTGGCTTC	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,5	1,4	1,4	0,1
	C-----	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,4	1	1,2	0,3
168	CACAC----- TGGCTTC	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,1	1,2	1,2	0,1
	CACACG----- GCTTC	CACACGAC TATTCTGGC	1,2	1	1,1	0,1

		TTC				
	-----TC	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,1	1,1	1,1	0
169	CACACGACTA-- CTGGCTTC	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,1	1	1	0,1
	-----GGCTTC	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,2	0,7	1	0,4
	CACACGAC-----	CACACGAC TATTCTGGC TTC	0,7	1,1	0,9	0,3
170	CACACGACT--- CTGGCTTC	CACACGAC TATTCTGGC TTC	1,2	0,6	0,9	0,4

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а PAM указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Таблица 17. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA TET2-экзон_3-T3

Эталонная целевая последовательность ^a : <u>TGGTGAAAACGAG(GGG)CCTT</u> (SEQ ID NO: 171)						
SEQ ID NO:	Генетически отредактированная последовательность ^b	Эталонная последовательность ^c (SEQ ID NO: 171)	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
172	TGGTGAAAACCGAG	TGGTGAAA	17,3	19,9	18,6	1,8

	GGGCCTT	AC- GAGGGGCC TT				
	TGG-----CCTT	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	3,9	4	4	0,1
	-----	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	3,8	3,7	3,8	0,1
	-----CTT	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	3,2	2,7	3	0,4
	TGG-----GGCCTT	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	3,3	2,7	3	0,4
173	TGGTG----- GGGGCCTT	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	3,6	2,3	3	0,9
174	TGGTGAAA- CGAGGGGCCTT	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	3,5	2,3	2,9	0,8
	T-----	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	2,2	2,3	2,2	0,1
	TGG-----GCCTT	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	1,7	1,6	1,6	0,1
	TGGTGAA-----	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	1	1,2	1,1	0,1
	TGGTGAAA-----	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	1,3	0,9	1,1	0,3
175	TGGTGAA--	TGGTGAAA	1,1	0,9	1	0,1

	CGAGGGGCCTT	ACGAGGGG CCTT				
	-----CCTT	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	1,2	0,8	1	0,3
	-----TT	TGGTGAAA ACGAGGGG CCTT	0,7	1,1	0,9	0,3

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а PAM указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Таблица 18. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA TET2-экзон_6-BG5

Эталонная целевая последовательность ^a : <u>GCTCACCAATCGC(CGG)TGTG</u> (SEQ ID NO: 176)						
SEQ ID NO:	Генетически отредактированная последовательность ^b	Эталонная последовательность ^c (SEQ ID NO: 176)	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
	----- CGCCGGTGTG	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	20,8	22	21,4	0,8
177	GCTCACCAA- CGCCGGTGTG	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	7,3	8,2	7,8	0,6
178	GCTCACCAAT TCGCCGGTGT G	GCTCACCAA- TCGCCGGTGT G	6,1	7,4	6,8	0,9
179	GCTCACCA-- CGCCGGTGTG	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	4,3	5,6	4,9	0,9

	----- CGGTGTG	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	5,8	3,5	4,6	1,6
180	GCTCA----- CCGGTGTG	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	3,6	3,8	3,7	0,1
181	GCTCACC--- CGCCGGTGTG	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	2,3	2,2	2,2	0,1
	----- GCCGGTGTG	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	2,2	1,7	2	0,4
182	GCTCAC---- CGCCGGTGTG	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	2,3	1,5	1,9	0,6
	-----G	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	2,1	1,4	1,8	0,5
183	GCTCACCAAT ACGCCGGTGT G	GCTCACCAAT- CGCCGGTGTG	2	1,4	1,7	0,4
184	GCTCA----- CGCCGGTGTG	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	1,3	1,8	1,6	0,4
185	GCTCACCAAT GCGCCGGTGT G	GCTCACCAAT- CGCCGGTGTG	1,1	1,9	1,5	0,6
	-----	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	2	0,9	1,4	0,8
	GCTCA----- ---	GCTCACCAAT CGCCGGTGTG	1,2	0,8	1	0,3
186	GCTCACCAAT CCGCCGGTGT G	GCTCACCAAT- CGCCGGTGTG	1,2	0,5	0,8	0,5
187	GCTCACCAAT TCAAGGCACG CCGGTGTG	GCTCACCAAT- ----- CGCCGGTGTG	1,1	0	0,6	0,8

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а PAM указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Таблица 19. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA TET2-экзон 5-T1

Эталонная целевая последовательность ^a : CCTATTGCTAAGT(GGG)TAAG (SEQ ID NO: 188)						
SEQ ID NO:	Генетически отредактированная последовательность ^b	Эталонная последовательность ^c (SEQ ID NO: 188)	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
189	CCTATTGCT-AGTGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTGGTAAG	10,1	9,6	9,8	0,4
190	CCTATTGCTAAGTGGGTAA G	CCTATTGCT-AAGTGGGTAAG	7,4	9,3	8,4	1,3
191	CCTAT----- TGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTGGTAAG	6,9	6	6,4	0,6
	-----	CCTATTGCTAAGTGGTAAG	4,1	5,8	4,9	1,2
	----- AGTGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTGGTAAG	4	4,8	4,4	0,6
	----- GGGTAAG	CCTATTGCTAAGTGGTAAG	3,7	2,2	3	1,1
192	CCTATTGC--AGTGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTGGTAAG	2,3	1,8	2	0,4
	----- GTAAG	CCTATTGCTAAGTGGTAAG	1,9	1,9	1,9	0
	CCTATTGCTA- -----	CCTATTGCTAAGTGGTAAG	1,1	2	1,6	0,6
193	C-----	CCTATTGCTAAGTGGTAAG	1,3	1,8	1,6	0,4

	AGTGGGTAAG	GGTAAG				
	----- GGTAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,4	1,5	1,4	0,1
194	CCTATTGC----- ---TAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,5	1,4	1,4	0,1
195	CCTATTGCTA TAGTGGGTAA G	CCTATTGCTA- AGTGGGTAAG	1,4	1,3	1,4	0,1
	CCTAT----- ----	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,1	1,5	1,3	0,3
196	CCTATTG--- AGTGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,2	1,2	1,2	0
	----- TGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	0,9	1,4	1,2	0,4
197	CC----- AGTGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,2	1,2	1,2	0
	----- GTGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,8	0,7	1,2	0,8
198	CCTATT----- GTGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,5	0,8	1,2	0,5
199	CCT----- AGTGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1	1,3	1,2	0,2
200	CCTAT----- AGTGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,2	1	1,1	0,1
	CCTA----- ---	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	0,7	1,2	1	0,4
201	CCTATTGCTA- -TGGGTAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,3	0,7	1	0,4
	CC----- TAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	0,9	1,2	1	0,2
202	CCTATTGCTA CAGTGGGTAA G	CCTATTGCTA- AGTGGGTAAG	0,9	1,1	1	0,1
	-----	CCTATTGCTAAGTG	1,1	0,8	1	0,2

	AAGTGGGTAA G	GGTAAG				
203	CCTATTGCTA- -----TAAG	CCTATTGCTAAGTG GGTAAG	1,2	0,5	0,8	0,5

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а РАМ указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Таблица 20. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA TET2-экзон 5-T2

Эталонная целевая последовательность ^a : <u>TCCTATTGCTAAG(TGG)GTAA</u> (SEQ ID NO:204)						
SEQ ID NO:	Генетически отредактированная последовательность ^b	Эталонная последовательность ^c (SEQ ID NO: 204)	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
205	TCCTATTGCTTAAGT GGGTAA	TCCTATTGC - TAAGTGGG TAA	60,7	67,1	63,9	4,5
206	TCCTAT--- TAAGTGGGTAA	TCCTATTGC TAAGTGGG TAA	2,5	1,7	2,1	0,6
	-----GGGTAA	TCCTATTGC TAAGTGGG TAA	2,6	1,5	2	0,8
207	TCCTATTGC- AAGTGGGTAA	TCCTATTGC TAAGTGGG TAA	2,1	1,5	1,8	0,4

	-----	TCCTATTGC TAAGTGGG TAA	1,9	1,8	1,8	0,1
208	TCCTATTG- TAAGTGGGTAA	TCCTATTGC TAAGTGGG TAA	1,6	1,5	1,6	0,1
209	TCCTAT----- TGGGTAA	TCCTATTGC TAAGTGGG TAA	1,7	1	1,4	0,5

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а PAM указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Таблица 21. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA TET2-экзон_4-BG4

Эталонная целевая последовательность ^a : <u>ACCTGCTCCTAG</u> (TGG)GTAT (SEQ ID NO: 210)						
SEQ ID NO:	Генетически отредактированная последовательность ^b	Эталонная последовательность ^c (SEQ ID NO: 210)	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
211	ACCTGCTCCTTAGAT GGGTAT	ACCTGCTCC T- AGATGGGT AT	48,4	51,3	49,8	2,1
	ACCT-----	ACCTGCTCC TAGATGGG TAT	8,6	6,4	7,5	1,6
212	ACCTGCTCC-	ACCTGCTCC	3,8	3,3	3,6	0,4

	AGATGGGTAT	TAGATGGGTAT				
213	ACCTGCT--- AGATGGGTAT	ACCTGCTCC TAGATGGGTAT	2,7	3,5	3,1	0,6
	ACCTG-----GGTAT	ACCTGCTCC TAGATGGGTAT	2,4	2,2	2,3	0,1
	-----	ACCTGCTCC TAGATGGGTAT	2,2	2	2,1	0,1
214	ACCTGCTC- TAGATGGGTAT	ACCTGCTCC TAGATGGGTAT	1,7	1	1,4	0,5
	A-----TGGGTAT	ACCTGCTCC TAGATGGGTAT	1,2	1,3	1,2	0,1
215	ACCTG---- TAGATGGGTAT	ACCTGCTCC TAGATGGGTAT	1,5	0,7	1,1	0,6
216	ACCTGCTCCTA-- TGGGTAT	ACCTGCTCC TAGATGGGTAT	1,1	0,7	0,9	0,3

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а РАМ указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Пример 8. Нокаут TET2 в Т-клетках с CAR к BCMA обеспечивает преимущество в отношении роста и обогащение Т-клетками с CAR

В терапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) применяются генетически сконструированные Т-клетки для нацеливания на раковые клетки и их уничтожения более специфическим и эффективным образом. После сбора Т-

клеток из крови их конструируют с возможностью размещения CAR на их поверхности. CAR можно вводить в Т-клетки с использованием технологии редактирования генов CRISPR/Cas9. Когда эти аллогенные Т-клетки с CAR вводят путем инъекции пациенту, рецепторы позволяют Т-клеткам уничтожать раковые клетки.

В данном примере дополнительно исследуются преимущественные признаки, получаемые в результате нокаута TET2 посредством редактирования генов Т-клеток с CAR, например, с помощью нескольких циклов стимуляции антигеном-мишенью.

(I) *Получение Т-клеток с CAR к BCMA с KO TET2 (TET2-) или TET2 дикого типа (TET2+)*

Активированные первичные Т-клетки человека электропорировали (EP1) с помощью 1 комплекса RNP Cas9:sgRNA TET2 для получения поликлональной популяции с KO TET2. 72 часа спустя данные клетки или активированные первичные Т-клетки дикого типа (WT) электропорировали снова (EP2) с помощью комплексов RNP Cas9:gRNA (RNP) и аденоассоциированных аденовирусных векторов (AAV) для получения Т-клеток TET2-/TRAC-/β2M-/CAR+ к BCMA (TET2-/CAR к BCMA) или TRAC-/β2M-/CAR+ к BCMA (TET2+/CAR к BCMA). Получали две контрольные группы, где либо AAV, либо RNP исключали из процедуры EP2 (TET2-/AAV- и TET2-/RNP-соответственно). Рекombинантный AAV серотипа 6 (AAV6), содержащий одну из нуклеотидных последовательностей, кодирующих CAR к BCMA (SEQ ID NO: 149), доставляли с помощью RNP Cas9:sgRNA (1 мкМ Cas9, 5 мкМ gRNA) в активированные аллогенные человеческие Т-клетки. Использовали следующие sgRNA: TET2 (SEQ ID NO: 13), TRAC (SEQ ID NO: 93) и β2M (SEQ ID NO: 97).

