

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390701 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.18

(51) Int. Cl. C12N 15/90 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.08.27

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ИММУННЫЕ КЛЕТКИ С ПРАЙМИРУЮЩИМИ РЕЦЕПТОРАМИ

(31) 63/072,080

(72) Изобретатель:

(32) 2020.08.28

Купер Аарон, Нгуэн Мишель, Яо
Энзи, Санторо Стефен (US)

(33) US

(86) PCT/US2021/048066

(74) Представитель:

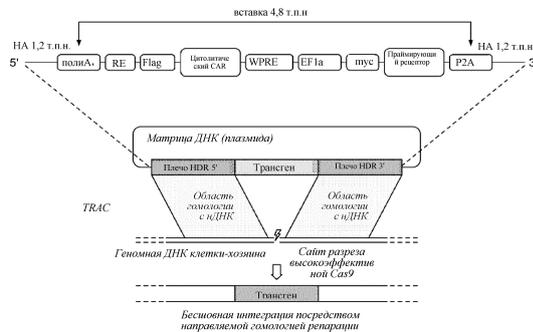
(87) WO 2022/047237 2022.03.03

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

АРСЕНАЛ БАЙОСАЙЕНСЕЗ, ИНК.
(US)

(57) В изобретении предложены способы генетического редактирования клеток с большими матрицами ДНК с использованием невирусного способа редактирования. Также в данном документе предложены клетки, содержащие по меньшей мере одну большую матрицу ДНК, невирусно вставленную в целевую область генома клетки.



202390701

A1

A1

202390701

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577589EA/042

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ИММУННЫЕ КЛЕТКИ С ПРАЙМИРУЮЩИМИ РЕЦЕПТОРАМИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/072080, поданной 28 августа 2020 г., содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, который был подан через EFS-Web и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 30 сентября 2021, называется ANB-209WO_SL.txt и имеет размер 32 823 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рак является заболеванием, которое характеризуется неконтролируемым ростом клеток. Были опробованы многие подходы к лечению рака, включая лекарственные препараты и лучевую терапию. Недавние методы лечения рака стремились использовать собственные иммунные клетки организма для атаки раковых клеток. Один многообещающий подход использует взятые у пациента и генетически модифицированные Т-клетки для производства химерных антигенных рецепторов, или CAR, рецепторных белков, которые дают Т-клеткам новую способность нацеливаться на определенный белок. Рецепторы являются химерными, потому что они объединяют антигенсвязывающую и активирующую Т-клетки функции в одном рецепторе.

Иммунотерапия с использованием этих CAR-Т-клеток является многообещающей, поскольку модифицированные Т-клетки обладают способностью распознавать раковые клетки, чтобы более эффективно нацеливаться на них и уничтожать их.

После того, как Т-клетки сконструированы с CAR, полученные CAR-Т-клетки вводят пациентам для атаки опухолевых клеток. CAR-Т-клетки могут быть получены либо из Т-клеток собственной крови пациента (аутологичные), либо из Т-клеток другого здорового донора (аллогенные).

Как только CAR-Т-клетки вводятся пациенту, они вступают в контакт со своим целевым антигеном на клетке. CAR-Т-клетки связываются с антигеном и активируются. При взаимодействии с антигеном CAR-Т-клетки могут экспоненциально размножаться, инициировать продукцию противоопухолевых цитокинов и нацеливаться на уничтожение опухолевых клеток. Тем не менее, остаются некоторые проблемы и ограничения в отношении иммунотерапии на основе CAR-Т-клеток. Некоторые CAR-Т-клетки могут взаимодействовать с нормальными клетками, экспрессирующими низкие уровни антигенов-мишеней, что приводит к нецелевой токсичности.

Кроме того, вставка больших генных конструкций в определенные гены-мишени затруднена с использованием вирусных векторов, что является известным препятствием в конструировании иммунных клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте в данном документе предложены первичные иммунные клетки, содержащие по меньшей мере одну матрицу ДНК, невирусно вставленную в целевую область генома клетки, где размер матрицы ДНК больше или равен приблизительно 5 тысячам пар нуклеотидов (т.п.н.).

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка не содержит вирусного вектора для введения матрицы ДНК в первичную иммунную клетку.

В некоторых вариантах осуществления размер матрицы ДНК больше или равен около 5,0 т.п.н., 5,1 т.п.н., 5,2 т.п.н., 5,3 т.п.н., 5,4 т.п.н., 5,5 т.п.н., 5,6 т.п.н., 5,7 т.п.н., 5,8 т.п.н., 5,9 т.п.н., 6,0 т.п.н., 6,1 т.п.н., 6,2 т.п.н., 6,3 т.п.н., 6,4 т.п.н., 6,5 т.п.н., 6,6 т.п.н., 6,7 т.п.н., 6,8 т.п.н., 6,9 т.п.н., 7,0 т.п.н., 7,1 т.п.н., 7,2 т.п.н., 7,3 т.п.н., 7,4 т.п.н., 7,5 т.п.н., 7,6 т.п.н., 7,7 т.п.н., 7,8 т.п.н., 7,9 т.п.н., 8,0 т.п.н., 8,1 т.п.н., 8,2 т.п.н., 8,3 т.п.н., 8,4 т.п.н., 8,5 т.п.н., 8,6 т.п.н., 8,7 т.п.н., 8,8 т.п.н., 8,9 т.п.н., 9,0 т.п.н., 9,1 т.п.н., 9,2 т.п.н., 9,3 т.п.н., 9,4 т.п.н., 9,5 т.п.н., 9,6 т.п.н., 9,7 т.п.н., 9,8 т.п.н., 9,9 т.п.н., 10,0 т.п.н. или любому размеру матрицы ДНК между этими размерами.

В некоторых вариантах осуществления размер матрицы ДНК составляет от около 5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 9 т.п.н. или от около 9 т.п.н. до около 10 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК представляет собой матрицу двухцепочечной ДНК или матрицу одноцепочечной ДНК.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК представляет собой матрицу линейной ДНК или матрицу кольцевой ДНК, при этом необязательно матрица кольцевой ДНК представляет собой плазмиду.

В некоторых вариантах осуществления 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, гомологичные геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной клетки.

В некоторых вариантах осуществления целевая область генома клетки представляет собой локус константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) или безопасный геномный локус (GSH: англ.: genomic safe harbor).

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит гетерологичную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит ген.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором, и конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3': индуцибельный промотор; химерный антигенный рецептор, конститутивный промотор и праймирующий рецептор.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3': конститутивный промотор; праймирующий рецептор, индуцибельный промотор и химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит самовырезающийся пептид 2A (P2A).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота P2A находится на 3'-конце матрицы-ДНК.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

В некоторых вариантах осуществления WPRE находится на 3'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, и на 5'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей праймирующий рецептор, или при этом WPRE находится на 3'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей праймирующий рецептор, и на 5'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор содержит в направлении от N-конца к C-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном; трансмембранный домен, содержащий один или несколько индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления; и внутриклеточный домен, содержащий человеческий или гуманизированный эффектор транскрипции, где связывание антигена с внеклеточным антигенсвязывающим доменом приводит к расщеплению в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления, тем самым высвобождая внутриклеточный домен.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор дополнительно содержит околосмембранный домен (JMD, англ.: juxtamembrane domain), расположенный между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом.

В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции связывается с индуцибельным промотором и индуцирует экспрессию CAR.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит от N-конца к C-концу внеклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном; трансмембранный домен; внутриклеточный костимулирующий домен; и внутриклеточный домен активации.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор и CAR связывают разные антигены.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор и CAR связывают один и тот же антиген.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой первичную иммунную клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка представляет собой аутологичную иммунную клетку.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK), Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁺ Т-клетку, первичную Т-клетку или предшественник Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка представляет собой первичную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка представляет собой первичную Т-клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка не содержит вирусов.

В другом аспекте в данном документе предложены популяции клеток, включающие множество первичных иммунных клеток, описанных в данном документе.

В другом аспекте в данном документе предложены первичные иммунные клетки, содержащие по меньшей мере одну матрицу ДНК, вставленную в целевую область генома первичной иммунной клетки, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом первичная иммунная клетка не содержит вирусного вектора для введения матрицы ДНК в первичную иммунную клетку.

В другом аспекте в данном документе предложены первичные иммунные клетки, содержащие по меньшей мере одну матрицу ДНК, содержащую химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий транскрипционный фактор, вставленную в целевую область генома первичной иммунной клетки, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом первичная иммунная клетка не содержит вирусного вектора для введения матрицы ДНК в первичную иммунную клетку.

В другом аспекте в данном документе предложены жизнеспособные первичные клетки без вирусов, содержащие комплекс рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс-матрица ДНК, где РНП содержит нуклеазный домен и направляющую РНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной клетки.

В другом аспекте в данном документе предложены жизнеспособные первичные клетки без вирусов, содержащие рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс-матрица ДНК, где РНП содержит нуклеазный домен и направляющую РНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, при этом матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной клетки.

В другом аспекте в данном документе предложены способы лечения заболевания у субъекта, включающие введение субъекту первичной иммунной клетки.

В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак.

В другом аспекте в данном документе предложены невирусные векторы, содержащие матрицу ДНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной клетки.

В некоторых вариантах осуществления размер матрицы ДНК больше или равен около 5,0 т.п.н., 5,1 т.п.н., 5,2 т.п.н., 5,3 т.п.н., 5,4 т.п.н., 5,5 т.п.н., 5,6 т.п.н., 5,7 т.п.н., 5,8 т.п.н., 5,9 т.п.н., 6,0 т.п.н., 6,1 т.п.н., 6,2 т.п.н., 6,3 т.п.н., 6,4 т.п.н., 6,5 т.п.н., 6,6 т.п.н., 6,7 т.п.н., 6,8 т.п.н., 6,9 т.п.н., 7,0 т.п.н., 7,1 т.п.н., 7,2 т.п.н., 7,3 т.п.н., 7,4 т.п.н., 7,5 т.п.н., 7,6 т.п.н., 7,7 т.п.н., 7,8 т.п.н., 7,9 т.п.н., 8,0 т.п.н., 8,1 т.п.н., 8,2 т.п.н., 8,3 т.п.н., 8,4 т.п.н., 8,5 т.п.н., 8,6 т.п.н., 8,7 т.п.н., 8,8 т.п.н., 8,9 т.п.н., 9,0 т.п.н., 9,1 т.п.н., 9,2 т.п.н., 9,3 т.п.н., 9,4 т.п.н., 9,5 т.п.н., 9,6 т.п.н., 9,7 т.п.н., 9,8 т.п.н., 9,9 т.п.н., 10,0 т.п.н. или любому размеру матрицы ДНК между этими размерами.

В некоторых вариантах осуществления размер матрицы ДНК составляет от около 5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 9 т.п.н. или от около 9 т.п.н. до около 10 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления целевая область генома клетки представляет собой локус константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) или безопасный геномный локус (GSH: англ.: genomic safe harbor).

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит гетерологичную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит ген.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором, и конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3': индуцибельный промотор; химерный антигенный рецептор, конститутивный промотор и праймирующий рецептор.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3': конститутивный промотор; праймирующий рецептор, индуцибельный промотор и химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит самовырезающийся пептид 2A (P2A).

В некоторых вариантах осуществления P2A находится на 3'-конце матрицы ДНК.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор содержит в направлении от N-конца к C-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном; трансмембранный домен, содержащий один или несколько индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления; и внутриклеточный домен, содержащий человеческий или гуманизированный эффектор транскрипции, где связывание антигена с внеклеточным антигенсвязывающим доменом приводит к расщеплению в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления, тем самым высвобождая внутриклеточный домен.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор дополнительно содержит околосмембранный домен (JMD, англ.: juxtamembrane domain), расположенный между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом.

В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции связывается с индуцибельным промотором и индуцирует экспрессию CAR.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит от N-конца к С-концу внеклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном; трансмембранный домен; внутриклеточный костимулирующий домен; и внутриклеточный домен активации.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор и CAR связывают разные антигены.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор и CAR связывают один и тот же антиген.

В другом аспекте в данном документе предложены способы редактирования первичной иммунной клетки, включающие: получение комплекса рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП)-матрица ДНК, где РНП содержит нуклеазный домен и направляющую РНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной иммунной клетки; невирусное введение комплекса РНП-матрица ДНК в первичную иммунную клетку, при этом направляющая РНК специфически гибридизуется с целевой областью генома первичной иммунной клетки, и при этом нуклеазный домен расщепляет целевую область для создания сайта вставки в геноме первичной иммунной клетки; и редактирование первичной иммунной клетки посредством вставки матрицы ДНК в сайт вставки в геноме первичной иммунной клетки.

В некоторых вариантах осуществления невирусное введение включает электропорацию.

В некоторых вариантах осуществления нуклеазный домен содержит CRISPR-ассоциированную эндонуклеазу (Cas), необязательно нуклеазу Cas9.

В некоторых вариантах осуществления размер матрицы ДНК больше или равен около 5,0 т.п.н., 5,1 т.п.н., 5,2 т.п.н., 5,3 т.п.н., 5,4 т.п.н., 5,5 т.п.н., 5,6 т.п.н., 5,7 т.п.н., 5,8 т.п.н., 5,9 т.п.н., 6,0 т.п.н., 6,1 т.п.н., 6,2 т.п.н., 6,3 т.п.н., 6,4 т.п.н., 6,5 т.п.н., 6,6 т.п.н., 6,7 т.п.н., 6,8 т.п.н., 6,9 т.п.н., 7,0 т.п.н., 7,1 т.п.н., 7,2 т.п.н., 7,3 т.п.н., 7,4 т.п.н., 7,5 т.п.н., 7,6 т.п.н., 7,7 т.п.н., 7,8 т.п.н., 7,9 т.п.н., 8,0 т.п.н., 8,1 т.п.н., 8,2 т.п.н., 8,3 т.п.н., 8,4 т.п.н., 8,5 т.п.н., 8,6 т.п.н., 8,7 т.п.н., 8,8 т.п.н., 8,9 т.п.н., 9,0 т.п.н., 9,1 т.п.н., 9,2 т.п.н., 9,3 т.п.н., 9,4 т.п.н., 9,5 т.п.н., 9,6 т.п.н., 9,7 т.п.н., 9,8 т.п.н., 9,9 т.п.н., 10,0 т.п.н. или любому размеру матрицы ДНК между этими размерами.