Приблизительно через одну (1) неделю после электропорации (EP1) клетки оценивали в отношении нокаута белка TET2 с помощью автоматизированного вестерн-блоттинга (WesTM, Proteinsimple) с применением поликлонального антитела к TET2 (Diagenode, № C15410255-100) при разведении 1:500. Результаты, полученные из данного анализа, подтверждают отсутствие выявленного TET2 в Т-клетках с CAR к BCMA с KO TET2 (TET2-), в то время как экспрессию TET2 выявляли в контрольных клетках и в Т-клетках с CAR к BCMA с TET2 дикого типа (TET2+).

В день 9 после EP2 клетки также обрабатывали для проведения проточной цитометрии с целью оценки уровней нокаута TRAC и β2M, а также уровней экспрессии CAR к BCMA на клеточной поверхности в популяции отредактированных клеток. Клетки окрашивали с использованием панели антител, указанных в **таблице 22** ниже.

Таблица 22. Панель антител для выявления поверхностных белков Т-клеток с CAR

Антитело	Источник	Флуоресцентный краситель	Разведение
IgG, специфичное в отношении фрагмента	Jackson Immuno-research, № 109-006-097	Биотинилированный; выявление осуществляют с	1:20

F(ab') ₂		помощью SA-APC	
TCRαβ	Miltenyi, № 130-099-661	PE	1:100
β2M	Biolegend, № 316318	PECy7	1:100
CD8	Biolegend, № 344742	BV605	1:100
CD4	Biolegend, № 300546	BV510	1:100
Стрептавидин-APC (SA-APC)	ThermoFisher (eBioscience), № 17-4317-82	APC	1:100
7-AAD	BD Biosciences, 559925	Диапазон PerCP	1:500

Результаты показаны в **таблице 23** ниже. Для всех Т-клеток с CAR к BCMA и контрольных клеток TRAC-/β2M- (TET2-/AAV-) более 85% жизнеспособных клеток не экспрессировали TCR и более 74% не экспрессировали β2M, при этом 72% популяций Т-клеток с CAR к BCMA характеризовались и тем и другим из TRAC-/β2M-. Живые Т-клетки с CAR гейтировали по их профилям прямого светорассеяния (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) и с использованием красителя 7-AAD.

Таблица 23. Процент популяций, являющихся положительными по поверхностной экспрессии CAR к BCMA и нокдауну TRAC/β2M через 9 дней после EP2

Образец	% положительных по CAR к BCMA	TRAC-	β2M-	TRAC-β2M-
Т-клетки TET2-/CAR к BCMA	34,80%	89,50%	81,90%	74,70%
Т-клетки TET2+/CAR к BCMA	41,30%	85,00%	83,20%	72,30%
TET2-/AAV-	0,11%	84,90%	74,70%	63,80%
TET2-/RNP-	0,62%	11,27%	0,18%	0,07%

(II). *Стимуляция антигеном Т-клеток с CAR к BCMA с KO TET2 (TET2-) или TET2 WT (TET2+)*

Различные популяции клеток экспандировали в течение недели после определения экспрессии CAR. 1 миллион клеток каждой популяции Т-клеток с CAR (Т-клетки TET2-/CAR к BCMA, Т-клетки TET2+/CAR к BCMA, TET2-/AAV- и TET2-/RNP-) затем совместно культивировали с линией клеток-мишеней MM.1S при соотношении Е:Т 1:1 в трех повторностях в 12-луночной планшете для культуры ткани в полной среде для Т-клеток и инкубировали при 37°C в течение 48 часов (цикл стимуляции 1) или 72 часов (циклы стимуляции 2 и 3), что является достаточным периодом времени, предварительно заданным для того, чтобы убедиться, что все клетки-мишени были уничтожены совместно

культивируемыми Т-клетками с CAR. Всего проводили 3 цикла стимуляции, где после каждой стимуляции Т-клетки с CAR собирали, промывали, подсчитывали с использованием трипанового синего (для оценки жизнеспособности) и повторно высевали в количестве 1 миллион клеток/лунка совместно со свежими клетками-мишенями при Е:Т, составляющем 1:1, в трех повторностях. Кроме того, часть клеток оценивали в отношении экспрессии CAR в Т-клетках посредством FACS с применением панели антител, указанных в **таблице 24** ниже. После 3 циклов стимуляции Т-клетки с CAR собирали и экспандировали для отслеживания роста и % жизнеспособности, а также периодической оценки посредством FACS поверхностной экспрессии CAR с применением панели антител, указанных в **таблице 24**.

Таблица 24. Панель антител для выявления поверхностных белков Т-клеток с CAR

Антитело	Источник	Флуоресцентный краситель	Разведение
CAR к BCMA	US63/069889	APC	1:100
CD8	Biolegend, № 344742	BV605	1:100
CD4	Biolegend, № 300546	BV510	1:100
CD57	BioLegend, № 322306	FITC	1:100
Lag3	BioLegend, № 369310	PE-Cy7	1:100
CD45RA	BioLegend, № 304128	APC-Cy7	1:100
CCR7	BioLegend, № 353210	PacBlue	1:100
PD1	BioLegend, № 329906	PE	1:100
7-AAD	BD Biosciences, № 559925	Диапазон PerCP	1:500

Результаты длительного культивирования этих популяций Т-клеток с CAR к BCMA указывают на то, что нокаут TET2 в Т-клетках обеспечивает пролиферативное преимущество для Т-клеток с CAR, которых стимулировали с помощью линии клеток-мишеней (**фиг. 8А**), без значимой разницы в общей жизнеспособности (**фиг. 8В**). Кроме того, наблюдали преимущественное обогащение клеток с КО TET2 Т-клетками, положительными по CAR к BCMA, по сравнению с Т-клетками TET2+/CAR к BCMA или нестимулированными клетками (**фиг. 8С**).

(III). Сравнение функциональных признаков между Т-клетками с CAR к BCMA с КО TET2 (Т-клетки TET2-/CAR к BCMA) и Т-клетками с CAR к BCMA с TET2 WT (Т-клетки TET2+/CAR к BCMA)

Функциональную активность Т-клеток с CAR к BCMA (о чем свидетельствует секреция эффекторных цитокинов) оценивали с применением анализов высвобождения цитокинов применительно к интерферону гамма (IFN γ) после каждого цикла стимуляции клетками-мишенями. После упомянутых выше периодов совместного культивирования

собирали надосадочную среду из совместно культивированных клеток и измеряли уровни IFN γ с применением ELISA (RD Systems), следуя инструкциям производителя. Набор MILLIPLEX (Millipore, каталожный № HCYTOMAG-60K) с применением магнитных микросфер HCYIFNG-MAG (Millipore, каталожный № HCYIFNG-MAG) применяли для количественного определения секреции IFN- γ в образцах из анализа стимуляции совместного культивирования. Анализ проводили, следуя протоколу производителя.

Вкратце, восстанавливали образцы, соответствующие стандарту MILLIPLEX[®] и предназначенные для контроля качества (QC), и получали серийные разведения рабочих стандартов в диапазоне от 10000 пг/мл до 3,2 пг/мл. Стандарты MILLIPLEX[®], QC и клеточные супернатанты вносили в каждый планшет, и среду для анализа применяли для разведения супернатантов. Все образцы инкубировали с гранулами HCYIFNG-MAG в течение 2 часов. После инкубации планшет промывали с использованием автоматизированного магнитного устройства для отмывки планшетов. Раствор антител для обнаружения цитокинов/хемокинов человека вносили в каждую лунку и инкубировали в течение 1 часа с последующей инкубацией со стрептавидино-фикоэритрином в течение 30 минут. Затем планшет промывали, образцы ресуспендировали со 150 мкл проточной жидкости и встряхивали на планшетном шейкере в течение 5 минут. Проводимое в отношении образцов считывание данных выполняли с использованием прибора Luminescence[®] 100/200[™] с программным обеспечением xPONENT[®], и получение и анализ данных завершали с использованием программного обеспечения MILLIPLEX[®] Analyst. Данные относительно медианной интенсивности флуоресценции (MFI) анализируют автоматически с применением способа с подбором 5-параметрической логистической кривой для расчета концентрации цитокинов, измеряемой в неизвестных образцах.

Результаты демонстрировали, что не имелось значимой разницы в секреции IFN γ в Т-клетках с CAR к BCMA с КО TET2 или без него после нескольких циклов стимуляции линии клеток-мишеней в данных условиях (**фиг. 8D**). Контрольные клетки TCR-/ β 2M- (AAV-отрицательные) и не подвергавшиеся редактированию клетки с CAR (RNP-отрицательные) не демонстрировали значительного или специфического ответа в виде секреции IFN γ в присутствии клеток MM1S.

В целом, исследования, описанные выше, демонстрируют, что (a) Т-клетки с CAR с КО TET2 (Т-клетки TET2-/CAR к BCMA) демонстрировали преимущество в отношении роста по сравнению с Т-клетками с CAR к BCMA с TET2 WT (Т-клетки TET2+/CAR к BCMA) после стимуляции антигеном MM1S; (b) Т-клетки с CAR к BCMA с КО TET2 демонстрировали обогащение положительными по CAR к BCMA клетками по сравнению с Т-клетками с CAR к BCMA с TET2 WT после стимуляции антигеном; и (c) КО TET2 не изменял функциональной активности Т-клеток с CAR к BCMA (секреции IFN γ) по сравнению с Т-клетками с CAR к BCMA с TET2 WT при нескольких процедурах стимуляции антигеном. Данные результаты демонстрировали, что конструирование с обеспечением нокаута TET2 в Т-клетках с CAR (с применением Т-клеток с CAR к BCMA

в качестве приводимого здесь примера) обеспечивает как преимущество в отношении роста, так и эффект обогащения Т-клетками с CAR. Это обеспечивает концептуальное доказательство того, что усиление пролиферации Т-клеток с CAR *in vitro* посредством редактирования генов является осуществимым, и его можно применять для получения банка клеток, способного обеспечивать более высокий выход Т-клеток с CAR без ущерба для функции.

Пример 9. Целевое и нецелевое редактирование, обеспечиваемое направляющими РНК для FAS

Показатели эффективности целевого и нецелевого редактирования, обеспечиваемого различными gRNA, нацеливающимися на FAS, исследовали в отношении трех направляющих последовательностей, демонстрирующих самую высокую эффективность редактирования гена, которые представляли собой FAS-ex2-T2, FAS-ex3_T1, FAS-ex3_T2 (см. **фиг. 2А**). Вкратце, активированные Т-клетки, полученные из первичных клеток РВМС человека, трансфицировали (электропорировали) с помощью рибонуклеопротеиновой частицы (RNP), содержащей нуклеазу Cas9 и синтетическую модифицированную sgRNA, нацеливающуюся на ген FAS (последовательности в **таблице 5** выше), или получали в качестве необработанных контролей (без электропорации, без Cas9, без gRNA).

Для оценки целевого и нецелевого редактирования генома применяли такие же методы электропорации для получения двух клеточных популяций отредактированных клеток, полученных из Т-клеток от двух разных доноров (называемых 1 и 2). Клетки подвергали редактированию генов с помощью трех из наилучших направляющих последовательностей, перечисленных в **таблице 5**, а затем собирали через десять (10) дней после трансфекции. Данные образцы анализировали с помощью гибридного захвата, зависящего от гомологии способа, для обогащения целевыми и нецелевыми сайтами в сочетании с секвенированием следующего поколения. Вкратце, целевые и нецелевые сайты с гомологией по отношению к каждому целевому сайту gRNA определяли путем вычислений, зонды на основе односторонней ДНК применяли для обогащения данными сайтами из общего количества геномной ДНК, данные подвергнутые обогащению сайты секвенировали посредством секвенирования следующего поколения, и данные анализировали в отношении вставок и делеций, указывающих на репарацию, произошедшую после CRISPR-опосредованного редактирования.

Результаты представлены в **таблице 25** ниже.

Таблица 25. Результаты анализа посредством гибридного захвата для целевого и нецелевого редактирования

Направляющая последовательность	Целевая последовательность gRNA + (PAM)	Количество протестированных предсказанных нецелевых сайтов	Среднее значение для целевого	Выявленные нецелевые сайты
---------------------------------	---	--	-------------------------------	----------------------------

			редактирования, гипр. захв. (%)^a	
FAS-ex2_T2	CACTTGGGCATTAACA TT (TGG) (SEQ ID NO: 88)	172	98,6	Один межгенный с 1,1%, один нецелевой с 0,6%
FAS-ex3_T1	CTAGGGACTGCACAGTC AAT (GGG) (SEQ ID NO: 90)	146	95,3	Отсутствуют
FAS-ex3_T2	ACTGCGTGCCCTGCCAAG AA (GGG) (SEQ ID NO: 91)	111	99,2	Отсутствуют

^aСреднее по донорам 1 и 2.