В некоторых вариантах осуществления размер матрицы ДНК составляет от около 5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 7

т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 9 т.п.н. или от около 9 т.п.н. до около 10 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления целевая область генома клетки представляет собой локус константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) или безопасный геномный локус (GSH: англ.: genomic safe harbor).

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК представляет собой матрицу двухцепочечной ДНК или матрицу одноцепочечной ДНК.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК представляет собой матрицу линейной ДНК или матрицу кольцевой ДНК, при этом необязательно матрица кольцевой ДНК представляет собой плазмиду.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит гетерологичную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит ген.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором, и конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3': индуцибельный промотор; химерный антигенный рецептор, конститутивный промотор и праймирующий рецептор.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3': конститутивный промотор; праймирующий рецептор, индуцибельный промотор и химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит самовырезающийся пептид 2A (P2A).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота P2A находится на 3'-конце матрицы-ДНК.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК дополнительно содержит посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

В некоторых вариантах осуществления WPRE находится на 3'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, и на 5'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей праймирующий рецептор, или при этом WPRE находится на 3'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей праймирующий рецептор, и на 5'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор содержит в направлении от N-конца к С-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном; трансмембранный домен, содержащий один или несколько индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления; и внутриклеточный домен, содержащий человеческий или гуманизированный эффектор транскрипции, где связывание антигена с внеклеточным антигенсвязывающим доменом приводит к расщеплению в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления, тем самым высвобождая внутриклеточный домен.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор дополнительно содержит околосмембранный домен (JMD, англ.: juxtamembrane domain), расположенный между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом.

В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции связывается с индуцибельным промотором и индуцирует экспрессию CAR.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит от N-конца к С-концу внеклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном; трансмембранный домен; внутриклеточный костимулирующий домен; и внутриклеточный домен активации.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор и CAR связывают разные антигены.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор и CAR связывают один и тот же антиген.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой первичную иммунную клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка представляет собой аутологичную иммунную клетку.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK), Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁺ Т-клетку, первичную Т-клетку или предшественник Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка представляет собой первичную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка представляет собой первичную Т-клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка не содержит вирусов.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение иммунной клетки от пациента и введение плазмиды *in vitro*.

В другом аспекте в данном документе предложены способы редактирования первичной иммунной клетки, включающие: получение комплекса рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП)-матрица ДНК, где РНП содержит нуклеазный домен и направляющую РНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, при этом матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной иммунной клетки; невирусное введение комплекса РНП-матрица ДНК в первичную иммунную клетку, при этом направляющая РНК специфически гибридизуется с целевой областью генома первичной иммунной клетки, и при этом нуклеазный домен расщепляет целевую область для создания сайта вставки в геноме первичной иммунной клетки; и редактирование первичной иммунной клетки посредством вставки матрицы ДНК в сайт вставки в геноме первичной иммунной клетки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Эти и другие признаки, аспекты и преимущества данного изобретения станут более понятными с учетом следующего описания и прилагаемых графических материалов, на которых:

На Фиг. 1 показан пример плазмиды по изобретению.

На Фиг. 2 показан пример способа получения сконструированных иммунных клеток.

На Фиг. 3 показана схема экспериментального протокола.

На Фиг. 4 представлены экспериментальные результаты, показывающие желаемую экспрессию и контроль рецептора.

На Фиг. 5 показана схема экспериментального протокола.

На Фиг. 6 представлены экспериментальные результаты, показывающие низкое количество нежелательной экспрессии CAR.

На Фиг. 7 показана схема, показывающая сайт интеграции GS94 на хромосоме 11.

Фиг. 8А включает графики, показывающие индукцию CAR и экспрессию PrimeR сконструированными Т-клетками после 48 часов совместного культивирования с клетками K562-PrimeR. **Фиг. 8В** включает графики, показывающие уровни цитотоксичности и секреции цитокинов для сконструированных Т-клеток через 48 часов совместного культивирования с клетками K562-primeR/CAR.

Фиг. 9А включает схему, показывающую обзор эксперимента по оценке влияния сайта интеграции на цитотоксичность. **Фиг. 9В** включает графики, показывающие измеренную цитотоксичность для сконструированных Т-клеток, совместно культивируемых в течение 48 часов с клетками K562-primeR/CAR или K562-CAR.

Фиг. 10А включает схему, показывающую обзор эксперимента для оценки влияния сайта интеграции на секрецию цитокинов. **Фиг. 10В** включает графики, показывающие измеренные уровни цитокинов для сконструированных Т-клеток, совместно культивируемых в течение 48 часов с клетками K562-primeR/CAR.

Фиг. 11 включает схему, показывающую эксперимент *in vitro*, проведенный для определения влияния сайта интеграции на независимую от PrimeR экспрессию CAR. «Проток» относится к проточной цитометрии, а «повтор-стим» относится к повторяющейся стимуляции CD3/CD28 сконструированных Т-клеток. «ЭП» относится к электропорации.

Фиг. 12А и **12В** включают графики, показывающие стабильность экспрессии PrimeR с течением времени при использовании указанных сайтов интеграции. «Проток» относится к проточной цитометрии, а «повтор-стим» относится к повторяющейся стимуляции CD3/CD28 сконструированных Т-клеток. «ЭП» относится к электропорации. На **Фиг. 12В**, экспрессия PrimeR нормализована к экспрессии с использованием сайта интеграции TRAC.

Фиг. 13А включает схему, показывающую методику анализа iGuide-Seq. **Фиг. 13В** включает график, показывающий целевую эффективность с использованием анализа iGuide Seq для указанных сайтов интеграции. **Фиг. 13С** включает схемы анализа iGuide-Seq, показывающие, что у GS94 не было воспроизводимых предполагаемых нецелевых показателей у двух доноров. Фигура раскрывает SEQ ID NO 127-137, 127, 128 и 138- 146, соответственно, в порядке появления.

Фиг. 14 включает схему, показывающую рабочий процесс и данные iGuide-Seq.

Фиг. 15 включает в себя график, показывающий анализ rhAmp-seq предполагаемых нецелевых сайтов, идентифицированных с помощью iGUIDE-seq, и прогнозирования Elevation.

Фиг. 16 включает графики, показывающие анализ секвенирования РНК клеток с нокином цепей primeR/CAR в GS94, GS102 и TRAC. Диаграмма рассеяния экспрессии генов в клетках с интеграцией в локусе GS94 (ось Y) по сравнению с клетками с интеграцией либо в локусе TRAC, либо в локусе GS102 (ось X) у двух доноров. Светло-серые точки соответствуют ETS1 и FLI1. Темно-серым цветом показаны гены, которые, как было обнаружено, дифференциально экспрессируются с помощью edgeR (кратность изменения > 0, р-значение с поправкой на FDR < 0,01, среднее количество на миллион в сравниваемых условиях не менее 2).

Фиг. 17 включает графики, показывающие отсутствие независимого от цитокинов роста в клетках с нокином цепи PrimeR/CAR в GS94.

На **Фиг. 18** показана экспрессия цепи трансгена длиной 8,3 т.п.н., содержащей primeR и CAR, в клетках K562.

На **Фиг. 19А** показана схема кассеты размером 4,6 т.п.н., которая была вставлена в безопасный локус GS94. На **Фиг. 19В** показана схема кассеты размером 8,3 т.п.н., которая была вставлена в безопасный локус GS94.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к новым сконструированным иммунным клеткам и способам получения и применения таких клеток. Сконструированные иммунные клетки включают трансген, вставленный в геном иммунных клеток, который кодирует гены сконструированного праймирующего рецептора и химерного антигенного рецептора (CAR). Изначально, сконструированные иммунные клетки экспрессируют праймирующий рецептор, кодируемый плазмидой, на поверхности клеток, но не экспрессируют CAR. Праймирующие рецепторы включают расщепляемый фактор транскрипции. Когда иммунная клетка по изобретению встречается с клеткой-мишенью, праймирующий рецептор связывается с когнатным лигандом на клетке-мишени. Это заставляет праймирующий рецептор высвобождать расщепляемый фактор транскрипции. Высвобождение фактора транскрипции заставляет сконструированную иммунную клетку экспрессировать CAR, кодируемый интегрированным трансгеном, на поверхности клетки.

При экспрессии на поверхности иммунной клетки CAR может связываться с когнатным лигандом на клетке-мишени. Связывание CAR с его лигандом-мишенью вызывает цитотоксический ответ сконструированной иммунной клетки, которая уничтожает клетку-мишень.

Сконструированные иммунные клетки по данному изобретению имеют несколько преимуществ по сравнению с ранее сконструированными иммунными клетками. Описанный ниже вариант осуществления демонстрирует, что синтетическая цепь может быть доставлена в геном Т-клетки с использованием целенаправленной невирусной доставки, и что точность цепи может сохраняться после геномной интеграции. Это повышает профиль безопасности и расширяет терапевтическое окно клеток, поскольку целенаправленная интеграция в промотор TRAC снижает риск вставки нецелевого гена в геном, как это происходит при доставке гена лентивирусом. Кроме того, цепь обеспечивает дополнительные функции безопасности. Например, цитотоксический CAR недоступен для активации, поскольку он не экспрессируется до тех пор, пока не встретится с клеткой-мишенью с когнатным лигандом праймирующего рецептора. Более того, поскольку CAR изначально не экспрессируется, клетки с меньшей вероятностью проявляют истощение, дифференциацию, тоническую передачу сигнала и индуцированную активацией гибель иммунных клеток, одновременно демонстрируя высокий потенциал пролиферации и персистенции.

Определения

Термины, используемые в формуле изобретения и описании, определяются так, как изложено ниже, если не указано иное.

Используемый в данном документе термин «ген» относится к основной единице наследственности, состоящей из сегмента ДНК, расположенного вдоль хромосомы, которая кодирует определенный белок или сегмент белка. Ген обычно включает промотор, 5'-нетранслируемую область, одну или несколько кодирующих

последовательностей (экзонов), необязательно интроны и 3'-нетранслируемую область. Ген может дополнительно содержать терминатор, энхансеры и/или сайленсеры.

Используемый в данном документе термин «локус» относится к определенному фиксированному физическому местоположению на хромосоме, где расположен ген или генетический маркер.

Термин «безопасный локус» относится к локусу, в который могут быть включены гены или генетические элементы без нарушения экспрессии или регуляции примыкающих генов. Эти безопасные локусы также называют безопасными сайтами (SHS; англ.: safe harbor sites). В данном контексте безопасный локус относится к «сайту интеграции» или «сайту нокин», в который может быть вставлена последовательность, кодирующая трансген, как определено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вставка происходит с заменой последовательности, расположенной в сайте интеграции. В некоторых вариантах осуществления вставка происходит без замены последовательности в сайте интеграции. Примеры предполагаемых сайтов интеграции представлены в **Таблице 1**.

Используемый в данном документе термин «вставка» относится к нуклеотидной последовательности, которая интегрирована (вставлена) в целевой локус или безопасный сайт. Вставка может использоваться для обозначения генов или генетических элементов, которые включены в целевой локус или безопасный сайт с использованием, например, направляемой гомологией репарации (HDR; англ.: homology-directed repair), редактирования генома CRISPR/Cas9, или других методов вставки нуклеотидных последовательностей в геномную область, известных специалистам в данной области техники.

Система «CRISPR/Cas» относится к широко распространенному классу бактериальных систем защиты от чужеродных нуклеиновых кислот. Системы CRISPR/Cas обнаружены у широкого круга зубактериальных и архейных организмов. Системы CRISPR/Cas включают подтипы типов I, II и III. В системах CRISPR/Cas типа II дикого типа используется РНК-опосредованная нуклеаза Cas9 в комплексе с направляющей и активирующей РНК для распознавания и расщепления чужеродной нуклеиновой кислоты. Направляющие РНК, обладающие активностью как направляющей РНК, так и активирующей РНК, также известны в данной области техники. В некоторых случаях такие направляющие РНК с двойной активностью называют малыми направляющими РНК (мнРНК).

Гомологи Cas9 обнаружены у широкого круга зубактерий, включая, помимо прочего, бактерии следующих таксономических групп: Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes-Chlorobi, Chlamydiae-Verrucomicrobia, Chloflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes и Thermotogae. Типичным белком Cas9 является белок Cas9 *Streptococcus pyogenes*. Дополнительные белки Cas9 и их гомологи описаны, *например*, в Chylinski, et al., RNA Biol. 2013 May 1; 10(5): 726-737 ; Nat. Rev. Microbiol. 2011 June; 9(6): 467-477; Hou, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 24;110(39):15644-9; Sampson et al.,

Nature. 2013 May 9;497(7448):254-7; и Jinek, et al., Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. Домен нуклеазы Cas9 может быть оптимизирован для эффективной активности или повышенной стабильности в клетке-хозяине.

Используемый в данном документе термин «Cas9» относится к РНК-опосредованной нуклеазе (*например*, которая происходит из бактерий или архей, или получена из них). Примеры РНК-опосредованных нуклеаз включают вышеупомянутые белки Cas9 и их гомологи и включают, помимо прочего, CPF1 (*См.*, *например*, Zetsche et al., Cell, Volume 163, Issue 3, p759-771, 22 October 2015). Аналогичным образом, используемый в данном документе термин комплекс «рибонуклеопротеин Cas9» и т.п. относится к комплексу между белком Cas9 и crРНК (*например*, направляющей РНК или малой направляющей РНК), белком Cas9 и транскриптивирующей crРНК (tracrРНК), белком Cas9 и малой направляющей РНК или их комбинаций (*например*, комплекс, содержащий белок Cas9, tracrРНК и направляющую РНК crРНК).

Используемые в данном документе термины «Т-лимфоцит» и «Т-клетка» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, которые завершили созревание в тимусе и распознают определенные чужеродные антигены в организме. Эти термины также относятся к основным типам лейкоцитов, играющим различные роли в иммунной системе, включая активацию и дезактивацию других иммунных клеток. Т-клеткой может быть любая Т-клетка, например, культивируемая Т-клетка, *например*, первичная Т-клетка или Т-клетка, полученная из культивируемой Т-клеточной линии, например, Jurkat, SupT1 и т. д., или Т-клетка, полученная из млекопитающего. Т-клетки включают, помимо прочего, наивные Т-клетки, стимулированные Т-клетки, первичные Т-клетки (*например*, некультивированные), культивированные Т-клетки, иммортализованные Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки, естественные Т-клетки-киллеры, их комбинации или их субпопуляции. Т-клетка может быть CD3⁺ клеткой. Т-клетки могут быть CD4⁺, CD8⁺ или CD4⁺ и CD8⁺. Т-клетка может представлять собой Т-клетку любого типа, CD4⁺/CD8⁺ двойные положительные Т-клетки, CD4⁺ хелперные Т-клетки (например, клетки Th1 и Th2), CD8⁺ Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), периферические, включая, помимо прочего, мононуклеарные клетки крови (PBMC), лейкоциты периферической крови (PBL), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), Т-клетки памяти, наивные Т-клетки, регуляторные Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки и т. д. Это могут быть любые Т-клетки на любой стадии развития. Дополнительные типы хелперных Т-клеток включают клетки Th3 (Treg), клетки Th17, клетки Th9 или клетки Tfh. Дополнительные типы Т-клеток памяти включают клетки, такие как центральные Т-клетки памяти (клетки Tcm; англ.: central memory T cell), эффекторные Т-клетки памяти (клетки Tem; англ.: effector memory T cell; и клетки TEMRA). Т-клетка также может относиться к генетически модифицированной Т-клетке, такой как Т-клетка, которая была модифицирована для экспрессии Т-клеточного рецептора (ТКР) или химерного антигенного рецептора (CAR). Т-клетки также можно дифференцировать от стволовых клеток или клеток-предшественников.

Термин «CD4+Т-клетки» относится к подмножеству Т-клеток, которые экспрессируют CD4 на своей поверхности и связаны с клеточным иммунным ответом. CD4+ Т-клетки характеризуются профилем секреции после стимуляции, который может включать секрецию цитокинов, таких как ИФН- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 и IL-10. «CD4» представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 55 кДа, первоначально определенный как антиген дифференциации на Т-лимфоцитах, но был также обнаружен на других клетках, включая моноциты/макрофаги. Антиген CD4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов и участвует в качестве элемента ассоциативного распознавания в иммунных ответах, ограниченных МНС (главный комплекс гистосовместимости) класса II. На Т-лимфоцитах антиген CD4 определяет субпопуляцию хелперов/индукторов.

«CD8+Т-клетки» относится к субпопуляции Т-клеток, которые экспрессируют CD8 на своей поверхности, являются ограниченными МНС класса I и функционируют как цитотоксические Т-клетки. Молекула «CD8» представляет собой антиген дифференциации, присутствующий на тимоцитах, а также на цитотоксических и супрессорных Т-лимфоцитах. Антиген CD8 является членом суперсемейства иммуноглобулинов и является элементом ассоциативного распознавания в взаимодействиях, ограниченных главным комплексом гистосовместимости класса I.

Используемая в данном документе фраза «гемопозитическая стволовая клетка» относится к типу стволовых клеток, от которых могут происходить клетки крови. От гемопозитических стволовых клеток могут происходить клетки миелоидной или лимфоидной линий, или их комбинации. Гемопозитические стволовые клетки преимущественно обнаруживают в костном мозге, хотя их можно выделить из периферической крови или ее фракции. Различные маркеры клеточной поверхности можно использовать для идентификации, сортировки или очистки гемопозитических стволовых клеток. В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки идентифицируют как c-kit⁺ и lin⁻. В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки человека идентифицируют как CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻. В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки человека идентифицируют как CD34⁻, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻. В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки человека идентифицируют как CD133⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻. В некоторых случаях гемопозитические стволовые клетки мыши идентифицируют как CD34^{lo/-}, SCA-1⁺, Thy1^{+/lo}, CD38⁺, C-kit⁺, lin⁻. В некоторых случаях гемопозитическими стволовыми клетками являются CD150⁺CD48⁻CD244⁻.

Используемая в данном документе фраза «гемопозитическая клетка» относится к клетке, полученной из гемопозитической стволовой клетки. Гемопозитическая клетка может быть получена или предоставлена путем выделения из организма, системы, органа или ткани (*например*, крови или ее фракции). Альтернативно, гемопозитическая стволовая клетка может быть выделена, а гемопозитическая клетка получена или предоставлена

путем дифференциации стволовой клетки. Гемопозитические клетки включают клетки с ограниченной способностью к дифференциации в другие типы клеток. Такие гемопозитические клетки включают, помимо прочего, мультипотентные клетки-предшественники, ограниченные линией клетки-предшественники, общие миелоидные клетки-предшественники, гранулоцитарно-макрофагальные клетки-предшественники или мегакариоцитарно-эритроидные клетки-предшественники. Гемопозитические клетки включают клетки лимфоидной и миелоидной линий, такие как лимфоциты, эритроциты, гранулоциты, моноциты и тромбоциты.

Используемая в данном документе фраза «иммунная клетка» включает все типы клеток, от которых происходят иммунные клетки, включая гемопозитические клетки, плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой В-клетку, макрофаг, естественную клетку-киллер (NK), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), плюрипотентную стволовую клетку человека (HSPC), Т-клетку или предшественник Т-клетки, или дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку врожденного иммунитета.

Используемый в данном документе термин «первичная» в контексте первичной клетки или первичной стволовой клетки относится к клетке, которая не была трансформирована или иммортализована. Такие первичные клетки можно культивировать, субкультивировать или пассировать ограниченное количество раз (*например*, культивировать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз). В некоторых случаях первичные клетки адаптированы к условиям культивирования *in vitro*. В некоторых случаях первичные клетки выделяют из организма, системы, органа или ткани, необязательно сортируют и используют, например, напрямую, без культивирования или субкультивирования. В некоторых случаях первичные клетки стимулируют, активируют или дифференцируют. Например, первичные Т-клетки можно активировать при контакте (*например*, культивировании в присутствии) с CD3, агонистами CD28, IL-2, ИФН- γ или их комбинацией.

Используемый в данном документе термин «*ex vivo*» обычно включает эксперименты или измерения, проведенные в живой ткани или на ней, предпочтительно в искусственной среде вне организма, предпочтительно с минимальными отличиями от естественных условий.

Используемый в данном документе термин «конструкция» относится к комплексу молекул, включая макромолекулы или полинуклеотиды.

Используемый в данном документе термин «интеграция» относится к процессу стабильной вставки одного или нескольких нуклеотидов конструкции в геном клетки, т. е. ковалентного связывания с последовательностью нуклеиновой кислоты в хромосомной ДНК клетки. Он может также относиться к делециям нуклеотидов в месте интеграции. В случае делеции в сайте вставки «интеграция» может дополнительно включать замену

эндогенной последовательности или удаленного нуклеотида одним или несколькими вставленными нуклеотидами.

Используемый в данном документе термин «экзогенный» относится к молекуле или активности, которая была введена в клетку-хозяин и не является нативной для этой клетки. Молекула может быть введена, например, путем введения кодирующей нуклеиновой кислоты в генетический материал хозяина, например, путем интеграции в хромосому хозяина, или в виде нехромосомного генетического материала, такого как плазида. Таким образом, термин, используемый в связи с экспрессией кодирующей нуклеиновой кислоты, относится к введению кодирующей нуклеиновой кислоты в клетку в экспрессируемой форме. Термин «эндогенный» относится к молекуле или активности, которая присутствует в клетке-хозяине в естественных, неотредактированных условиях. Аналогично, термин, используемый в связи с экспрессией кодирующей нуклеиновой кислоты, относится к экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты, которая содержится внутри клетки и не введена экзогенно.

Термин «гетерологичный» относится к последовательности или домену нуклеиновой кислоты или полипептида, которые не являются нативными по отношению к фланкирующей последовательности, например, когда гетерологичная последовательность не встречается в природе в сочетании с последовательностями нуклеиновой кислоты или полипептида, присутствующими на одном или обоих концах.

Термин «гомологичный» относится к последовательности или домену нуклеиновой кислоты или полипептида, которые являются нативными по отношению к фланкирующей последовательности, например, когда гомологичная последовательность встречается в природе в сочетании с последовательностями нуклеиновой кислоты или полипептида, присутствующими на одном или обоих концах.

Используемый в данном документе термин «полинуклеотидная донорная конструкция» относится к нуклеотидной последовательности (например, последовательности ДНК), которая генетически вставлена в полинуклеотид и является экзогенной по отношению к этому полинуклеотиду. Полинуклеотидная донорная конструкция транскрибируется в РНК и необязательно транслируется в полипептид. Полинуклеотидная донорная конструкция может включать прокариотические последовательности, кДНК из эукариотической мРНК, последовательности геномной ДНК из эукариотической (например, млекопитающего) ДНК и синтетические последовательности ДНК. Например, полинуклеотидная донорная конструкция может представлять собой микроРНК, кшРНК, естественный полипептид (т.е. встречающийся в природе полипептид) или его фрагмент, или вариант полипептида (например, естественный полипептид, имеющий менее чем 100% идентичность последовательности с естественным полипептидом) или их фрагменты.

Используемый в данном документе термин «комплементарный» или «комплементарность» относится к специфическому спариванию оснований между нуклеотидами или нуклеиновыми кислотами. Комплементарными нуклеотидами, как

правило, являются А и Т (или А и U), а также G и C. Направляющие РНК, описанные в данном документе, могут содержать последовательности, например, нацеливающую последовательность ДНК, которые полностью комплементарны или по существу комплементарны (например, имеют 1-4 несовпадения) с геномной последовательностью в клетке.

Используемый в данном документе термин «трансген» относится к полинуклеотиду, который был перенесен естественным путем или с помощью любого из ряда методов генной инженерии из одного организма в другой. Он необязательно транслируется в полипептид. Он необязательно транслируется в рекомбинантный белок. «Рекомбинантный белок» - это белок, кодируемый геном - рекомбинантной ДНК - который был клонирован в систему, поддерживающую экспрессию гена и трансляцию матричной РНК (см. система экспрессии). Рекомбинантный белок может представлять собой терапевтическое средство, например, белок, который лечит заболевание или расстройство, описанное в данном документе. Используемый термин «трансген» может относиться к полинуклеотиду, кодирующему полипептид. Трансген также может относиться к некодирующей последовательности, такой как, помимо прочего, кшРНК, микроРНК и миР.

Термины «белок», «полипептид» и «пептид» используются в данном документе взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин «функционально связанный» или «оперативно связанный» относится к связыванию последовательности нуклеиновой кислоты с одним фрагментом нуклеиновой кислоты таким образом, что одна функция влияет на другую. Например, если промотор способен влиять на экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК (т.е. кодирующая последовательность или функциональная РНК находится под транскрипционным контролем промотора), промотор функционально связан с ней. Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с контролирующими последовательностями как в смысловой, так и в антисмысловой ориентации.

Используемый в данном документе термин «состояния развития клетки» относится, например, к состояниям, когда клетка неактивна, активно экспрессирует, дифференцируется, стареет и т. д. Состояние развития клетки может также относиться к клетке в состоянии предшественника (например, предшественник Т-клетки).

Используемый термин «кодирующий» относится к последовательности нуклеиновых кислот, которая кодирует интересующий белок или полипептид. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть молекулой либо ДНК, либо РНК. В предпочтительных вариантах осуществления молекула представляет собой молекулу ДНК. В других предпочтительных вариантах осуществления молекула представляет собой молекулу РНК. Когда она присутствует в виде молекулы РНК, она будет содержать последовательности, которые направляют рибосомы клетки-хозяина к началу трансляции (например, стартовый кодон, ATG) и направляют рибосомы к концу трансляции

(например, стоп-кодон). Между стартовым кодоном и стоп-кодоном находится открытая рамка считывания (ORF; англ.: open reading frame). Такие термины известны специалистам в данной области техники.

Термин «вставка» относится к манипуляциям с нуклеотидной последовательностью для введения ненативной последовательности. Это делается, например, с помощью ферментов рестрикции и лигаз, посредством которых интересующая последовательность ДНК, обычно кодирующая интересующий ген, может быть включена в другую молекулу нуклеиновой кислоты путем расщепления обеих молекул соответствующими ферментами рестрикции для создания совместимых перекрытий, а затем соединения молекул вместе лигазами. Специалист в данной области техники хорошо знаком с такими манипуляциями, а примеры можно найти в Sambrook et al. (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме, включая любые чертежи, фигуры и таблицы.

Используемый в данном документе термин «субъект» относится к субъекту-млекопитающему. Примеры субъектов включают людей, обезьян, собак, кошек, мышей, крыс, коров, лошадей, верблюдов, коз, кроликов, свиней и овец. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание или состояние, которое можно лечить с помощью сконструированной клетки, представленной в данном документе, или популяции клеток. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой рак.

Используемый в данном документе термин «промотор» относится к нуклеотидной последовательности (например, последовательности ДНК), способной контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. Последовательность промотора состоит из проксимальных и более дистальных восходящих элементов, причем последние элементы часто называют энхансерами. Промотор может быть полностью получен из естественных генов, может состоять из различных элементов различных промоторов, встречающихся в природе, и/или может содержать синтетические сегменты ДНК. Промотор, как предполагается в данном документе, может быть эндогенным по отношению к интересующей клетке или экзогенным по отношению к интересующей клетке. Специалистам в данной области техники понятно, что разные промоторы могут индуцировать экспрессию генов в разных типах тканей или клеток, или на разных стадиях развития, или в ответ на разные условия окружающей среды. Как известно в данной области техники, промотор можно выбрать в соответствии с силой промотора и/или условиями, при которых промотор активен, например, конститутивный промотор, сильный промотор, слабый промотор, индуцибельный/репрессируемый промотор, тканеспецифические промоторы или промоторы, регулируемые развитием, промоторы, зависящие от клеточного цикла, и т.п.