Анализ профилей направленных инсерционно-делеционных мутаций в Т-клетках

Данные, используемые для количественного определения целевого редактирования, также применяли для количественного определения и обобщения наиболее частых целевых инсерционно-делеционных мутаций для всех направляющих последовательностей для FAS, перечисленных в **таблице 25**. Эти данные получали из результатов анализа гибридного захвата в отношении локуса FAS в сочетании с секвенированием следующего поколения для двух доноров (называемых донор 1 и донор 2).

После редактирования генов проведение анализа гибридного захвата для локуса FAS в популяции Т-клеток после редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9 с получением Т-клеток FAS- обеспечивало получение результатов относительно значений частоты специфических инсерционно-делеционных мутаций и генетически отредактированных последовательностей в локусе FAS (**таблицы 26-28**; делеции представлены в виде тире, а вставки выделены жирным шрифтом).

В целях количественного определения для отдельной последовательности, проводимого на основе данных по гибриднему захвату, считанные последовательности, выравненные по целевому сайту FAS, на 20 п. о. выше и ниже сайта разрезания, выбирали и рассматривали с целью количественного определения инсерционно-делеционных последовательностей. Из выбранных считанных последовательностей последовательность в пределах 10 п. о. выше и ниже каждого предполагаемого сайта разрезания (~3 п. о. выше PAM (Jinek, et al., Science 2012)) количественно определяли в качестве репрезентативной области целевого редактирования с негомологичным соединением концов (NHEJ). Данные в отношении этих целевых генетически отредактированных последовательностей

представлены в таблицах ниже, при этом значения частоты для этих последовательностей демонстрируют процент всех последовательностей, охватывающих целевой сайт в пределах 20 п. о. выше и ниже каждого сайта разрезания. Инсерционно-делеционные мутации для каждой направляющей последовательности показаны относительно целевой эталонной последовательности в таблицах 22-24. Эталонная последовательность центрирована по сайту расщепления, простираясь на 10 п. о. в каждом направлении, заканчиваясь 4 п. о. 3'-конца РАМ.

Таблица 26. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA FAS-экзон_2-T2

Эталонная целевая последовательность ^a : GCATTAACACTTT(TGG)ACGA (SEQ ID NO:217)						
SEQ ID NO:	Генетически отредактированная последовательность ^b	Эталонная последовательность ^c	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
218	GCATTAACACTTTTTTGGACGA	GCATTAACACTTTTGGACGA	43,3	40,4	41,8	2,1
219	GCATTAACACTTTTTTTGGACGA	GCATTAACACTTTT--GGACGA	19,6	18,1	18,8	1,1
	-----ACGA	GCATTAACACTTTTGGACGA	3,4	5,4	4,4	1,4
220	GCATTAACA-TTTTGGACGA	GCATTAACACTTTTGGACGA	3,7	4,4	4,1	0,5
	-----	GCATTAACACTTTTGGACGA	2,1	2,3	2,2	0,1
	GCATTAA-----	GCATTAACACTTTTGGACGA	2,0	1,8	1,9	0,1
	GCA-----	GCATTAAC	1,3	1,7	1,5	0,3

		ACTTTTGGACGA				
221	GCATTAACACTTTGGACGA	GCATTAACACTTTTGGACGA	1,4	1,3	1,4	0,1
222	GCATTA----TTTGGACGA	GCATTAACACTTTTGGACGA	1,1	1,6	1,4	0,4
223	GCATTAACACTTTTTTTGGACGA	GCATTAACACTTTT---GGACGA	1,4	1,1	1,2	0,2
224	GCATTAAC--TTTGGACGA	GCATTAACACTTTTGGACGA	1,0	1,2	1,1	0,1
	GCAT-----	GCATTAACACTTTTGGACGA	0,7	1,1	0,9	0,3

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а PAM указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Таблица 27. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA FAS-экзон_3-T1

Эталонная целевая последовательность ^a : CTGCACAGTCAAT(GGG)GATG (SEQ ID NO: 225)						
SEQ ID NO:	Генетически отредактированная последовательность ^b	Эталонная последовательность ^c	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
	-----	CTGCACAG	24,9	19,1	22,0	4,1

		TCAATGGG GATG				
226	CTGCACAGTCAAAT GGGGATG	CTGCACAG TC- AATGGGGA TG	5,6	7,1	6,4	1,1
227	CTGCACAGTCCAAT GGGGATG	CTGCACAG T- CAATGGGG ATG	5,1	4,2	4,6	0,6
	-----GGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	4,1	4,5	4,3	0,3
228	CTGCA---- CAATGGGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	3,8	4,0	3,9	0,1
229	CTGCACAGTC- ATGGGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	3,1	2,9	3,0	0,1
	CTGCA-----	CTGCACAG TCAATGGG GATG	2,8	3,2	3,0	0,3
230	CTGCACAGT- AATGGGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	2,5	3,3	2,9	0,6
231	CTGCACA--- AATGGGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	2,6	2,9	2,8	0,2
232	CTG----- CAATGGGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,8	2,1	2,0	0,2
	C-----TG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,9	2,0	2,0	0,1

	CTGC-----	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,8	1,7	1,8	0,1
233	CTGCACAG-- AATGGGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,1	2,5	1,8	1,0
	-----G	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,5	1,8	1,6	0,2
	-----GGGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,2	1,8	1,5	0,4
234	CTGCACAGTC-- TGGGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,4	1,3	1,4	0,1
	CTGCACAGT-----	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,0	1,5	1,2	0,4
235	CTGCACAGTC----- -	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,0	1,4	1,2	0,3
236	----- AATGGGGATG	CTGCACAG TCAATGGG GATG	1,1	0,7	0,9	0,3

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а PAM указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Таблица 28. Целевые генетически отредактированные последовательности, характеризующиеся частотой, превышающей 1%, для по меньшей мере одного донора генетически отредактированных Т-клеток при использовании gRNA FAS-экзон_3-T2

Эталонная целевая последовательность ^a : GCCCTGCCAAGAA(GGG)AAGG (SEQ ID NO: 237)						
SEQ ID NO:	Генетически отредактированная последовательность ^b	Эталонная последовательность ^c	Донор 1 (%)	Донор 2 (%)	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
238	GCCCTGCCAAGAA GGGAAGG	GCCCTGCC- AAGAAGGG AAGG	45,7	37,6	41,7	5,7
239	GCCCTGCC- AGAAGGGAAGG	GCCCTGCC AAGAAGGG AAGG	19,4	26,6	23,0	5,1
	-----	GCCCTGCC AAGAAGGG AAGG	9,6	9,2	9,4	0,3
	G-----	GCCCTGCC AAGAAGGG AAGG	1,1	1,4	1,2	0,2
240	GCCCTGCCAAAAGA AGGGAAGG	GCCCTGCC- - AAGAAGGG AAGG	1,2	0,9	1,0	0,2
241	GCCCT---- AGAAGGGAAGG	GCCCTGCC AAGAAGGG AAGG	0,5	1,1	0,8	0,4

^a Целевая последовательность, центрированная по сайту расщепления, простирающаяся на 10 п. о. в каждом направлении. Для сравнения часть целевой последовательности gRNA, выравненная по эталонной последовательности, подчеркнута, а PAM указан в скобках.

^b Делеции указаны с помощью тире (-); вставки указаны с помощью жирного шрифта.

^c Положения вставленных оснований в генетически отредактированной последовательности указаны с помощью тире (-) в эталонной последовательности

Пример 10. Получение линии аллогенных Т-клеток с CAR к CD19 человека

Спленоциты выделяли из организма 3 мышей, которым вводили дозу Т-клеток TRAC-/B2M-/FAS-/TET2-/CD70-, экспрессирующих CAR к CD19 (полученные из Т-

клеток периферической крови здорового донора-человека). У данных мышей поддерживался контроль лейкоза, индуцированного клетками Nalm6, в течение более 3 месяцев после инфузии. Выделенные спленциты культивировали в среде для Т-клеток человека, содержащей IL2/IL7 и сыворотку крови человека, и отслеживали случаи повышения количества клеток. Клетки из одного из изолятов мышинной селезенки демонстрировали повышение количества с течением времени (данные клетки обозначаются как выделенные клетки). Данные выделенные клетки составляли более 99% TRAC-/B2M-/CAR+ и характеризовались фенотипом CD4 наряду с высокой частотой инсерционно-делеционных мутаций в FAS, CD70, TET2 через 2 месяца культивирования. Более конкретно, анализ посредством FACS продемонстрировал, что в тестируемой популяции клеток 97,8% являлись живыми клетками, 99,1% являлись TCR и B2M-отрицательными, 99,1% являлись CAR-положительными и 99,8% являлись CD4-положительными.

Выделенные клетки сохраняли свою зависимость от человеческих цитокинов IL2 и IL7 (**фиг. 9А**). Данные клетки также сохраняли свою способность уничтожать CD19+ клетки (**фиг. 9В**) и дополнительно сохраняли функции, относящиеся к цитотоксичности и высвобождению цитокинов *in vitro* (**фиг. 9С** и **9D** соответственно). Затем осуществляли повторное введение путем инъекции выделенных клеток животным модели лейкоза, индуцированного клетками Nalm6, и они демонстрировали эффективность по сравнению со свежими Т-клетками TRAC-/B2M-/CAR к CD19. (**фиг. 9Е**).

После проведения данного второго цикла тестирования *in vivo* с использованием выделенных клеток клетки снова выделяли из организма 1 мыши и дополнительно культивировали/экспандировали в течение нескольких недель в содержащей цитокин среде. Данные повторно выделенные клетки сохраняли такой же фенотип, что и клетки, первоначально выделенные из организма *in vivo*. Повторно выделенные клетки применяли во втором эксперименте для оценки их способности контролировать лейкоз, индуцированный клетками Nalm6.

Данный пример свидетельствует о том, что устойчивые линии Т-клеток можно получать из Т-клеток периферической крови, полученных от нормального здорового донора (например, донора-человека), которые сохраняют функциональность *in vitro* и *in vivo* и характеризуются потенциалом выступать в качестве банка клеток и/или терапевтических клеток.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Все признаки, раскрытые в настоящем описании, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в настоящем описании, может быть заменен альтернативным признаком для той же, эквивалентной или сходной цели. Таким образом, если явно не указано иное, каждый раскрытый признак является только примером общего ряда эквивалентных или сходных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области может легко установить существенные характеристики настоящего изобретения и, не выходя за рамки

его сути и объема, может внести различные изменения и модификации настоящего изобретения для адаптации его к различным путям применения и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в пределах формулы изобретения.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя в данном документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалисты в данной области легко смогут представить множество других средств и/или структур для выполнения функции, и/или получения результатов, и/или одно или нескольких преимуществ, описанных в данном документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. В более общем плане специалисты в данной области легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или путей применения, при которых используются идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области поймут или смогут установить с применением не более чем стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в пределах прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления настоящего изобретения могут быть реализованы на практике иным образом, чем как конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления настоящего изобретения по настоящему раскрытию направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанные в данном документе. Кроме того, в объем настоящего изобретения по настоящему раскрытию включена любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несовместимыми.

Все определения, как определено и используется в данном документе, следует понимать как имеющие приоритет над определениями из словаря, определениями в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычными значениями определенных терминов.

Все ссылочные материалы, патенты и заявки на патенты, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении заявляемого объекта, для которого каждые из них цитируются, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Формы единственного числа, используемые в данном документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как "по меньшей мере один".

Фразу "и/или", используемую в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую "один или оба" из элементов, соединенных таким образом, т. е. элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других случаях присутствуют раздельно. Множественные элементы, перечисленные с помощью "и/или", следует толковать одинаково, т. е. "один или несколько" элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных союзом "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с открытой фразой, такой как "содержащий", может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления одновременно к А и В (необязательно включая другие элементы) и т. д.

Используемый в данном документе в описании и формуле изобретения союз "или" следует понимать как имеющий то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении пунктов в перечне союзы "или" или "и/или" следует интерпретировать как включающие, т. е. включающие по меньшей мере один, но также включающие более одного из числа или перечня элементов и необязательно дополнительные элементы, не внесенные в перечень. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как "только один из" или "ровно один из" или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из", будут относиться к включению ровно одного элемента из числа или перечня элементов. Как правило, термин "или", используемый в данном документе, следует интерпретировать только как указывающий на исключающие альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), если ему предшествуют термины исключительности, такие как "любой", "один из", "только один из" или "ровно один из". Термин "состоящий по сути из" при использовании в формуле изобретения имеет обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемую в данном документе в описании и в формуле изобретения фразу "по меньшей мере один" применительно к перечню из одного или нескольких элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любых одного или нескольких элементов в перечне элементов, но необязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Данное определение также допускает, что элементы могут необязательно присутствовать помимо элементов, конкретно обозначенных в перечне элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А или В" или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться в одном

варианте осуществления к по меньшей мере одному А, необязательно включая более одного, без присутствия В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления к по меньшей мере одному В, необязательно включая более одного, без присутствия А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления к по меньшей мере одному А, необязательно включая более одного, и к по меньшей мере одному В, необязательно включая более одного (и необязательно включая другие элементы), и т. д.

Также следует учитывать, что, если явно не указано иное, в любых заявляемых в данном документе способах, которые предусматривают более чем одну(одно) стадию или действие, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа упоминаются.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Популяция генетически сконструированных Т-клеток, содержащих:

- (i) нарушенный ген, участвующий в самообновлении клеток;
- (ii) нарушенный ген, участвующий в апоптозе;
- (iii) нарушенный ген, участвующий в регуляции истощения Т-клеток; или
- (iv) комбинацию любых из (i)-(iii);

где популяция генетически сконструированных Т-клеток по сравнению с аналогичными Т-клетками, не являющимися генетически сконструированными, характеризуется одним или несколькими из следующих признаков: (a) повышенной способностью к экспансии в культуре, (b) повышенной способностью к пролиферации, (c) сниженным уровнем апоптоза и (d) повышенной частотой активации.

2. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по п. 1, где Т-клетки содержат комбинацию из (i)-(iii).

3. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по п. 1 или п. 2, где (i) предусматривает TET2, и где необязательно генетически сконструированные Т-клетки не предусматривают (ii), (iii) или и того и другого.

4. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-3, где нарушенный *TET2* является генетически отредактированным по экзону, выбранному из группы, состоящей из экзона 1, экзона 3, экзона 4, экзона 5 и экзона 6 или их комбинации, при этом необязательно мутированный *TET2* является генетически отредактированным по экзону 3, экзону 4, экзону 5 или экзону 6.

5. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-4, где нарушенный ген TET2 является генетически отредактированным посредством CRISPR/Cas-опосредованного редактирования генов.

6. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по п. 5, где нарушенный ген *TET2* является генетически отредактированным посредством CRISPR/Cas-опосредованного редактирования генов с использованием направляющей РНК (gRNA), содержащей нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 14, 18, 22, 26, 112, 116 или 120.

7. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-6, где (ii) предусматривает FAS.

8. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-7, где (iii) предусматривает CD70.

9. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по п. 7 или п. 8, где нарушенные гены FAS и/или CD70 являются генетически отредактированными посредством CRISPR/Cas-опосредованного редактирования генов.

10. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по п. 9, где нарушенный ген FAS является генетически отредактированным посредством CRISPR/Cas-опосредованного редактирования генов с использованием направляющей РНК (gRNA), содержащей нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 69, 73, 77, 81 или 85,

и/или где нарушенный ген CD70 является генетически отредактированным посредством CRISPR/Cas-опосредованного редактирования генов с использованием gRNA, содержащей нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 34, 38, 42, 46, 50, 54 или 58.

11. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-10, где Т-клетки дополнительно предусматривают нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).

12. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-11, где Т-клетки дополнительно предусматривают нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

13. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-12, где Т-клетки подвергнуты дополнительному конструированию с обеспечением экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR).

14. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по п. 13, где CAR нацеливается на опухолевый антиген.

15. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по п. 14, где опухолевый антиген представляет собой CD19, антиген созреваия В-клеток (BCMA) или CD70.

16. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 13-15, где Т-клетки содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, и где нуклеиновая кислота вставлена в геном Т-клеток.

17. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по п. 16, где нарушенный ген TRAC характеризуется вставкой нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор.

18. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-17, где Т-клетки получены из первичных Т-клеток от одного или нескольких доноров-людей.

19. Популяция генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-18, где Т-клетки демонстрируют цитокин-зависимый рост.

20. Способ получения популяции генетически сконструированных Т-клеток по любому из пп. 1-10, при этом способ включает:

(а) обеспечение совокупности клеток, которые представляют собой Т-клетки или их клетки-предшественники;

(b) генетическое редактирование одного или нескольких генов, указанных в (i)-(iii);
и

(с) получение популяции генетически сконструированных Т-клеток.

21. Способ по п. 20, где стадию (b) осуществляют путем доставки по отношению к совокупности клеток РНК-направляемой нуклеазы и одной или нескольких gRNA, нацеливающихся на один или несколько генов, указанных в (i)-(iii).

22. Способ по п. 21, где (i) предусматривает *TET2*, и где необязательно gRNA, нацеливающаяся на *TET2*, является специфичной в отношении экзона гена *TET2*, выбранного из группы, состоящей из экзона 1, экзона 3, экзона 4, экзона 5 и экзона 6.

23. Способ по п. 22, где направляющая РНК (gRNA), нацеливающаяся на *TET2*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 14, 18, 22, 26, 112, 116 или 120.

24. Способ по любому из пп. 20-23, где (ii) предусматривает FAS.

25. Способ по любому из пп. 20-24, где (iii) предусматривает CD70.

26. Способ по п. 24 или п. 25, где gRNA, нацеливающаяся на FAS, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 69, 73, 77, 81 или 85, и/или где gRNA, нацеливающаяся на ген CD70, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 34, 38, 42, 46, 50, 54 или 58.

27. Способ по любому из пп. 20-26, где клетки из стадии (a) представляют собой первичные Т-клетки от одного или нескольких доноров-людей.

28. Способ по любому из пп. 20-27, где на стадии (b) gRNA, нацеливающиеся на комбинацию из (i)-(iii), доставляют по отношению к клеткам.

29. Способ по любому из пп. 20-28, где на стадии (b) РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9.

30. Способ по п. 29, где нуклеаза Cas9 представляет собой нуклеазу Cas9 из *S. pyogenes*.

31. Способ по любому из пп. 20-30, где РНК-направляемая нуклеаза и одна или несколько gRNA объединены в комплекс с образованием рибонуклеопротеиновой частицы (RNP).

32. Способ по любому из пп. 20-31, где стадию (b) осуществляют посредством одной процедуры электропорации.

33. Способ по любому из пп. 20-32, где стадию (b) осуществляют посредством двух последовательных процедур электропорации.

34. Способ получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), при этом способ включает:

(a) обеспечение совокупности Т-клеток из банка клеток, предусматривающей генетически сконструированные Т-клетки, указанные в любом из пп. 1-10;

(b) доставку по отношению к совокупности Т-клеток нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR; и

(c) получение генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR.

35. Способ по п. 34, где генетически сконструированные Т-клетки из банка клеток дополнительно предусматривают нарушенный ген $\beta 2M$.

36. Способ по п. 34, где способ дополнительно включает генетическое редактирование гена $\beta 2M$.

37. Способ по п. 36, где стадия генетического редактирования включает доставку по отношению к совокупности Т-клеток gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$.

38. Способ по любому из пп. 34-37, где генетически сконструированные Т-клетки из банка клеток дополнительно предусматривают нарушенный ген TRAC.

39. Способ по любому из пп. 34-38, где способ дополнительно включает генетическое редактирование гена TRAC.

40. Способ по любому из пп. 34-39, где генетически сконструированные Т-клетки из банка клеток получены из первичных Т-клеток от одного или нескольких доноров-людей.

41. Способ по любому из пп. 34-40, где РНК-направляемую нуклеазу доставляют по отношению к Т-клеткам.

42. Способ по п. 41, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9.

43. Способ по п. 42, где нуклеаза Cas9 представляет собой нуклеазу Cas9 из *S. pyogenes*.

44. Способ по любому из пп. 41-43, где РНК-направляемая нуклеаза и gRNA объединены в комплекс с образованием рибонуклеопротеиновой частицы (RNP).

45. Генетически сконструированная популяция Т-клеток, полученная посредством способа по любому из пп. 20-44.

46. Способ устранения нежелательных клеток у субъекта, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор, нацеливающийся на нежелательные клетки, при этом Т-клетки указаны в любом из пп. 1-19 и п. 45.

47. Способ по п. 46, где нежелательные клетки представляют собой раковые клетки.

48. Направляющая РНК (gRNA), нацеливающаяся на ген *TET2*, содержащая нуклеотидную последовательность, специфичную в отношении экзона 3 или экзона 5 гена *TET2*.

49. gRNA по п. 48, где gRNA содержит нуклеотидную последовательность, специфичную в отношении экзона 5.

50. gRNA по п. 49, где нуклеотидная последовательность нацеливается на сайт GGGATGTCCTATTGCTAAGT (SEQ ID NO: 125) или AGGGATGTCCTATTGCTAAG (SEQ ID NO: 126) в экзоне 5 гена *TET2*.

51. gRNA по п. 50, где нуклеотидная последовательность предусматривает SEQ ID NO: 18 или 22.

52. gRNA по п. 48, где gRNA содержит нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на экзон 3 гена *TET2*.

53. gRNA по п. 52, где нуклеотидная последовательность нацеливается на GATTCCGCTTGGTGAAAACG (SEQ ID NO: 129), CAGGACTCACACGACTATTC (SEQ ID NO: 131) или TTCCGCTTGGTGAAAACGAG (SEQ ID NO: 133) в экзоне 3 гена *TET2*.

54. gRNA по п. 53, где gRNA содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 112, 116 или 120.

55. gRNA по п. 48, где gRNA содержит нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на экзон 4 гена *TET2*.

56. gRNA по п. 55, где нуклеотидная последовательность нацеливается на CATTAGGACCTGCTCCTAGA (SEQ ID NO: 124) в экзоне 4 гена *TET2*.

57. gRNA по п. 56, где gRNA содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 14.

58. gRNA по п. 48, где gRNA содержит нуклеотидную последовательность, нацеливающуюся на экзон 6 гена *TET2*.

59. gRNA по п. 58, где нуклеотидная последовательность нацеливается на ACGGCACGCTCACCAATCGC (SEQ ID NO: 127) в экзоне 6 гена *TET2*.

60. gRNA по п. 59, где gRNA содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26.

61. gRNA по любому из пп. 48-60, где gRNA дополнительно содержит каркасную последовательность.

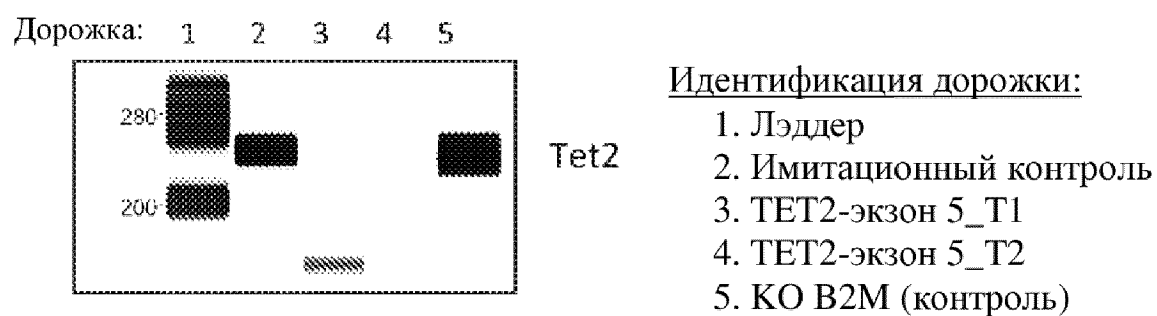
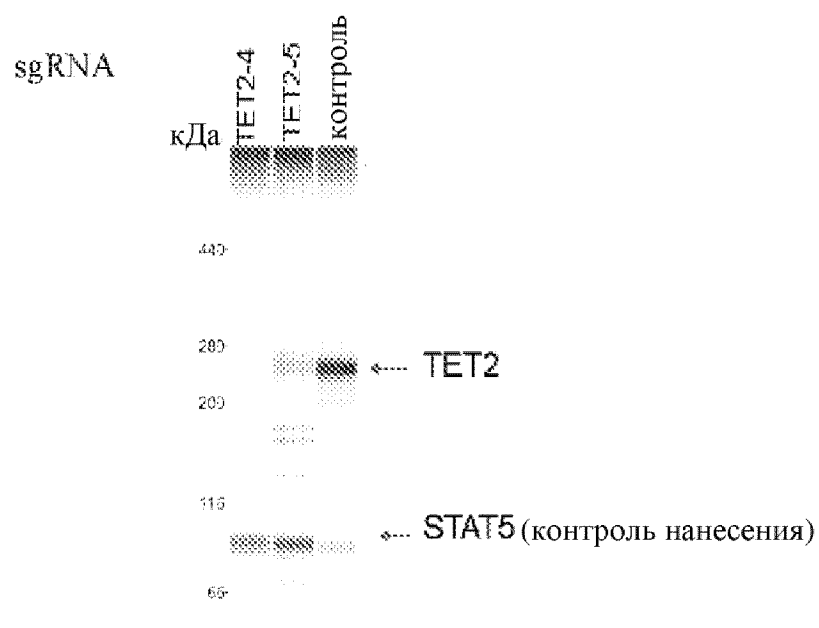
62. gRNA по любому из пп. 48-61, где gRNA содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов.