Промотор может быть индуцибельным промотором (например, промотором теплового шока, промотором, регулируемым тетрациклином, промотором, регулируемым

стероидами, промотором, регулируемым металлом, промотором, регулируемым рецептором эстрогена, и т.д.). Промотор может быть конститутивным промотором (например, промотором ЦМВ, промотором UBC). В некоторых вариантах осуществления промотор может быть промотором, ограниченным в пространстве и/или во времени (например, тканеспецифическим промотором, промотором, специфичным для определенного типа клетки, и т.д.). См., например, публикацию США № US 20180127786, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Редактирование гена, как предполагается в данном документе, может включать нокин или нокаут гена (или нуклеотидной последовательности). Используемый в данном документе термин «нокин» относится к добавлению последовательности ДНК или ее фрагмента в геном. Такие последовательности ДНК, подлежащие нокину, могут включать целый ген или гены, могут включать регуляторные последовательности, связанные с геном, или любую их часть или фрагмент. Например, полинуклеотидная донорная конструкция, кодирующая рекомбинантный белок, может быть встроена в геном клетки, несущей мутантный ген. В некоторых вариантах осуществления стратегия нокина включает замену существующей последовательности предоставленной последовательностью, например, замену мутантного аллеля копией дикого типа. С другой стороны, термин «нокаут» относится к элиминации гена или экспрессии гена. Например, ген может быть нокаутирован либо делецией, либо добавлением нуклеотидной последовательности, что приводит к нарушению рамки считывания. В качестве другого примера, ген может быть нокаутирован путем замены части гена нерелевантной (например, некодирующей) последовательностью.

Используемый в данном документе термин «негомологичное соединение концов» или NHEJ (англ.: non-homologous end joining) относится к клеточному процессу, при котором разрезанные или разорванные концы цепи ДНК непосредственно лигируют без необходимости использования гомологичной матричной нуклеиновой кислоты. NHEJ может привести к добавлению, делеции, замене, или их комбинации, одного или нескольких нуклеотидов в сайте репарации.

Используемый в данном документе термин «гомологически направленная репарация» или HDR (англ.: homology directed repair) относится к клеточному процессу, в котором разрезанные или разорванные концы цепи ДНК восстанавливаются путем полимеризации гомологичной матричной нуклеиновой кислоты. Таким образом, исходная последовательность заменяется последовательностью матрицы. Гомологическая матричная нуклеиновая кислота может быть обеспечена гомологичными последовательностями в другом месте генома (сестринские хроматиды, гомологичные хромосомы или повторяющиеся области на одной и той же или разных хромосомах). Альтернативно, экзогенная матричная нуклеиновая кислота может быть введена для получения специфического HDR-индуцированного изменения последовательности в целевом сайте. Таким образом, в месте разреза могут быть введены специфические мутации.

Используемый в данном документе термин «матрица одноцепочечной ДНК» или «матрица двухцепочечной ДНК» относится к олигонуклеотиду ДНК, который может использоваться клеткой в качестве матрицы для HDR. Как правило, матрица одноцепочечной ДНК или матрица двухцепочечной ДНК имеет по меньшей мере одну область гомологии с целевым сайтом. В некоторых случаях матрица одноцепочечной ДНК или матрица двухцепочечной ДНК имеет две гомологичные области, фланкирующие область, содержащую гетерологичную последовательность, которая должна быть вставлена в целевой участок разреза.

Термины «вектор» и «плазмида» используются взаимозаменяемо и в данном документе относятся к полинуклеотидным носителям, используемым для введения генетического материала в клетку. Векторы могут быть линейными или кольцевыми. Векторы могут интегрироваться в целевой геном клетки-хозяина или независимо реплицироваться в клетке-хозяине. Векторы могут содержать, например, точку начала репликации, сайт множественного клонирования и/или селективный маркер. Вектор экспрессии обычно содержит кассету экспрессии. Векторы и плазмиды включают, помимо прочего, интегрирующие векторы, прокариотические плазмиды, эукариотические плазмиды, растительные синтетические хромосомы, эписомы, космиды и искусственные хромосомы.

Используемая в данном документе фраза «введение» в контексте введения нуклеиновой кислоты или комплекса, содержащего нуклеиновую кислоту, например комплекса РНП-матрица ДНК, относится к перемещению последовательности нуклеиновой кислоты или комплекса РНП-матрица ДНК извне клетки внутрь клетки. В некоторых случаях введение относится к транслокации нуклеиновой кислоты или комплекса извне клетки в ядро клетки. Предложены различные способы такой транслокации, включая, помимо прочего, электропорацию, контакт с нанопроволоками или нанотрубками, рецептор-опосредованную интернализацию, транслокацию с помощью проникающих в клетку пептидов, транслокацию, опосредованную липосомами, и т.п.

Используемый в данном документе термин «кассета экспрессии» представляет собой полинуклеотидную конструкцию, созданную рекомбинантным или синтетическим путем, содержащую регуляторные последовательности, функционально связанные с выбранным полинуклеотидом для облегчения экспрессии выбранного полинуклеотида в клетке-хозяине. Например, регуляторные последовательности могут способствовать транскрипции выбранного полинуклеотида в клетке-хозяине или транскрипции и трансляции выбранного полинуклеотида в клетке-хозяине. Кассета экспрессии может быть, например, интегрирована в геном клетки-хозяина или присутствовать в векторе экспрессии.

Используемая в данном документе фраза «субъект, нуждающийся в этом» относится к субъекту, у которого проявляются и/или диагностированы один или несколько симптомов или признаков заболевания или расстройства, как описано в данном документе.

«Химиотерапевтическое средство» относится к химическому соединению, пригодному для лечения рака. Химиотерапевтические средства включают «антигормональные средства» или «эндокринные терапевтические средства», которые регулируют, уменьшают, блокируют или ингибируют эффекты гормонов, которые могут способствовать росту рака.

Термин «композиция» относится к смеси, которая содержит, например, сконструированную клетку или белок, рассматриваемые в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать дополнительные компоненты, такие как адъюванты, стабилизаторы, эксципиенты и т.п. Термин «композиция» или «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента быть эффективной при лечении субъекта, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекту в количествах, предусмотренных фармацевтической композицией.

Термин «улучшение состояния» относится к любому терапевтически благоприятному результату лечения состояния заболевания, например, онкологического заболевания, включая профилактику, уменьшение тяжести или прогрессирования, ремиссию или излечение.

Термин «*in situ*» относится к процессам, происходящим в живой клетке, растущей отдельно от живого организма, например, растущей в культуре ткани.

Термин «*in vivo*» относится к процессам, происходящим в живом организме.

Используемый в данном документе термин «млекопитающее» включает как человека, так и отличных от человека субъектов, и включает, помимо прочего, человека, отличных от человека приматов, псовых, кошачьих, мышей, крупный рогатый скот, лошадей и свиней.

Термин процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, измеренного с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (например, BLASTP и BLASTN или других алгоритмов, доступных специалистам) или путем визуального осмотра. В зависимости от применения процент «идентичности» может относиться к области сравниваемой последовательности, например, к функциональному домену, или, альтернативно, относиться ко всей длине двух сравниваемых последовательностей.

Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность выступает эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей в компьютер вводят исследуемую и эталонную последовательности, при необходимости обозначают координаты подпоследовательностей и указывают параметры программы алгоритма для

работы с последовательностями. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательности(ей) для исследуемой последовательности(ей) по отношению к эталонной последовательности, основываясь на указанных параметрах программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), алгоритма выравнивания областей гомологии по Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), метода поиска сходства по Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) или визуального осмотра (см. в целом Ausubel et al., ниже).

Одним из примеров алгоритма, подходящего для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого эффекта, например, количество, достаточное для модулирования агрегации белка в клетке.

Термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, эффективное для ослабления симптома заболевания. Терапевтически эффективное количество может быть «профилактически эффективным количеством», поскольку профилактика может рассматриваться как терапия.

Используемый в данном документе термин «эффективное количество» относится к количеству соединения (*например*, описанных в данном документе композиций, описанных в данном документе клеток), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество можно вводить за один или несколько приемов, применений или доз, и оно не предназначено для ограничения конкретным составом или путем введения. Используемый в данном документе термин «лечение» включает любой эффект, *например*, ослабление, снижение, модулирование, улучшение или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, расстройства и т.п., или к облегчению их симптома.

Термины «модулировать» и «модуляция» относятся к снижению или ингибированию или, альтернативно, к активации или увеличению указанной переменной.

Термины «увеличение» и «активация» относятся к увеличению указанной переменной на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 50 раз, в 100 раз или более.

Термины «снижение» и «ингибирование» относятся к уменьшению указанной переменной на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 50 раз, в 100 раз или более.

Следует отметить, что используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если иное явно не следует из контекста.

Рекомбинантные нуклеиновые кислоты и векторы

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены вставки рекомбинантных нуклеиновых кислот, которые содержат один или несколько трансгенов. Трансген может кодировать терапевтический белок, антитело, пептид, суицидный ген, ген апоптоза или любой другой представляющий интерес ген. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует праймирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления вставка содержит трансген праймирующего рецептора и трансген химерного антигенного рецептора.

Вставка также может содержать саморасщепляющийся пептид. Примеры саморасщепляющихся пептидов включают, помимо прочего, саморасщепляющиеся вирусные пептиды 2A, например, пептид свиного тешовируса-1 (P2A), пептид вируса *Thosea asigna* (T2A), пептид вируса ринита А лошадей (E2A) или пептид вируса ящура (F2A). Саморасщепляющиеся пептиды 2A позволяют экспрессировать несколько генных продуктов из одной конструкции. (См., например, Chang et al. "Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells," MAbs 7(2): 403-412 (2015)).

Вставка также может содержать элемент WPRE. Элементы WPRE в общем описаны в Higashimoto, T., et al. *Gene Ther* 14, 1298-1304 (2007) и Zufferey, R., et al. *J Virol*. 1999 Apr;73(4):2886-92., содержание обоих включено в данный документ посредством ссылки.

Праймирующие рецепторы

В некоторых аспектах данного изобретения праймирующий рецептор представляет собой рецептор синтетической цепи на основе белка Notch. Связывание естественного рецептора Notch с родственным лигандом, например, из семейства белков Delta, вызывает внутримембранный протеолиз, который расщепляет внутриклеточный фрагмент белка Notch. Этот внутриклеточный фрагмент является регулятором транскрипции, который функционирует только при отщеплении от Notch. Расщепление может происходить путем последовательного протеолиза металлопротеазой ADAM и комплексом гамма-секретазы. Этот внутриклеточный фрагмент проникает в ядро клетки и активирует межклеточные сигнальные гены. В отличие от естественного белка Notch, праймирующий рецептор synNotch заменяет естественный внутриклеточный фрагмент Notch фрагментом, который вызывает активацию гена, кодирующего CAR, после высвобождения из праймирующего рецептора.

Рецепторы Notch имеют модульную организацию доменов. Эктодомены рецепторов Notch состоят из серии N-концевых повторов, подобных эпидермальному фактору роста (EGF), которые ответственны за связывание лиганда. В синтетических рецепторах Notch или праймирующих рецепторах лиганд-связывающий домен Notch заменяют лиганд-связывающим доменом, который связывает выбранный лиганд- или антиген-мишень. За повторами EGF следуют три модуля повтора LIN-12/Notch (LNR), которые уникальны для рецепторов Notch, и широко известно, что они участвуют в предотвращении преждевременной активации рецепторов. Домен гетеродимеризации (ГД) Notch1 разделен фуриновым расщеплением, так что его N-концевая часть оканчивает внеклеточную субъединицу, а его С-концевая половина составляет начало трансмембранной субъединицы. После внеклеточной области рецептор содержит трансмембранный сегмент и внутриклеточный домен (ICD), включающий регулятор транскрипции.

В способах, клетках и нуклеиновых кислотах, описанных в данном документе, можно использовать несколько форм праймирующих рецепторов. Один тип праймирующего рецептора, предполагаемого для использования в способах и клетках по данному документу, содержит гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, связывающий полипептид, обладающий существенной идентичностью последовательности с рецептором Notch, включая NRR, TMD и ICD. Рецепторы «Fn Notch» содержат гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, связывающий полипептид, обладающий существенной идентичностью последовательности с рецептором Robo (например, Robo1, Robo2, Robo3 или Robo4 млекопитающих), за которым следуют 1, 2 или 3 повтора фибронектина («Fn»), TMD и ICD. Рецепторы «Mini Notch» содержат гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, связывающий полипептид, обладающий существенной идентичностью последовательности с рецептором Notch (без NRR), TMD и ICD. Рецепторы «Minimal Linker Notch» содержат гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, связывающий полипептид, не обладающий существенной идентичностью последовательности с рецептором Notch (например, синтетическая полипептидная последовательность (GGS)_n), TMD и ICD. Рецепторы «Hinge Notch» содержат гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, шарнирную последовательность, содержащую домен олигомеризации (т.е. домен, который способствует димеризации, тримеризации или мультимеризации более высокого порядка с синтетическим рецептором и/или существующим хост-рецептором), TMD и ICD. Все эти классы рецепторов являются синтетическими, рекомбинантными и не встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления не встречающиеся в природе рецепторы, описанные в данном документе, связывают лиганд, отображаемый на поверхности клетки-мишени, который запускает протеолитическое расщепление рецепторов и высвобождение регулятора транскрипции, который модулирует специальную программу транскрипции в

клетке. В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор не включает повтор LIN-12-Notch (LNR) и/или домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch.

Внеклеточный домен праймирующего рецептора

Праймирующий рецептор содержит внеклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен включает лиганд-связывающую часть рецептора. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен включает антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с одним или несколькими антигенами-мишенями. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает одну или несколько антигенсвязывающих детерминант антитела или его функционального антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из антитела, нанотела, диатела, триантитела или минитела, фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fab, одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) и однодоменного антитела (sdAb) или их функциональных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv. Антигенсвязывающий фрагмент может включать встречающиеся в природе аминокислотные последовательности или может быть сконструирован, разработан или модифицирован таким образом, чтобы обеспечить желаемые и/или улучшенные свойства, например, повышенную аффинность связывания. Антитело, которое «избирательно связывает» антиген, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который связывает антиген с высокой аффинностью и незначительно связывает другие неродственные антигены. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен связывается со щелочной фосфатазой типа зародышевых клеток (ALPG). Дополнительные антигены описаны в WO 201061872.