63. gRNA по п. 62, где gRNA содержит один или несколько 2'-О-метилфосфотиоатных остатков на 5'- и/или 3'-конце gRNA.

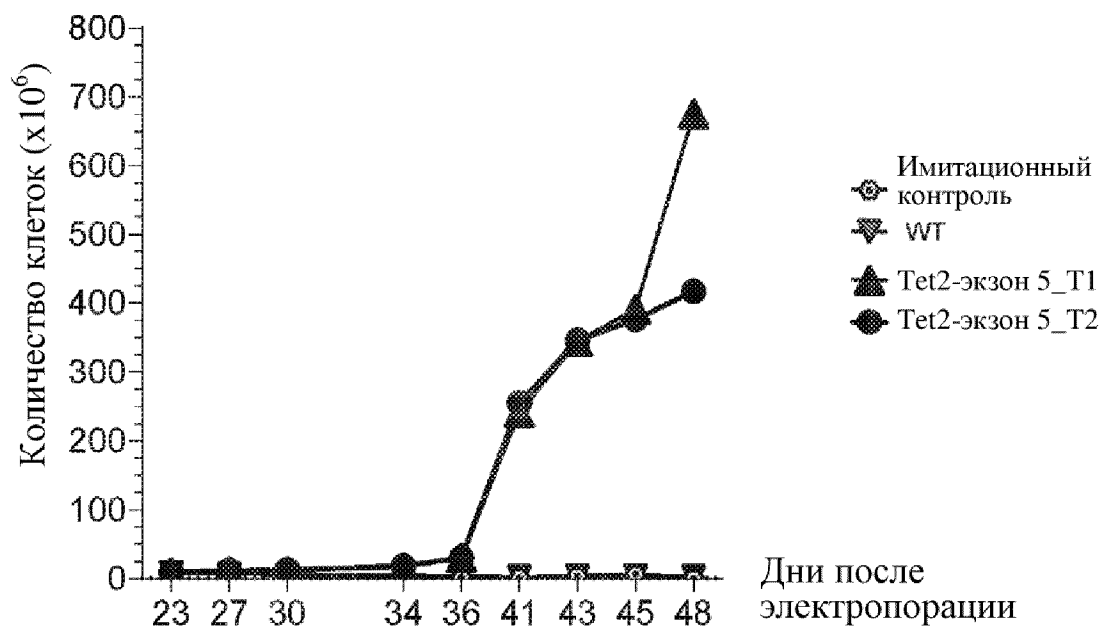
64. gRNA по любому из пп. 61-63, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 12, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 25, 114, 115, 118, 119, 122 или 123.