Трансмембранный домен

Как описано выше, химерные полипептиды по данному изобретению включают TMD, содержащий один или несколько индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления.

Как правило, TMD, подходящий для описанных в данном документе химерных рецепторов, может представлять собой любой трансмембранный домен трансмембранного рецептора типа 1, включающий по меньшей мере один сайт расщепления гамма-секретазой. Подробное описание структуры и функции гамма-секретазного комплекса, а также белков-субстратов, включая белок-предшественник амилоида (APP) и Notch, можно найти, например, в недавнем обзоре Zhang et al, *Frontiers Cell Neurosci* (2014). Подходящие TMD из трансмембранных рецепторов типа 1 включают, помимо прочего, TMD из CLSTN1, CLSTN2, APLP1, APLP2, LRP8, APP, BTC, TGBR3, SPN, CD44, CSF1R, CXCL16, CX3CL1, DCC, DLL1, DSG2, DAG1, CDH1, EPCAM, ERHA4, ERHB2, EFNB1, EFNB2, ErbB4, GHR, HLA-A и IFNAR2, при этом TMD включает по меньшей мере один сайт расщепления гамма-секретазой. Дополнительные TMD, подходящие для композиций и способов, описанных в данном документе, включают, помимо прочего,

трансмембранные домены трансмембранных рецепторов типа 1 IL1R1, IL1R2, IL6R, INSR, ERN1, ERN2, JAG2, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE4, KL, CHL1, PTPRF, SCN1B, SCN3B, NPR3, NGFR, PLXDC2, PAM, AGER, ROBO1, SORCS3, SORCS1, SORL1, SDC1, SDC2, SPN, TYR, TYRP1, DCT, YASN, FLT1, CDH5, PKHD1, NECTIN1, PCDHGC3, NRG1, LRP1B, CDH2, NRG2, PTPRK, SCN2B, Nradd и PTPRM. В некоторых вариантах осуществления TMD химерных полипептидов или рецепторов Notch по данному изобретению представляет собой TMD, полученный из TMD члена семейства кальсинтенинов, такого как алкадеин альфа и алкадеин гамма. В некоторых вариантах осуществления TMD химерных полипептидов или рецепторов Notch по данному изобретению представляет собой TMD, известный для рецепторов Notch. В некоторых вариантах осуществления TMD химерных полипептидов или рецепторов Notch по данному изобретению представляет собой TMD, полученный из другого рецептора Notch. Например, в Mini Notch, основанном на Notch1 человека, TMD Notch1 можно заменить на TMD Notch2, TMD Notch3, TMD Notch4 или TMD Notch от животного, отличного от человека, такого как *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* или *Gallus gallus*.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор содержит сайт расщепления Notch, такой как S2 или S3. Дополнительные сайты протеолитического расщепления, подходящие для композиций и способов, описанных в данном документе, включают, помимо прочего, сайт расщепления металлопротеиназой для MMP, выбранной из коллагеназы-1, -2 и -3 (MMP-1, -8 и -13), желатиназы А и В (MMP-2 и -9), стромелизина 1, 2 и 3 (MMP-3, -10 и -11), матрилизина (MMP-7) и мембранных металлопротеиназ (MT1-MMP и MT2-MMP). Другим примером подходящего сайта расщепления протеазой является сайт расщепления активатором плазминогена, например, сайт расщепления активатором плазминогена урокиназы (uPA) или активатором плазминогена в тканях (tPA). Другим примером подходящего сайта расщепления протеазой является сайт расщепления пролактина. Конкретные примеры последовательностей расщепления uPA и tPA включают последовательности, содержащие Yal-Gly-Arg. Другим примером сайта расщепления протеазой, который может быть включен в протеолитически расщепляемый линкер, является сайт расщепления протеазой вируса гравировки табака (TEV), например, Glu-Asn-Leu-Tyr-Thr-Gln-Ser (SEQ ID NO: 121), где протеаза расщепляет между глутамином и серином. Другим примером сайта расщепления протеазой, который может быть включен в протеолитически расщепляемый линкер, является сайт расщепления энтерокиназой, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO: 122), где расщепление происходит после остатка лизина. Другим примером сайта расщепления протеазой, который может быть включен в протеолитически расщепляемый линкер, является сайт расщепления тромбином, например, Leu-Val-Pro-Arg (SEQ ID NO: 123). Дополнительные подходящие линкеры, содержащие сайты расщепления протеазами, включают последовательности, расщепляемые следующими протеазами: протеаза PreScission™ (слитый белок, содержащий протеазу риновируса 3С человека и глутатион-S-трансферазу), тромбин, катепсин В, протеаза вируса Эпштейн-Барра, MMP-3

(стромелизин), MMP-7 (матрилизин), MMP-9; термолизин-подобная MMP, матриксная металлопротеиназа 2 (MMP-2), катепсин L; катепсин D, матриксная металлопротеиназа 1 (MMP-1), активатор плазминогена урокиназного типа, мембранная матриксметаллопротеиназа типа 1 (MT-MMP), стромелизин 3 (или MMP-11), термолизин, коллагеназа фибробластов и стромелизин-1, матриксная металлопротеиназа 13 (коллагеназа-3), активатор плазминогена тканевого типа (tPA), специфический антиген простаты человека, калликреин (hK3), нейтрофильная эластаза и кальпаин (нейтральная протеаза, активированная кальцием). Протеазы, которые не являются нативными для клетки-хозяина, в которой экспрессируется рецептор (например, TEV), могут использоваться в качестве дополнительного механизма регуляции, в котором активация рецептора снижается до тех пор, пока протеаза не будет экспрессирована или обеспечена иным образом. Кроме того, протеаза может быть ассоциирована с опухолью или заболеванием (экспрессируется в значительно большей степени, чем в нормальной ткани) и служить независимым механизмом регуляции. Например, некоторые матриксные металлопротеазы в значительной степени экспрессируются при определенных типах рака.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная(ые) замена(ы) в TMD включает одну или несколько замен в мотиве «GV» TMD. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из таких замен включает замену на аланин. Дополнительные последовательности и замены описаны в WO 2021061872, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Внутриклеточный домен

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор содержит один или несколько внутриклеточных доменов, происходящих от регулятора транскрипции или полученных из него. Регуляторы транскрипции либо активируют, либо репрессируют транскрипцию когнатных промоторов. Активаторы транскрипции обычно связываются рядом с промоторами транскрипции и привлекают РНК-полимеразу для непосредственной инициации транскрипции. Репрессоры транскрипции связываются с промоторами транскрипции и стерически препятствуют инициации транскрипции РНК-полимеразой. Другие регуляторы транскрипции служат либо активатором, либо репрессором в зависимости от того, где они связываются, и клеточных условий. Соответственно, используемый в данном документе термин «домен активации транскрипции» относится к домену фактора транскрипции, который взаимодействует с элементами контроля транскрипции и/или регуляторными белками транскрипции (т.е. факторами транскрипции, РНК-полимеразами и т. д.) для увеличения и/или активации транскрипции одного или нескольких генов. Неограничивающие примеры доменов активации транскрипции включают: домен активации вируса простого герпеса VP16, VP64 (который является тетрамерным производным VP16), HIV TAT, домен активации NFκB p65, домены 1 и 2 активации p53, домен активации CREB (белок, связывающий элемент ответа цАМФ), домен активации E2A, домен активации NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток), дрожжевой Gal4, дрожжевой GCN4, дрожжевой HAP1, MLL, RTG3, GLN3, OAF1,

PIP2, PDR1, PDR3, PNO4, домен активации транскрипции глюкокортикоидного рецептора LEU3, гомеодоменный белок Oct2 POU В-клеток, растительный Ap2 или любой другой, известный специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции выбран из Gal4-VP16, Gal4-VP64, tetR-VP64, ZFHD1-YP64, Gal4-KRAB и NAP1-VP16. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции представляет собой Gal4-VP64. Домен активации транскрипции может содержать последовательность дикого типа или встречающуюся в природе, или он может быть модифицированной, мутантной или производной версией исходного домена активации транскрипции, который обладает желаемой способностью увеличивать и/или активировать транскрипцию одного или нескольких генов. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции может дополнительно включать сигнал ядерной локализации.

ДНК-связывающий домен

В некоторых вариантах осуществления аспектов, описанных в данном документе, синтетический белок содержит один или несколько внутриклеточных «ДНК-связывающих доменов» (или «ДС-доменов»). Такие «ДНК-связывающие домены» относятся к специфичным для последовательности ДНК-связывающим доменам, которые связывают конкретный элемент последовательности ДНК. Соответственно, используемый в данном документе термин «специфический для последовательности ДНК-связывающий домен» относится к части белкового домена, обладающей способностью селективно связывать ДНК, имеющую специфическую заранее определенную последовательность. Специфический для последовательности ДНК-связывающий домен может содержать последовательность дикого типа или встречающуюся в природе последовательность, он может быть модифицированной, мутантной или производной версией исходного домена активации транскрипции, который обладает желаемой способностью связываться с желаемой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления специфический для последовательности ДНК-связывающий домен сконструирован для связывания желаемой последовательности. Неограничивающие примеры белков, имеющих специфический для последовательности ДНК-связывающий домен, которые можно использовать в синтетических белках, описанных в данном документе, включают HNF1a, Gal4, GCN4, обратный тетрациклиновый рецептор, THY1, SYN1, NSE/RU5', AGRP, CALB2, CAMK2A, CCK, CHAT, DLX6A, EMX1, белки цинковых пальцев или их домены, белки CRISPR/Cas, такие как Cas9, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (или CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (или CasA), Cse2 (или CasB), Cse3 (или CasE), Cse4 (или CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csz1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 и Cu196, и TALES.

В тех вариантах осуществления, где используется CRISPR/Cas-подобный белок, CRISPR/Cas-подобный белок может представлять собой белок CRISPR/Cas дикого типа,

модифицированный белок CRISPR/Cas или фрагмент белка CRISPR/Cas дикого типа или модифицированный белок CRISPR/Cas. CRISPR/Cas-подобный белок можно модифицировать для повышения аффинности и/или специфичности связывания нуклеиновых кислот, изменения ферментативной активности и/или изменения другого свойства белка. Например, нуклеазные (то есть ДНКазные, РНКазные) домены CRISPR/Cas-подобного белка могут быть модифицированы, делетированы или инактивированы. Альтернативно, CRISPR/Cas-подобный белок может быть укорочен для удаления доменов, которые не являются существенными для функций описанных в данном документе систем. Например, фермент CRISPR, который используется в качестве ДНК-связывающего белка или его домена, может быть мутирован по отношению к соответствующему ферменту дикого типа, так что мутантный CRISPR или его домен не обладают способностью расщеплять последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую целевой сайт ДНК-связывающего домена. Например, мутация D10A может быть объединена с одной или несколькими мутациями H840A, N854A или N863A для получения фермента Cas9, по существу лишённого всей активности по расщеплению ДНК.

Околосмембранный домен

ECD и TMD, или TMD и ICD могут быть связаны друг с другом с помощью связывающего полипептида, такого как околосмембранный домен. Рецепторы «SynNotch» содержат гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, связывающий полипептид, обладающий существенной идентичностью последовательности с JMD рецептора Notch (включая NRR), TMD и ICD. Рецепторы «Fn Notch» содержат гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, связывающий полипептид, обладающий существенной идентичностью последовательности с рецептором Robo (например, Robo1, Robo2, Robo3 или Robo4 млекопитающих), за которым следуют 1, 2 или 3 повтора фибронектина («Fn»), TMD и ICD. Рецепторы «Mini Notch» содержат гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, связывающий полипептид, имеющий существенную идентичность последовательности с JMD рецептора Notch, но без NRR (модули повтора LIN-12-Notch (LNR) и домен гетеродимеризации), TMD и ICD. Рецепторы «Minimal Linker Notch» содержат гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, связывающий полипептид, не обладающий существенной идентичностью последовательности с рецептором Notch (например, без ограничения, имеющий синтетическую полипептидную последовательность $(GGS)_n$), TMD и ICD. Рецепторы «Hinge Notch» содержат гетерологичный внеклеточный лиганд-связывающий домен, шарнирную последовательность, содержащую домен олигомеризации (т.е. домен, который способствует димеризации, тримеризации или мультимеризации более высокого порядка с синтетическим рецептором и/или существующим хост-рецептором), TMD и ICD.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор содержит пептид околосмембранного домена (JMD, англ.: juxtamembrane domain) между внеклеточным

доменом и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор содержит пептид околосмембранного домена (JMD) между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления пептид JMD содержит мотив LWF. Использование мотивов LWF в конструкциях рецепторов описано в патенте США № 10858443, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления пептид JMD обладает существенной идентичностью последовательности с JMD Notch1, Notch2, Notch3 и/или Notch4. В некоторых вариантах осуществления пептид JMD обладает существенной идентичностью последовательности с JMD Notch1, Notch2, Notch3 и/или Notch4, но не включает повтор LIN-12-Notch (LNR) и/или домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch1. В некоторых вариантах осуществления пептид JMD не имеет существенной идентичности последовательности с JMD Notch1, Notch2, Notch3 и/или Notch4. В некоторых вариантах осуществления пептид JMD включает домен олигомеризации, который способствует образованию димеров, тримеров или комплексов рецептора более высокого порядка. Такие пептиды JMD описаны в WO 2021061872, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

В рецепторе Mini Notch связывающий полипептид получен из последовательности JMD Notch после удаления NRR и домена HD. Последовательность JMD Notch может представлять собой последовательность из Notch1, Notch2, Notch3 или Notch4 и может быть получена из гомолога с происхождением, отличным от человеческого, например, из *Drosophila*, *Gallus*, *Danio* и т.п. В качестве полипептидного линкера можно использовать от четырех до 50 аминокислотных остатков оставшейся последовательности Notch. В некоторых вариантах осуществления длину и аминокислотный состав последовательности линкерного полипептида изменяют для изменения ориентации и/или близости ECD и TMD относительно друг друга для достижения желаемой активности химерного полипептида, такой как уровень передачи сигнала, когда лиганд индуцируется или в отсутствие лиганда.