По доверенности

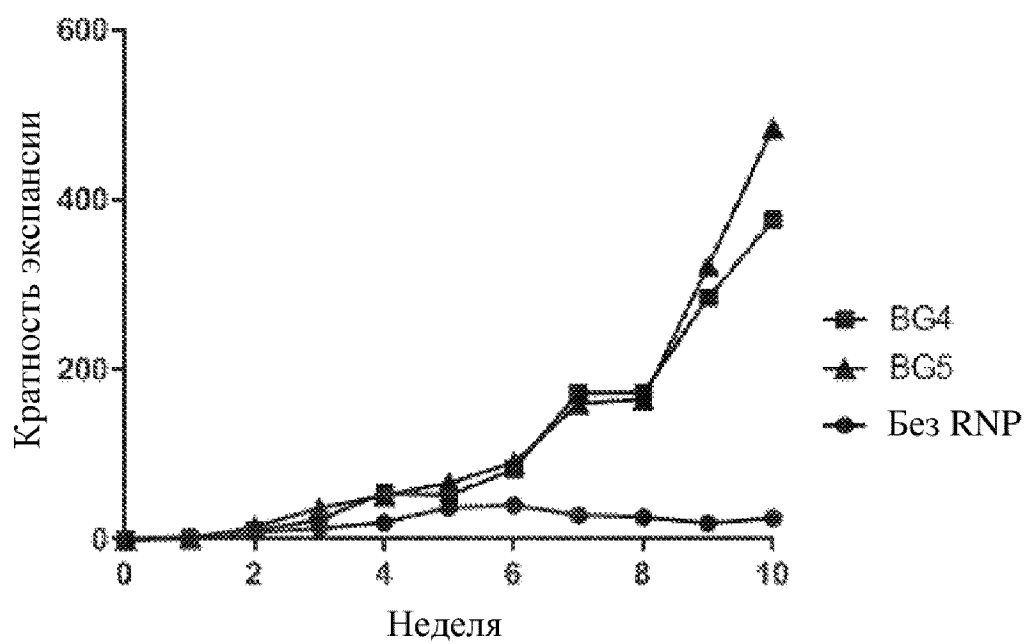
1/15

ФИГ. 1А**ФИГ. 1В**

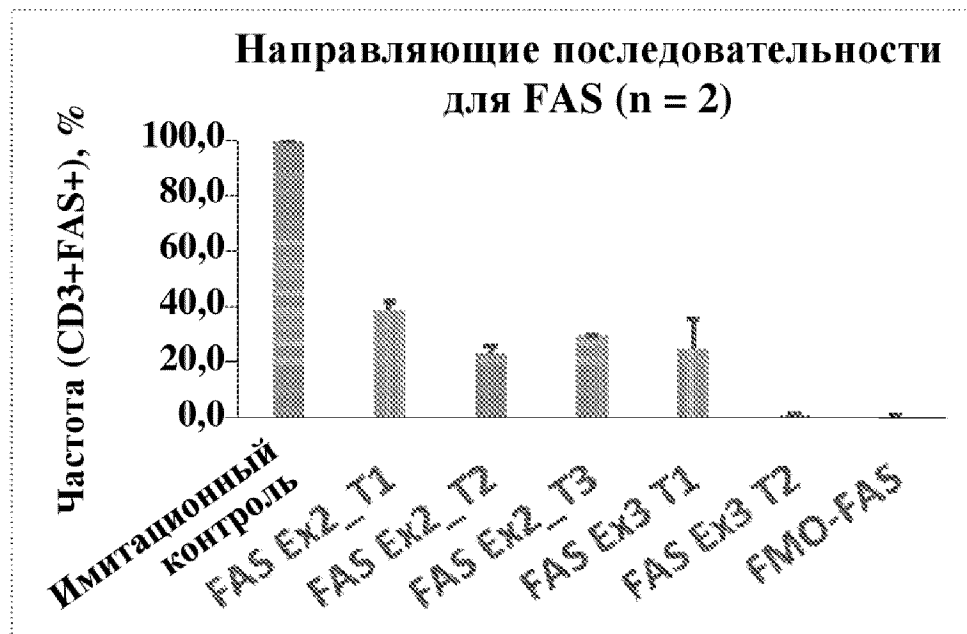
ФИГ. 1С



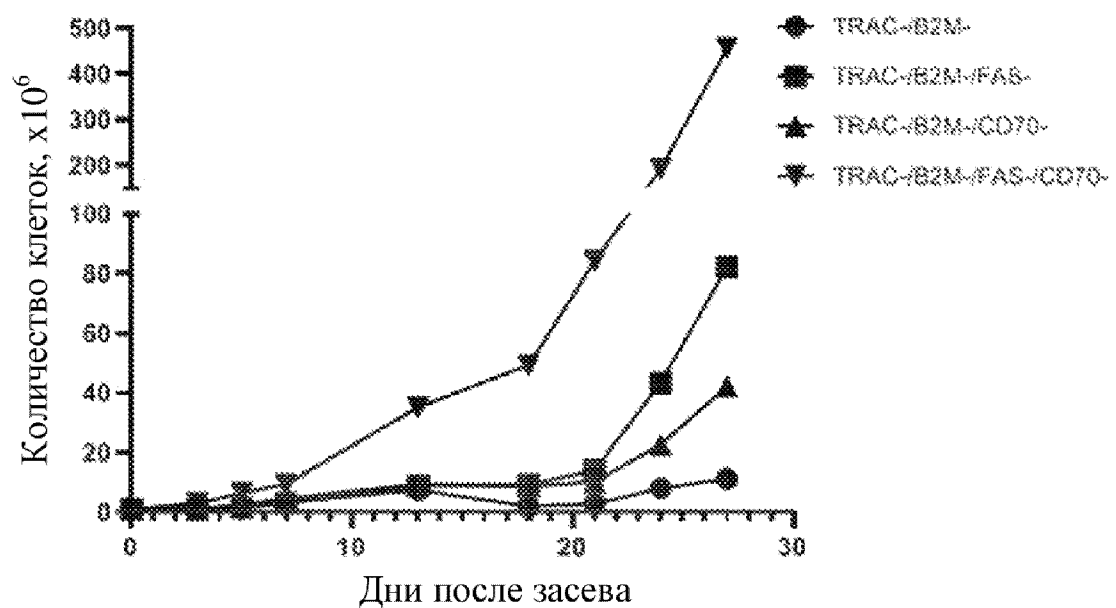
ФИГ. 1D



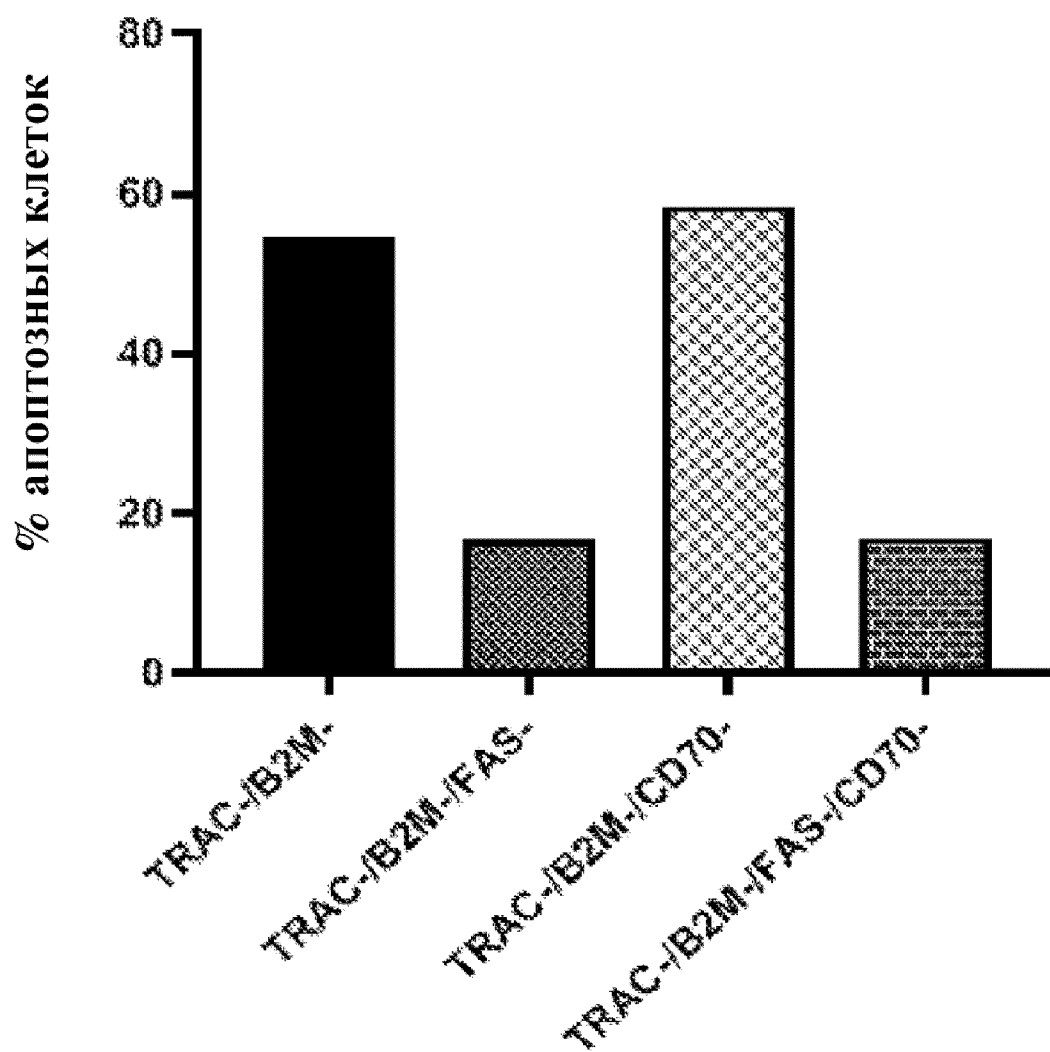
ФИГ. 2А



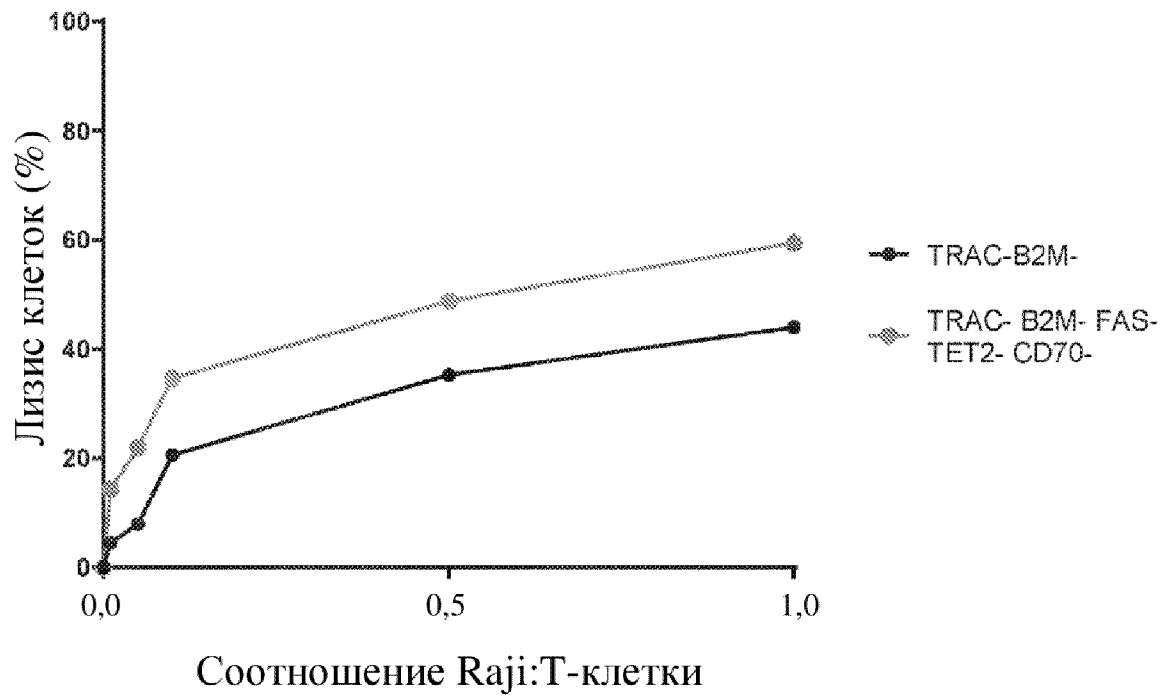
ФИГ. 2В



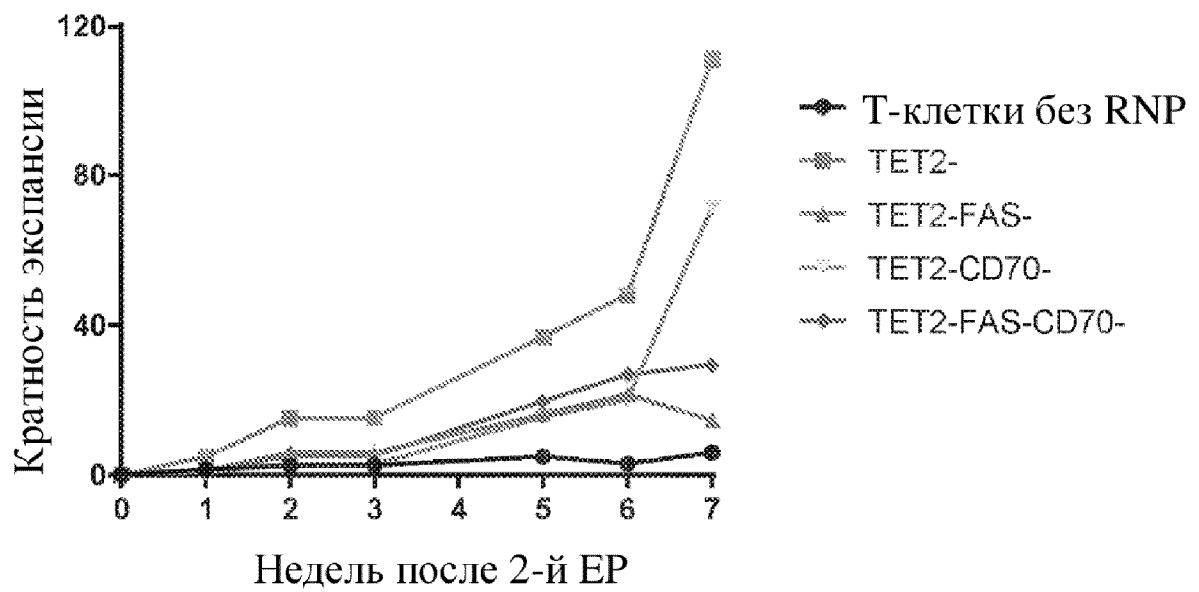
ФИГ. 2С



ФИГ. 3А

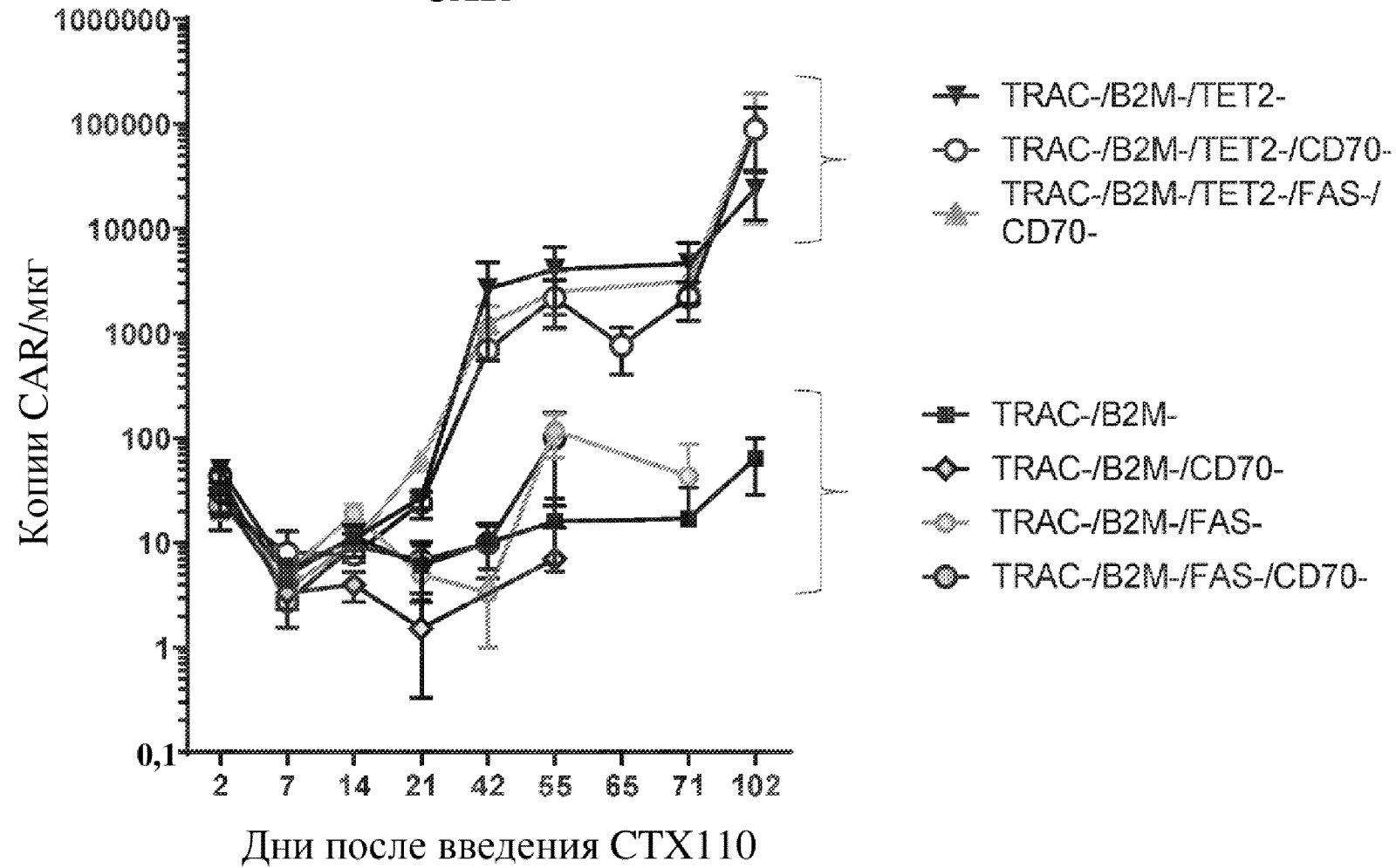


ФИГ. 3В