В рецепторе Minimal Linker Notch связывающий полипептид не обладает существенной идентичностью последовательности с последовательностью JMD Notch, включая последовательность JMD Notch из Notch1, Notch2, Notch3 или Notch4 или ее гомолог с происхождением, отличным от человеческого. В качестве полипептидного линкера можно использовать от четырех до 50 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длину и аминокислотный состав последовательности линкерного полипептида изменяют для изменения ориентации и/или близости ECD и TMD относительно друг друга для достижения желаемой активности химерного полипептида по изобретению. Последовательность Minimal Linker может быть сконструирована так, чтобы включать или исключать сайт расщепления протеазой и может включать или исключать сайт гликозилирования или сайты для других типов

посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах осуществления линкер Minimal Linker не содержит сайта расщепления протеазой или сайта гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор дополнительно содержит шарнир. Шарнирные линкеры, которые можно использовать в праймирующем рецепторе, могут включать домен олигомеризации (например, шарнирный домен), содержащий один или несколько полипептидных мотивов, которые способствуют образованию олигомеров химерных полипептидов посредством межмолекулярной дисульфидной связи. В этих случаях в описанных в данном документе химерных рецепторах шарнирный домен обычно включает гибкую полипептидную соединительную область, расположенную между ECD и TMD. Таким образом, шарнирный домен обеспечивает гибкость между ECD и TMD, а также обеспечивает сайты для межмолекулярных дисульфидных связей между двумя или более мономерами химерных полипептидов с образованием олигомерного комплекса. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает мотивы, которые способствуют образованию димеров химерных полипептидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает мотивы, которые способствуют образованию тримера химерных полипептидов, описанных в данном документе (например, шарнирный домен, полученный из OX40). Шарнирные полипептидные последовательности, подходящие для композиций и способов по данному изобретению, могут быть встречающимися в природе шарнирными полипептидными последовательностями (например, из встречающихся в природе иммуноглобулинов) или могут быть сконструированы, разработаны или модифицированы таким образом, чтобы обеспечить желаемые и/или улучшенные свойства, например, модуляцию транскрипции. Подходящие шарнирные полипептидные последовательности включают, помимо прочего, последовательности, полученные из подклассов IgA, IgD и IgG, такие как шарнирный домен IgG1, шарнирный домен IgG2, шарнирный домен IgG3 и шарнирный домен IgG4 или их функциональные варианты. В некоторых вариантах осуществления шарнирная полипептидная последовательность содержит один или несколько мотивов CXXC. В некоторых вариантах осуществления шарнирная полипептидная последовательность содержит один или несколько мотивов CPPC (SEQ ID NO: 124).

Шарнирные полипептидные последовательности также могут быть получены из шарнирного домена CD8 α , шарнирного домена CD28, шарнирного домена CD152, шарнирного домена PD-1, шарнирного домена CTLA4, шарнирного домена OX40 и их функциональных вариантов. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирную полипептидную последовательность, полученную из α -шарнирного домена CD8 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирную полипептидную последовательность, полученную из шарнирного домена CD28 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирную полипептидную последовательность, полученную из шарнирного домена OX40 или его

функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирную полипептидную последовательность, полученную из шарнирного домена IgG4 или его функционального варианта.

Fn Notch-связывающий полипептид, получен из JMD Robo1, который содержит домен повтора фибронектина (Fn) с короткой полипептидной последовательностью между повторами Fn и TMD. Fn Notch-связывающий полипептид не содержит Notch-отрицательную регуляторную область (NRR) или домен HD Notch. Fn-связывающий полипептид может содержать 1, 2, 3, 4 или 5 повторов Fn. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор содержит Fn-связывающий полипептид, содержащий от около 1 до около 5 повторов Fn, от около 1 до около 3 повторов Fn или от около 2 до около 3 повторов Fn. Короткая полипептидная последовательность между повторами Fn и TMD может содержать от около 2 до около 30 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления короткая полипептидная последовательность может содержать от около 5 до около 20 аминокислот любой последовательности. В некоторых вариантах осуществления короткая полипептидная последовательность может содержать от около 5 до около 20 встречающихся в природе аминокислот любой последовательности. В некоторых вариантах осуществления короткая полипептидная последовательность может содержать от около 5 до около 20 аминокислот любой последовательности, но содержать не более одного пролина. В некоторых вариантах осуществления короткая полипептидная последовательность может содержать от около 5 до около 20 аминокислот, и около 50% или более аминокислот представляют собой глицин. В некоторых вариантах осуществления короткая полипептидная последовательность может содержать от около 5 до около 20 аминокислот, при этом аминокислоты выбраны из глицина, серина, треонина и аланина. В некоторых вариантах осуществления длина и аминокислотный состав последовательности Fn-связывающего полипептида могут варьироваться для изменения ориентации и/или близости ECD и TMD относительно друг друга для достижения желаемой активности химерного полипептида по изобретению.

Последовательность остановки переноса

В некоторых вариантах осуществления праймирующий рецептор дополнительно содержит последовательность остановки переноса (STS; англ.: stop-transfer sequence) между трансмембранным доменом и внутриклеточными доменами. STS содержит заряженную липофобную последовательность. Не ограничиваясь какой-либо теорией, STS служит мембранным якорем и, как полагают, предотвращает проникновение внутриклеточного домена в плазматическую мембрану. Использование доменов STS в праймирующих рецепторах описано в WO 2021061872, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры последовательностей STS включают последовательности STS APLP1, APLP2, APP, TGBR3, CSF1R, CXCL16, CX3CL1, DAG1, DCC, DNER, DSG2, CDH1, GHR, HLA-A, IFNAR2, IGF1R, IL1R1, ERN2, KCNE1, KCNE2, CHL1, LRPI, LRP2, LRP18, PTPRF, SCN1B, SCN3B, NPR3, NGFR, PLXDC2, PAM, AGER, ROBO1, SORCS3, SORCS1, SORL1,

SDC1, SDC2, SPN, TYR, TYRP1, DCT, VASN, FLT1, CDH5, PKTFD1, NECTIN1, KL, IL6R, EFN1, CD44, CLSTN1, LRP8, PCDHGC3, NRG1, LRP1B, JAG2, EFN2, DLL1, CLSTN2, EPCAM, EfV4, KCNE3, CDH2, NRG2, PTPRK, BTC, EPHA4, IL1R2, KCNE4, SCN2B, Nradd, PTPRM, Notch1, Notch2, Notch3 и Notch4. В некоторых вариантах осуществления STS гетерологична трансмембранному домену. В некоторых вариантах осуществления STS гомологична трансмембранному домену. Последовательности STS описаны в WO 2021061872, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Химерные антигенные рецепторы

Рекомбинантный CAR может представлять собой CAR человека, содержащий полностью человеческие последовательности, например, природные последовательности человека.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как CAR, такой как его часть антитела, дополнительно включает спейсер, который может представлять собой или включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина или ее вариант или модифицированную версию, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4 и/или область CH1/CL и/или Fc. В некоторых вариантах осуществления константная область или часть относится к IgG человека, такому как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах часть константной области служит спейсерной областью между компонентом распознавания антигена, например, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, обеспечивающую повышенный отклик клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. В некоторых примерах длина спейсера составляет около 12 аминокислот или не более 12 аминокислот. Примеры спейсеров включают спейсеры, содержащие по меньшей мере около 10-229 аминокислот, около 10-200 аминокислот, около 10-175 аминокислот, около 10-150 аминокислот, около 10-125 аминокислот, около 10-100 аминокислот, около 10-75 аминокислот, около 10-50 аминокислот, около 10-40 аминокислот, около 10-30 аминокислот, около 10-20 аминокислот или около 10-15 аминокислот, включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная область содержит около 12 аминокислот или менее, около 119 аминокислот или менее или около 229 аминокислот или менее. Примеры спейсеров включают только шарнирную область IgG4, шарнирную область IgG4, связанную с доменами CH2 и CH3, или шарнирную область IgG4, связанную с доменом CH3. Примеры спейсеров включают, помимо прочего, спейсеры, описанные в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153 или в публикации международной патентной заявки № WO2014031687. В некоторых вариантах осуществления константная область или часть представляет собой IgD.

Домен распознавания антигена рецептора, такого как CAR, может быть связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через антигенный рецепторный

комплекс, такой как комплекс ТКР, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий компонент (например, лиганд-связывающий или антигенсвязывающий домен) связан с одним или несколькими трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом. В одном варианте осуществления используют трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов рецептора, например, CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают или модифицируют путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других поверхностных мембранных белков, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления происходит либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен в некоторых аспектах получен из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают полученные из (т.е. содержат по меньшей мере трансмембранную(ые) область(и)) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137 и/или CD 154. Альтернативно, трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланина, триптофана и валина находится на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления связь осуществляется с помощью линкеров, спейсеров и/или трансмембранных доменов.

Среди внутриклеточных сигнальных доменов есть такие, которые имитируют или приближаются к сигналу через природный антигенный рецептор, сигналу через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигналу только через костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий глицин и серины, например дуплет глицин-серин, который образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом рецептора.

Рецептор, например, CAR, может включать по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых вариантах осуществления рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса ТКР, такой как цепь CD3 ТКР, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например, дзета-цепь CD3. Таким образом, в некоторых аспектах внеклеточный домен связан с одним или несколькими клеточными сигнальными модулями. В некоторых вариантах осуществления клеточные сигнальные модули включают трансмембранный домен CD3,

внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или другие трансмембранные домены CD. В некоторых вариантах осуществления рецептор, например, CAR, дополнительно включает часть одной или нескольких дополнительных молекул, таких как гамма-рецептор Fc, CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах CAR включает химерную молекулу CD3 дзета или гамма-рецептора Fc и CD8, CD4, CD25 или CD16.

В некоторых вариантах осуществления при лигировании CAR цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например Т-клетки, сконструированной для экспрессии рецептора. Например, в некоторых случаях рецептор индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, такая как секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления усеченная часть внутриклеточного сигнального домена компонента антигенного рецептора или костимулирующей молекулы используется вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен или домены включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (ТКР), а в некоторых аспектах также последовательности корецепторов, которые в естественном контексте действуют совместно с таким рецептором, инициируя передачу сигнала вслед за взаимодействием с антигенным рецептором, и/или любым производным или вариантом таких молекул, и/или любой синтетической последовательностью, которая обладает такой же функциональной способностью.

В контексте естественного ТКР полная активация обычно требует не только передачи сигналов через ТКР, но и костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления для стимуляции полной активации в рецептор также включен компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала. В других вариантах осуществления рецептор не включает компонент для генерации костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах дополнительный рецептор экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала.

Активация Т-клеток в некоторых аспектах описывается как опосредованная двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию через ТКР (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах рецептор включает один или оба таких сигнальных компонента.

В некоторых аспектах рецептор включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса ТКР. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют

стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM (англ.: immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Примеры ITAM, содержащие первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают последовательности, полученные из ТКР или CD3 дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CDS, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая(ие) сигнальная(ые) молекула(ы) в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления рецептор включает сигнальный домен и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых аспектах один и тот же рецептор включает как активирующий, так и костимулирующий компоненты.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит трансмембранный CD28 и сигнальный домен, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3 дзета). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит химерные костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления рецептор включает один или более, например, два или более, костимулирующих доменов и доменов активации, например, домен первичной активации, в цитоплазматической части. Примеры рецепторов включают внутриклеточные компоненты CD3 дзета, CD28 и 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления CAR или другой антигенный рецептор дополнительно включает маркер, такой как маркер клеточной поверхности, который можно использовать для подтверждения трансдукции или конструирования клетки для экспрессии рецептора, такого как усеченная версия рецептора клеточной поверхности, например, усеченный EGFR (tEGFR). В некоторых аспектах маркер включает полный или частичный (например, усеченную форму) CD34, рецептор фактора роста нервов (NGFR) или рецептор эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность или последовательность проскока рибосомы, например, T2A. См. WO 2014031687. В некоторых вариантах осуществления введение конструкции, кодирующей CAR и EGFRt, разделенные рибосомным переключателем T2A, может экспрессировать два белка из одной и той же конструкции, так что EGFRt можно использовать в качестве маркера для обнаружения клеток, экспрессирующих такую конструкцию. В некоторых вариантах осуществления маркер и, необязательно, линкерная последовательность могут быть любыми, как описано в опубликованной патентной заявке № WO 2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR

(tEGFR), который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как последовательность проскока рибосомы T2A.

В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой молекулу, например, белок клеточной поверхности, не встречающийся в природе на Т-клетках или не встречающийся в природе на поверхности Т-клеток, или ее часть.

В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой чужеродную молекулу, например, чужеродный белок, т. е. такой, который не распознается как «собственный» иммунной системой хозяина, которому будут адоптивно перенесены клетки.

В некоторых вариантах осуществления маркер не выполняет терапевтической функции и/или не оказывает никакого действия, кроме использования в качестве маркера для генной инженерии, например, для отбора успешно сконструированных клеток. В других вариантах осуществления маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом оказывающую некоторый желаемый эффект, например, лиганд для клетки, с которой приходится взаимодействовать *in vivo*, такой как костимулирующая или иммунная молекула контрольной точки, для усиления и/или ослабления ответов клеток при адоптивном переносе и взаимодействии с лигандом.

CAR может содержать одну или модифицированные синтетические аминокислоты вместо одной или нескольких встречающихся в природе аминокислот. Примеры модифицированных аминокислот включают, помимо прочего, аминокислоты циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α -амино-*n*-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометилцистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, (3-фенилсерин (3-гидроксифенилаланин, фенилглицин, α -нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метил-лизин, N',N'-дибензил-лизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α -аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогептанкарбоновую кислоту, α -(2-амино-2-норборман)-карбоновую кислоту, α,γ -диаминомасляную кислоту, α,γ -диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и α -третбутилглицин.

В некоторых случаях CAR называют CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах CAR первого поколения представляет собой CAR, который обеспечивает исключительно индуцируемый CD3-цепью сигнал при связывании антигена; в некоторых аспектах CAR второго поколения представляет собой CAR, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, включающий внутриклеточный сигнальный домен от костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах CAR третьего поколения в некоторых аспектах представляет собой CAR, который включает несколько костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую описанное в данном документе антитело или его фрагмент. В некоторых аспектах химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую описанное в данном документе антитело или его фрагмент и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент включают scFv или однодоменное антитело VH, а внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен дзета-цепи CD3 дзета (CD3)-цепи. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или опосредованно. В некоторых вариантах внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой из описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клетки, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах костимулирующей молекулой Т-клетки является CD28 или 41BB.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или его функциональный вариант, и сигнальная часть CD3 дзета или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или его функциональный вариант, и сигнальная часть CD3 дзета или его функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такую как молекула Ig человека, такую как шарнирная область Ig, например, шарнирная область IgG4, такой как спейсер только с шарнирной областью.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен рецептора, например, CAR, представляет собой трансмембранный домен CD28 человека или его вариант, например, трансмембранный домен из 27 аминокислот CD28 человека (номер доступа № P10747.1).

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клетки. В некоторых аспектах костимулирующей молекулой Т-клетки является CD28 или 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его

функциональный вариант или часть, такой как его домен из 41 аминокислоты и/или такой домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 41BB или его функциональный вариант или часть, например цитоплазматический домен из 42 аминокислот 4-1BB человека (номер доступа № Q07011.1) или его функциональный вариант или часть.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит стимулирующий сигнальный домен CD3 дзета человека или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3 дзета человека (номер доступа № P20963.2) или сигнальный домен CD3 дзета, как описано в патенте США № 7446190 или патенте США № 8911993.

В некоторых аспектах спейсер содержит только шарнирную область IgG, например только шарнирную область IgG4 или IgG1. В других вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнирную область Ig, например, и шарнирную область IgG4, связанную с доменами CH2 и/или CH3. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнирную область Ig, например, шарнирную область IgG4, связанную с доменами CH2 и/или CH3. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнирную область Ig, например, шарнирную область IgG4, связанную только с доменом CH3. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой или содержит богатую глицином-серином последовательность или другой гибкий линкер, например, известные гибкие линкеры.

Например, в некоторых вариантах осуществления CAR включает антитело или его фрагмент, включая одноцепочечные антитела (sdAb, например, содержащие только область VH) и scFv, описанные в данном документе, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнирную область Ig, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен CD28 и сигнальный домен CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR включает антитело или фрагмент, включая sdAb и scFv, описанные в данном документе, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнирную область Ig, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен CD28 и сигнальный домен CD3 дзета.

T-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR) представляют собой T-клетки, которые были генетически сконструированы для получения искусственного T-клеточного рецептора для применения в иммунотерапии. Химерные антигенные рецепторы представляют собой рецепторные белки, которые были сконструированы для придания T-клеткам способности нацеливаться на определенный белок. Генетическая модификация лимфоцитов (например, T-клеток) путем включения, например, CAR и введения сконструированных клеток субъекту является примером «адоптивной клеточной терапии». Используемый в данном документе термин «адоптивная клеточная терапия» иммунотерапии на основе клеток для трансфузии аутологичных или аллогенных лимфоцитов, называемых T-клетками или B-клетками. В этом CAR-терапевтическом

подходе клетки размножают и культивируют *ex vivo* и генетически модифицируют перед трансфузией.

Экспрессия CAR позволяет сконструированным Т-клеткам нацеливаться и связывать специфические белки, например, опухолевые антигены. При CAR-терапии Т-клетки отбирают у субъекта - они могут быть аутологичными Т-клетками из собственной крови субъекта или от донора, который не будет получать CAR-терапию. После выделения Т-клетки генетически модифицируют с помощью CAR, размножают *ex vivo* и вводят субъекту (*m.e.* пациенту) с помощью, например, инфузии.

CAR могут быть введены в Т-клетки с использованием, например, сайт-специфического метода. При сайт-специфической интеграции трансгенов (например, CAR) трансгены могут быть нацелены на безопасный локус или TRAC. Примеры сайт-специфических методов интеграции в безопасные локусы включают, без ограничения, зависимое от гомологии конструирование с использованием нуклеаз и независимую от гомологии целенаправленную вставку с использованием Cas9.

Сконструированные CAR-Т-клетки находят применение в иммуноонкологии. CAR, например, может быть выбран для нацеливания на специфический опухолевый антиген. Примерами рака, на который можно эффективно воздействовать с помощью CAR-Т-клеток, являются виды рака крови. В некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клеточную терапию можно использовать для лечения солидных опухолей.

Рекомбинантные клетки

Также в данном документе предложена рекомбинантная первичная иммунная клетка, содержащая по меньшей мере одну матрицу ДНК, невирусно вставленную в целевую область генома клетки, где размер матрицы ДНК больше или равен около 4,5 или 5 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.).

Клетка, содержащая вставку в целевом локусе или в безопасном сайте, как описано в данном описании, может называться сконструированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой любую клетку, от которой может происходить плюрипотентная иммунная клетка. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка может представлять собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или плюрипотентную стволовую клетку человека (HSPC). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка содержит первичные гемопоэтические клетки или первичные гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления эта сконструированная клетка представляет собой стволовую клетку, клетку человека, первичную клетку, гемопоэтическую клетку, клетку адаптивного иммунитета, клетку врожденного иммунитета, естественную клетку-киллера (NK), Т-клетку, клетку CD8⁺, клетку CD4⁺ или предшественник Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки или наивные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-

клетки представляют собой CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой CD4⁺CD8⁺ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой стволовую клетку, клетку человека, первичную клетку, гемопоэтическую клетку, клетку адаптивного иммунитета, клетку врожденного иммунитета, Т-клетку или предшественник Т-клетки. Неограничивающие примеры иммунных клеток, которые рассматриваются в данном изобретении, включают Т-клетки, В-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), клетки NKT/iNKT, макрофаги, миелоидные клетки и дендритные клетки. Неограничивающие примеры стволовых клеток, которые рассматриваются в данном изобретении, включают плюрипотентные стволовые клетки (PSC), эмбриональные стволовые клетки (ESC), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), эмбриональные стволовые клетки эмбрионального происхождения, полученные переносом ядер (ntES; ES с переносом ядер), мужские половые стволовые клетки (клетки GS), эмбриональные зародышевые клетки (клетки EG), гемопоэтические стволовые клетки/предшественники стволовых клеток (HSPC), соматические стволовые клетки (взрослые стволовые клетки), гемангиобласты, нейральные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки и стволовые клетки другого типа клеток (включая остециты, хондроциты, миоциты, сердечные миоциты, нейроны, клетки сухожилий, адипоциты, панкреоциты, гепатоциты, нефроциты и фолликулярные клетки и т. д.). В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки представляют собой Т-клетки, NK-клетки, iPSC и HSPC. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, используемые в данном изобретении, представляют собой клеточные линии человека, выращенные *in vitro* (например, преднамеренно иммортализованные клеточные линии, раковые клеточные линии и т. д.).

Также в данном документе предложены популяции клеток, включающие множество первичных иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления геном по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более клеток содержит целенаправленную вставку матрицы гетерологичной ДНК, при этом матрица ДНК имеет размер по меньшей мере около 5 т.п.н.

Способы редактирования клеток

Термины «редактирование гена» или «редактирование генома», используемые в данном документе, относятся к типу генетической манипуляции, при которой ДНК вставляют, заменяют или удаляют из генома с использованием искусственно управляемых нуклеаз или «молекулярных ножниц». Это полезный инструмент для выяснения функции и влияния специфических для последовательности генов или белков или изменения поведения клеток (например, в терапевтических целях).

Доступные в настоящее время инструменты редактирования генома включают нуклеазы цинковых пальцев (ZFN) и эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), для включения генов в безопасные локусы (например, безопасный локус сайта 1 интеграции аденоассоциированного вируса (AAVS1)). Система

DICE (обмен кассет с двойной интегразой), использующая интегразу phiC31 и интегразу Bxb1, является инструментом для целевой интеграции. Кроме того, для целенаправленной вставки генов можно использовать короткие полиндромные повторы, регулярно расположенные группами/Cas9 (CRISPR/Cas9).

Подходы к редактированию генов для конкретного сайта могут включать механизмы, зависящие от гомологии, или механизмы, независимые от гомологии.

Все способы, известные в данной области техники для целенаправленной вставки генных последовательностей, рассматриваются в способах, описанных в данном документе, для вставки конструкций в генные мишени или безопасные локусы.

В данном документе предложены способы вставки нуклеотидных последовательностей длиной более около 5 тысяч пар нуклеотидов в геном клетки в отсутствие вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность длиной более около 5 тысяч пар нуклеотидов может быть вставлена в геном первичной иммунной клетки в отсутствие вирусного вектора.

Интеграция больших нуклеиновых кислот, например нуклеиновых кислот размером более 5 тысяч пар нуклеотидов, в клетки может быть ограничена низкой эффективностью интеграции, нецелевыми эффектами и/или потерей жизнеспособности клеток. В данном документе описаны способы и композиции для достижения интеграции нуклеотидной последовательности, например, нуклеотидной последовательности размером более около 5 тысяч пар нуклеотидов, в геном клетки. В некоторых способах повышают эффективность интеграции, снижают нецелевые эффекты и/или снижают потерю жизнеспособности клеток.

На Фиг. 1 показана типичная плаزمид, кодирующая праймирующий рецептор и CAR, и схема ее включения в геном иммунной клетки. Плазмиду вводят в иммунную клетку с помощью нуклеазы, такой как CRISPR-ассоциированная система (Cas). Нуклеазу можно вводить в формате рибонуклеопротеина с направляющей РНК (нРНК), которая нацелена на специфический сайт генома иммунной клетки. Нуклеаза разрезает геномную ДНК в этом специфическом сайте. Специфический сайт может представлять собой часть генома, которая кодирует эндогенный рецептор иммунной клетки. Таким образом, разрезание генома в этом сайте приведет к тому, что иммунная клетка больше не будет экспрессировать эндогенный рецептор иммунной клетки.

Как показано на **Фиг. 1**, плаزمид может включать 5'- и 3'-направляемые гомологией ветви репарации, комплементарные последовательностям в специфическом сайте генома иммунной клетки. Комплементарные последовательности находятся по обе стороны от сайта, разрезаемого нуклеазой, что позволяет включить плазмиду в указанный сайт вставки в геноме иммунной клетки. Как только плазмид будет включена, клетка будет экспрессировать праймирующий рецептор. Однако, как было объяснено, конструкция трансгенной кассеты гарантирует, что невирусно доставленные рецепторы цепи не экспрессируют CAR до тех пор, пока праймирующий рецептор не свяжется со своим когнатным лигандом и не высвободит расщепляемый фактор транскрипции.

Фиг. 2 показана схема примерного способа получения сконструированной иммунной клетки по данному изобретению. Первоначально активируют Т-клетку. Т-клетка может быть получена от пациента. Таким образом, в данном изобретении предложены способы, в которых иммунные клетки, такие как Т-клетки, отбирают у пациента. Затем плазмиду, кодирующую CAR и праймирующий рецептор, вводят в Т-клетку. Преимущественно, плазмиды по данному изобретению можно вводить с помощью электропорации. При введении плазмиды посредством электропорации также может быть введена нуклеаза. Благодаря использованию электропорации способы по данному изобретению позволяют избежать использования вирусных векторов для введения трансгенов, что является известным препятствием в конструировании иммунных клеток. Затем Т-клетки размножают и совместно культивируют для создания достаточного количества сконструированных иммунных клеток для использования в качестве терапевтического лечения.

Способы редактирования генома клетки могут включать а) предоставление комплекса рибонуклеопротеиновый комплекс Cas9 (РНП)-матрица ДНК, содержащего: (i) РНП, при этом РНП содержит домен нуклеазы Cas9 и направляющую РНК, при этом направляющая РНК специфически гибридизуется с целевой областью генома клетки, и при этом домен нуклеазы Cas9 расщепляет целевую область для создания сайта вставки в геном клетки; и (ii) матрицу двухцепочечной или одноцепочечной ДНК, при этом размер матрицы ДНК превышает около 200 нуклеотидов, при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, гомологичные геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки, и при этом молярное соотношение РНП к матрице ДНК в комплексе составляет от около 3:1 до около 100:1; и б) введение в клетку комплекса РНП-матрица ДНК.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, обеспечивают эффективность доставки комплекса РНП-матрица ДНК по меньшей мере около 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, 99,5%, 99% или выше. В ряде случаев эффективность определяют по отношению к клеткам, жизнеспособным после введения в клетку РНП-матрица ДНК. В некоторых случаях эффективность определяют по отношению к общему количеству клеток (жизнеспособных или нежизнеспособных), в которые в клетку вводят РНП-матрица ДНК.

В качестве другого примера эффективность доставки можно определить путем количественного определения количества клеток с отредактированным геномом в популяции клеток (по сравнению с общим количеством клеток или общим количеством жизнеспособных клеток, полученным после стадии введения). Можно использовать различные способы количественной оценки редактирования генома. Эти способы включают, помимо прочего, использование нуклеазы, специфичной для несовпадения, такой как эндонуклеаза I T7; секвенирование одного или нескольких целевых локусов

(например, секвенирование по Сэнгеру клонированных фрагментов амплификации целевого локуса) и высокопроизводительное глубокое секвенирование.

В некоторых вариантах осуществления потеря жизнеспособности клеток снижается по сравнению с потерей жизнеспособности клеток после введения в клетку голый ДНК или введения ДНК в клетку с использованием вирусного вектора. Снижение может составлять снижение по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или любой процент между этими процентами. В некоторых вариантах осуществления нецелевые эффекты интеграции уменьшаются по сравнению с нецелевой интеграцией после введения голый ДНК в клетку или введения ДНК в клетку с использованием вирусного вектора. Снижение может составлять снижение по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или любой процент между этими процентами.