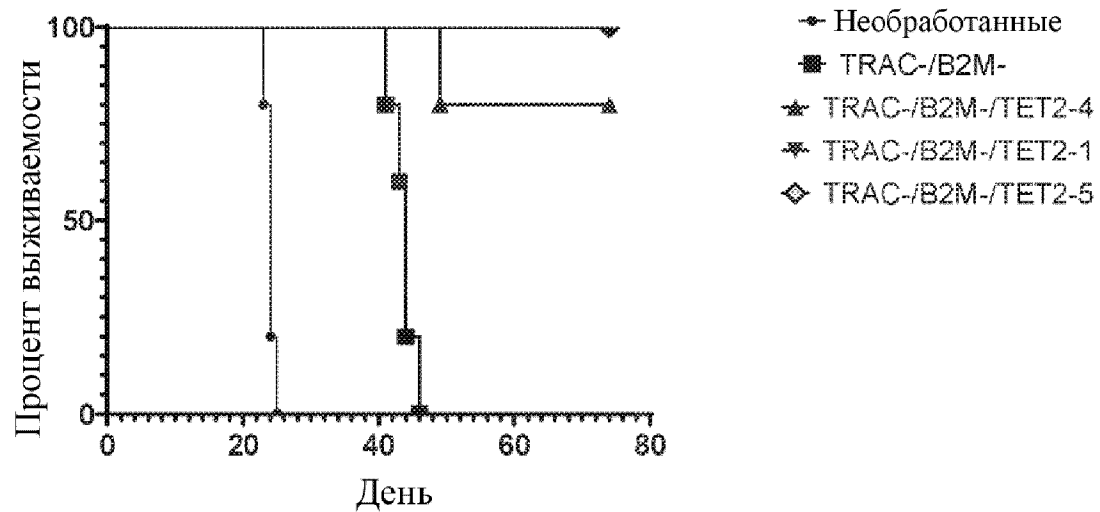


ФИГ. 4

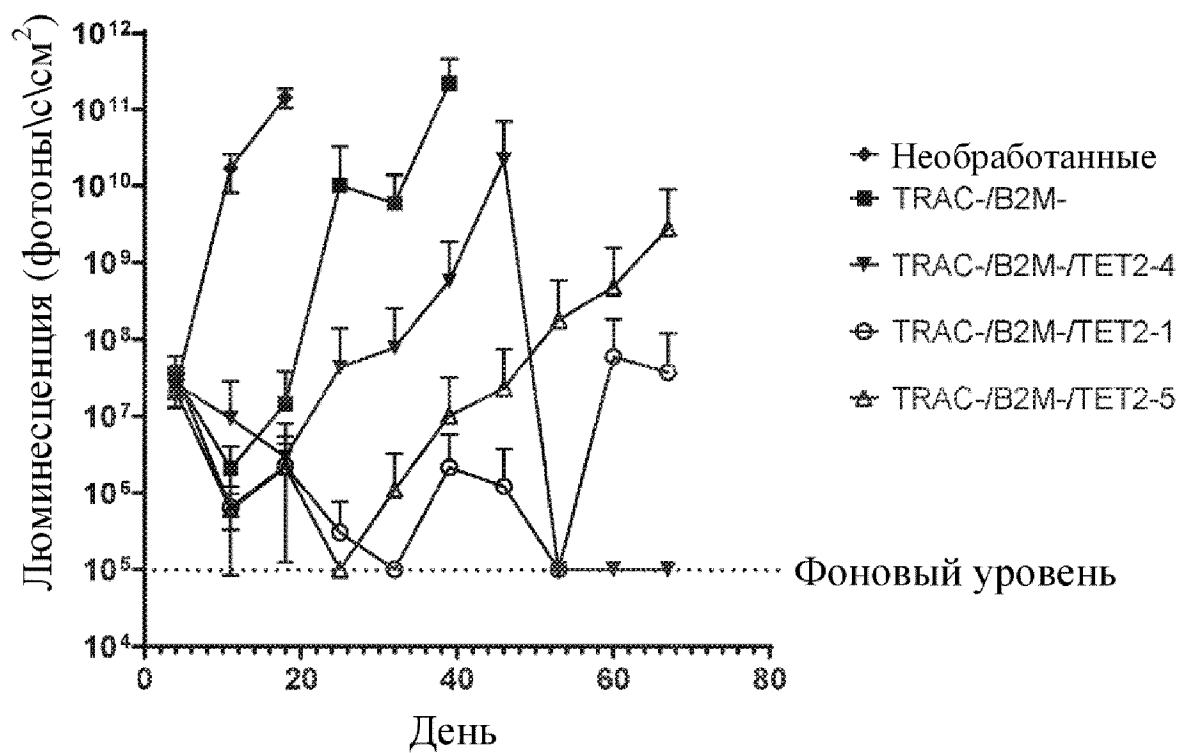
Экспансия Т-клеток с
CAR



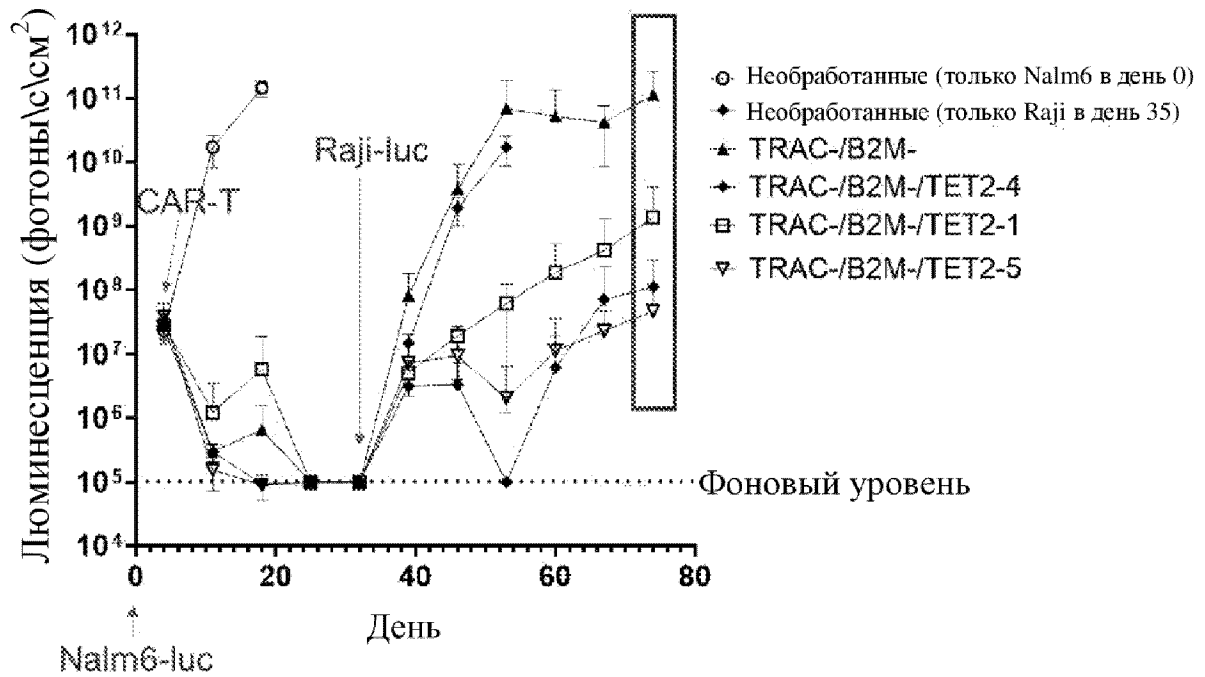
ФИГ. 5А



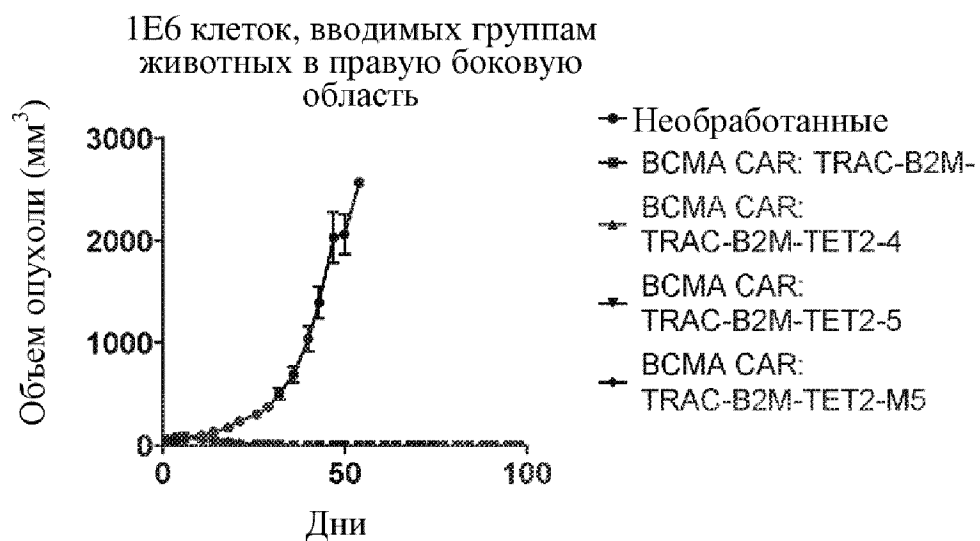
ФИГ. 5В



ФИГ. 6А

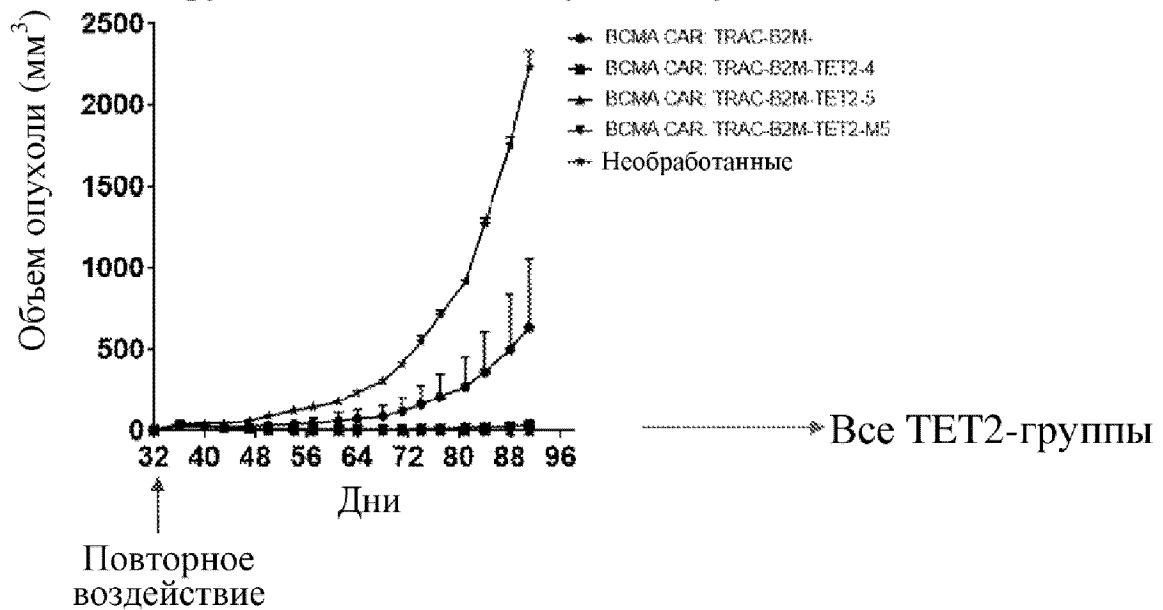


ФИГ. 6В



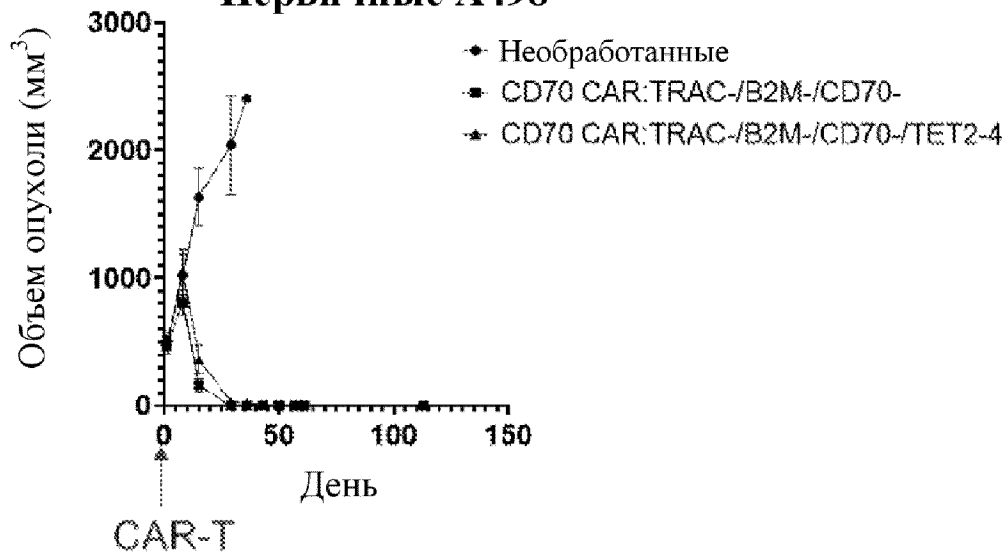
ФИГ. 6С

Повторное воздействие путем введения 1Е6 клеток группам животных в левую боковую область

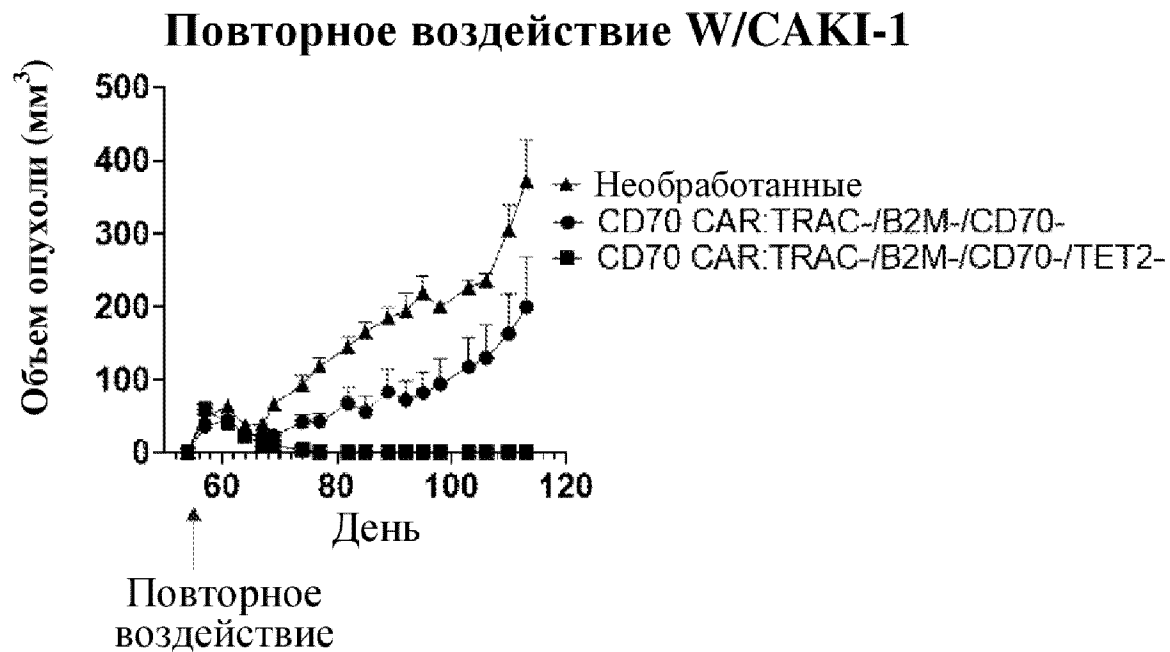


ФИГ. 6D

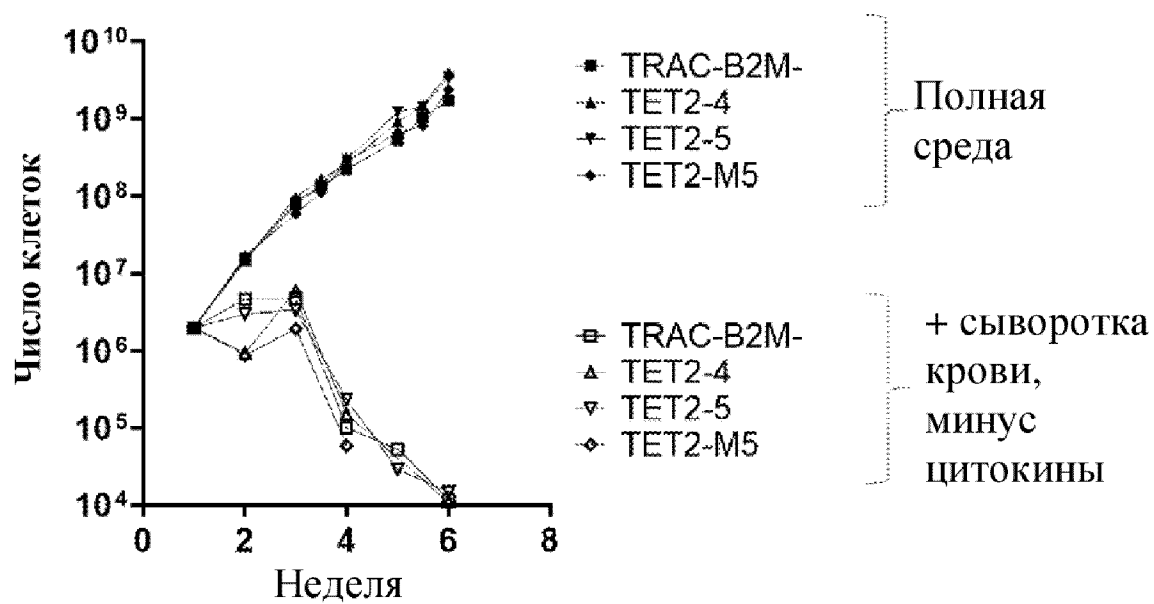
Первичные A498



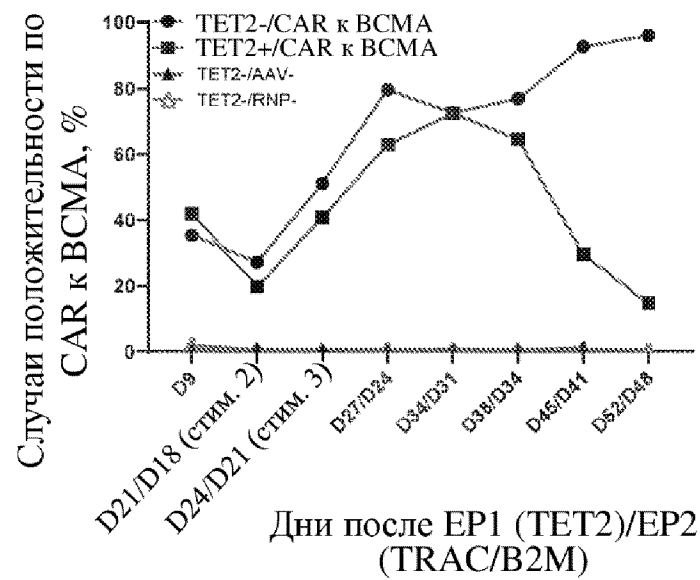
ФИГ. 6Е



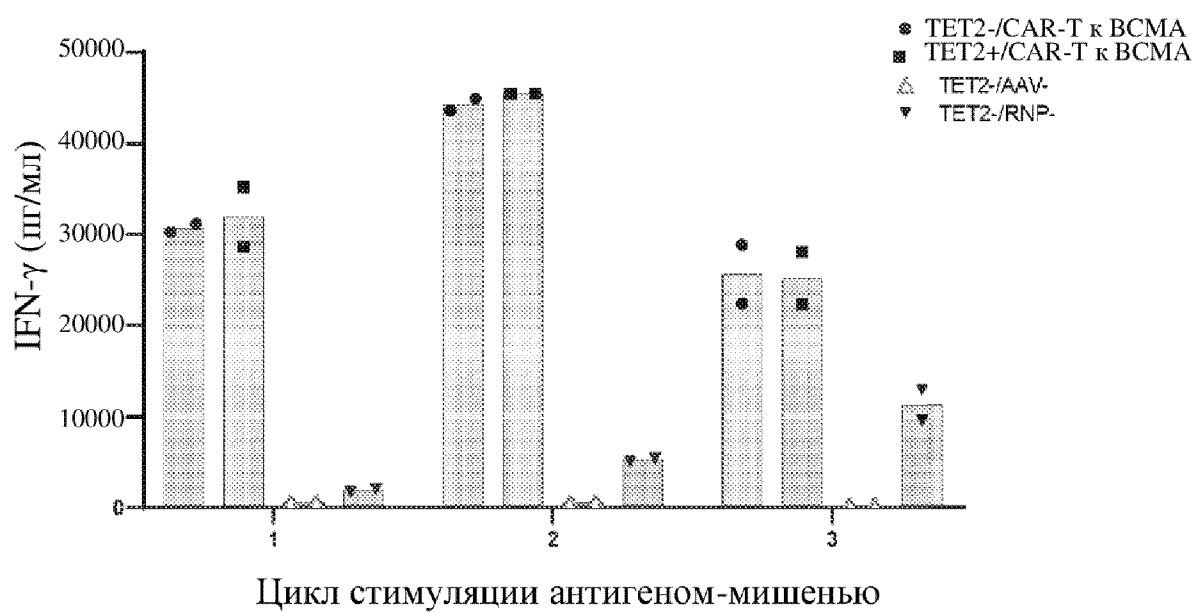
ФИГ. 7



ФИГ. 8С

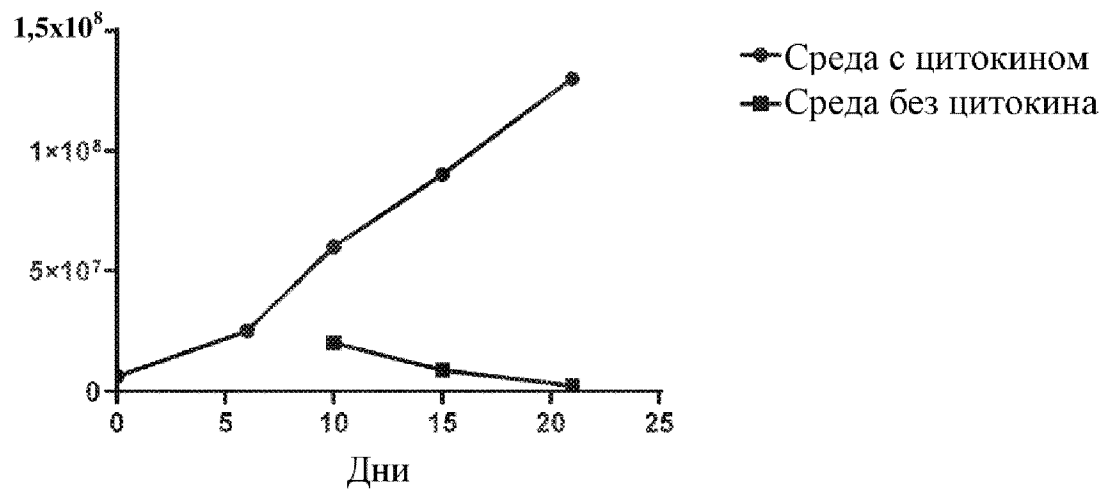


ФИГ. 8D

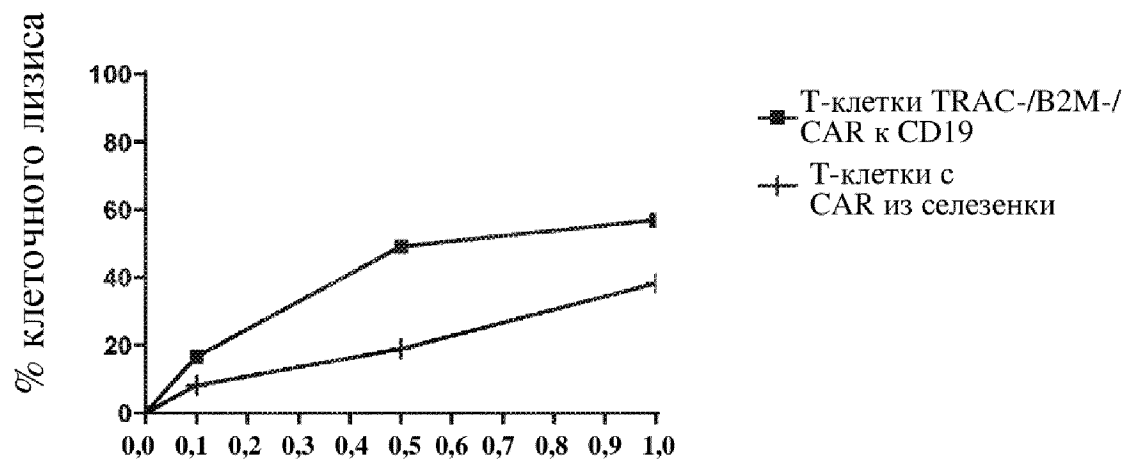


ФИГ. 9А

Т-клетки с CAR, изолированные
после экспансии в селезенке

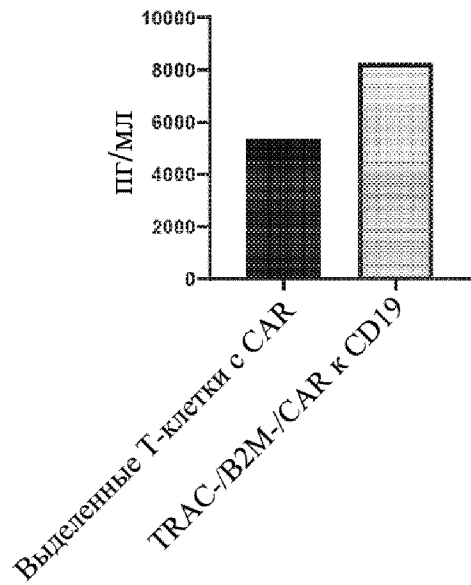


ФИГ. 9В

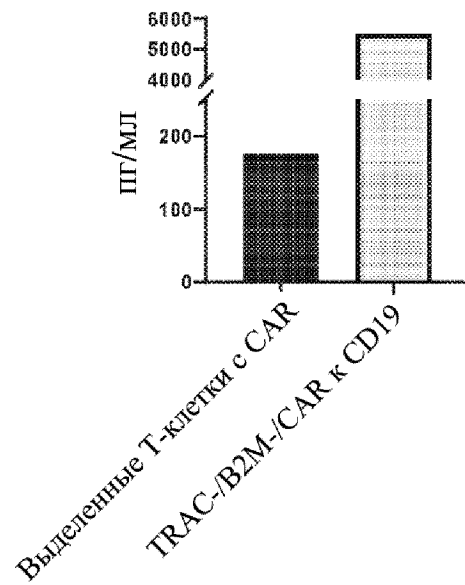


ФИГ. 9С

Секреция интерферона гамма после 24-часового периода уничтожения клеток при соотношении Raji и CAR-T, составляющем 1:1

**ФИГ. 9D**

Секреция IL-2 после 24-часового периода уничтожения клеток при соотношении Raji и CAR-T, составляющем 1:1

**ФИГ. 9Е**