В некоторых случаях описанные в данном документе способы обеспечивают высокую жизнеспособность клеток, в которые вводили РНП-матрица ДНК. В некоторых случаях жизнеспособность клеток, в которые вводили РНП-матрица ДНК, составляет по меньшей мере около 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, 99,5%, 99% или выше. В некоторых случаях жизнеспособность клеток, в которые вводили РНП-матрица ДНК, составляет от около 20% до около 99%, от около 30% до около 90%, от около 35% до около 85% или 90% или выше, от около 40% до около 85% или 90% или выше, от около 50% до около 85% или 90% или выше, от около 50% до около 85% или 90% или выше, от около 60% до около 85% или 90% или выше, или от около 70% до около 85% или 90% или выше.

В способах, предложенных в данном документе, молярное соотношение РНП к матрице ДНК может составлять от около 3:1 до около 100:1. Например, молярное соотношение может составлять от около 5:1 до 10:1, от около 5:1 до около 15:1, от 5:1 до около 20:1; от 5:1 до около 25:1; от около 8:1 до около 12:1; от около 8:1 до около 15:1, от около 8:1 до около 20:1 или от около 8:1 до около 25:1.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК находится в концентрации от около 2,5 пМ до около 25 пМ. Например, концентрация матрицы ДНК может составлять около 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25 пМ или любую концентрацию между этими концентрациями.

В некоторых вариантах осуществления размер или длина матрицы ДНК превышает около 4,5 т.п.н., 5,0 т.п.н., 5,1 т.п.н., 5,2 т.п.н., 5,3 т.п.н., 5,4 т.п.н., 5,5 т.п.н., 5,6 т.п.н., 5,7 т.п.н., 5,8 т.п.н., 5,9 т.п.н., 6,0 т.п.н. т.п.н., 6,1 т.п.н., 6,2 т.п.н., 6,3 т.п.н., 6,4 т.п.н., 6,5 т.п.н., 6,6 т.п.н., 6,7 т.п.н., 6,8 т.п.н., 6,9 т.п.н., 7,0 т.п.н., 7,1 т.п.н., 7,2 т.п.н., 7,3 т.п.н., 7,4 т.п.н., 7,5 т.п.н., 7,6 т.п.н., 7,7 т.п.н., 7,8 т.п.н., 7,9 т.п.н., 8,0 т.п.н., 8,1 т.п.н., 8,2 т.п.н., 8,3 т.п.н., 8,4 т.п.н., 8,5 т.п.н., 8,6 т.п.н., 8,7 т.п.н., 8,8 т.п.н., 8,9 т.п.н., 9,0 т.п.н., 9,1 т.п.н., 9,2 т.п.н., 9,3 т.п.н., 9,4 т.п.н., 9,5 т.п.н., 9,6 т.п.н., 9,7 т.п.н., 9,8 т.п.н., 9,9 т.п.н. или 10 т.п.н., или любой размер матрицы ДНК между этими размерами. Например, размер матрицы

ДНК может составлять от около 4,5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 до около 9 т.п.н., от около 5 до около 8 т.п.н., от около 5 до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 9 т.п.н. или от около 9 т.п.н. до около 10 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления количество матрицы ДНК составляет от около 1 мкг до около 10 мкг. Например, количество матрицы ДНК может составлять от около 1 мкг до около 2 мкг, от около 1 мкг до около 3 мкг, от около 1 мкг до около 4 мкг, от около 1 мкг до около 5 мкг, от около 1 мкг до около 6 мкг, от около 1 мкг до около 7 мкг, от около 1 мкг до около 8 мкг, от около 1 мкг до около 9 мкг, от около 1 мкг до около 10 мкг. В некоторых вариантах осуществления количество матрицы ДНК составляет от около 2 мкг до около 3 мкг, от около 2 мкг до около 4 мкг, от около 2 мкг до около 5 мкг, от около 2 мкг до около 6 мкг, от около 2 мкг до около 7 мкг, от около 2 мкг до около 8 мкг, от около 2 мкг до около 9 мкг или от 2 мкг до около 10 мкг. В некоторых вариантах осуществления количество матрицы ДНК составляет от около 3 мкг до около 4 мкг, от около 3 мкг до около 5 мкг, от около 3 мкг до около 6 мкг, от около 3 мкг до около 7 мкг, от около 3 мкг до около 8 мкг, от около 3 мкг до около 9 мкг или от около 3 мкг до около 10 мкг. В некоторых вариантах осуществления количество матрицы ДНК составляет от около 4 мкг до около 5 мкг, от около 4 мкг до около 6 мкг, от около 4 мкг до около 7 мкг, от около 4 мкг до около 8 мкг, от около 4 мкг до около 9 мкг, или от около 4 мкг до около 10 мкг. В некоторых вариантах осуществления количество матрицы ДНК составляет от около 5 мкг до около 6 мкг, от около 5 мкг до около 7 мкг, от около 5 мкг до около 8 мкг, от около 5 мкг до около 9 мкг или от около 5 мкг до около 10 мкг. В некоторых вариантах осуществления количество матрицы ДНК составляет от около 6 мкг до около 7 мкг, от около 6 мкг до около 8 мкг, от около 6 мкг до около 9 мкг или от около 6 мкг до около 10 мкг. В некоторых вариантах осуществления количество матрицы ДНК составляет от около 7 мкг до около 8 мкг, от около 7 мкг до около 9 мкг или от около 7 мкг до около 10 мкг. В некоторых вариантах осуществления количество матрицы ДНК составляет от около 8 мкг до около 9 мкг или от около 8 мкг до около 10 мкг. В некоторых вариантах осуществления количество матрицы ДНК составляет от около 9 мкг до около 10 мкг.

В некоторых случаях размер матрицы ДНК является достаточно большим и матрица ДНК находится в достаточном количестве, чтобы быть смертельной, как и голая ДНК. В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК кодирует гетерологичный белок или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК кодирует по меньшей мере один ген. В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК кодирует по меньшей мере два гена. В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК кодирует один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более генов.

В некоторых вариантах осуществления матрица ДНК включает регуляторные последовательности, например промоторную последовательность и/или энхансерную последовательность, для регуляции экспрессии гетерологичного белка или его фрагмента после вставки в геном клетки.

В некоторых случаях матрица ДНК представляет собой линейную матрицу ДНК. В некоторых случаях матрица ДНК представляет собой матрицу одноцепочечной ДНК. В некоторых случаях матрица одноцепочечной ДНК представляет собой чистую матрицу одноцепочечной ДНК. Используемый в данном документе термин «чистая одноцепочечная ДНК» означает одноцепочечную ДНК, в которой по существу отсутствует другая или противоположная цепь ДНК. Под «по существу отсутствует» подразумевают, что в чистой одноцепочечной ДНК отсутствует по меньшей мере в 100 раз больше одной цепи, чем другой цепи ДНК.

В некоторых случаях комплекс РНП-матрица ДНК образуется путем инкубации РНП с матрицей ДНК в течение от менее одной минуты до около тридцати минут при температуре от около 20° С до около 25° С. Например, РНП можно инкубировать с матрицей ДНК в течение около 5 секунд, 10 секунд, 15 секунд, 20 секунд, 25 секунд, 30 секунд, 35 секунд, 40 секунд, 45 секунд, 50 секунд, 55 секунд, 1 минуты, 2 минут, 3 минут, 4 минут, 5 минут, 6 минут, 7 минут, 8 минут, 9 минут, 10 минут, 11 минут, 12 минут, 13 минут, 14 минут, 15 минут, 16 минут, 17 минут, 18 минут, 19 минут, 20 минут, 21 минуты, 22 минут, 23 минут, 24 минут, 25 минут, 26 минут, 27 минут, 28 минут, 29 минут или 30 минут или любого промежутка времени между этими точками времени, при температуре около 20° С, 21° С, 22° С, 23° С, 24° С или 25° С. В другом примере РНП можно инкубировать с матрицей ДНК в течение времени от менее чем одной минуты до около одной минуты, от менее чем одной минуты до около 5 минут, от менее чем 1 минуты до около 10 минут, в течение около 5-10 минут, в течение около 5-15 минут, в течение около 10-15 минут, в течение около 10-20 минут или в течение около 10-30 минут, при температуре от около 20° С до около 25° С. В некоторых вариантах осуществления комплекс РНП-матрица ДНК и клетка смешивают перед введением комплекса РНП-матрица ДНК в клетку.

В некоторых вариантах осуществления введение комплекса РНП-матрица ДНК включает электропорацию. Способы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса РНП-матрица ДНК могут включать описанные в приведенных в данном документе примерах. Дополнительные или альтернативные способы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса РНП-матрица ДНК могут включать описанные в WO/2006/001614 или Kim, J.A. et al. Biosens. Bioelectron. 23, 1353-1360 (2008). Дополнительные или альтернативные способы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса РНП-матрица ДНК могут включать описанные в публикации патентной заявки США № 2006/0094095; 2005/0064596 или 2006/0087522. Дополнительные или альтернативные способы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса

РНК-матрица ДНК могут включать описанные в Li, L.H. et al. *Cancer Res. Treat.* 1, 341-350 (2002); патентах США №: 6773669; 7186559; 7771984; 7991559; 6485961; 7029916 и публикации патентной заявки США № 2014/0017213 и 2012/0088842, содержание всех включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные или альтернативные способы, композиции и устройства для электропорации клеток для введения комплекса РНК-матрица ДНК могут включать описанные в Geng, T. et al. *J. Control Release* 144, 91-100 (2010) и Wang, J., et al. *Lab. Chip* 10, 2057-2061 (2010), содержание всех включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 может находиться в активной эндонуклеазной форме, так что при связывании с целевой нуклеиновой кислотой в составе комплекса с направляющей РНК или в составе комплекса с матрицей ДНК в целевую нуклеиновую кислоту вводят двухцепочечный разрыв. Двухцепочечный разрыв можно репарировать с помощью NHEJ, чтобы ввести случайные мутации, или HDR, чтобы ввести определенные мутации. В описанных в данном документе способах можно использовать различные нуклеазы Cas9. Например, можно использовать нуклеазу Cas9, для которой требуется мотив, примыкающий к протоспейсеру NGG (PAM), непосредственно 3' области, на которую нацелена направляющая РНК. Такие нуклеазы Cas9 могут быть нацелены на любую область генома, содержащую последовательность NGG. В качестве другого примера, белки Cas9 с требованиями к ортогональному мотиву PAM можно использовать для последовательностей-мишеней, которые не имеют примыкающей последовательности PAM NGG. Типичные белки Cas9 с специфичностью к последовательности ортогонального PAM включают, помимо прочего, CFP1, описанные в *Nature Methods* 10, 1116-1121 (2013), и описанные в Zetsche et al., *Cell*, Volume 163, Issue 3, p759-771, 22 October 2015, содержание обеих включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых случаях белок Cas9 представляет собой никазу, так что при связывании с целевой нуклеиновой кислотой в составе комплекса с направляющей РНК в целевую нуклеиновую кислоту вводят одноцепочечный разрыв или разрез. Пара никаз Cas9, каждая из которых связана со структурно отличающейся направляющей РНК, может быть нацелена на два проксимальных сайта целевой геномной области и, таким образом, вводит пару проксимальных одноцепочечных разрывов в целевую геномную область. Пары никаз могут обеспечить повышенную специфичность, потому что нецелевые эффекты, вероятно, приведут к одиночным разрывам, которые обычно восстанавливаются без повреждений с помощью механизмов эксцизионной репарации оснований. Типичные никазы Cas9 включают нуклеазы Cas9, имеющие мутацию D10A или H840A.

В некоторых вариантах осуществления РНК содержит нуклеазу Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК содержит никазу Cas9. В некоторых вариантах осуществления комплекс РНК-матрица ДНК содержит по меньшей мере два структурно отличающихся комплекса РНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два структурно отличающихся комплекса РНК содержат структурно отличающиеся

домены нуклеазы Cas9. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два структурно отличающихся комплекса РНП содержат структурно отличающиеся направляющие РНК. В некоторых вариантах осуществления, где по меньшей мере два структурно отличающихся комплекса РНП содержат структурно отличающиеся направляющие РНК, каждый из структурно отличающихся комплексов РНП содержит нуклеазу Cas9, и структурно отличающиеся направляющие РНК гибридизуются с противоположными цепями целевой области.

В некоторых случаях в клетку вводят множество РНП-матрица ДНК, содержащих структурно отличающиеся рибонуклеопротеидные комплексы. Например, белок Cas9 может образовывать комплекс с множеством (*например*, 2, 3, 4, 5 или более, *например*, 2-10, 5-100, 20-100) структурно отличающихся направляющих РНК для нацеливания на вставку матрицы ДНК во множестве структурно отличающихся целевых областей генома.

В способах и композициях, предложенных в данном документе, клетки включают, помимо прочего, эукариотические клетки, прокариотические клетки, клетки животных, клетки растений, клетки грибов и т.п. Необязательно клетка представляет собой клетку млекопитающего, например клетку человека. Клетка может быть *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Клетка также может быть первичной клеткой, зародышевой клеткой, стволовой клеткой или клеткой-предшественником. Клеткой-предшественником может быть, например, плюрипотентная стволовая клетка или гемопоэтическая стволовая клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную гемопоэтическую клетку или первичную гемопоэтическую стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления первичная гемопоэтическая клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой регуляторную Т-клетку, эффекторную Т-клетку или наивную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4⁺CD8⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4⁺CD8⁻ Т-клетку. Также предложены популяции любых клеток, модифицированных любым из описанных в данном документе способов. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают увеличение (размножение) популяции модифицированных клеток.

В некоторых случаях клетки извлекают у субъекта, модифицируют с использованием любого из описанных в данном документе способов и вводят пациенту. В других случаях любую из описанных в данном документе конструкций доставляют пациенту *in vivo*. См., например, патент США № 9737604 и Zhang et al. "Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy," NPG Asia Materials Volume 9, page e441 (2017), содержание обоих включено в данном документе посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления комплекс РНП-матрица ДНК вводят в от около 1×10^5 до около 2×10^6 клеток. Например, комплекс РНП-матрица ДНК может быть введен в от около 1×10^5 до около 5×10^5 клеток, от около 1×10^5 до около 1×10^6 , от 1×10^5 до около $1,5 \times 10^6$, от 1×10^5 до около 2×10^6 , от около 1×10^6 до около $1,5 \times 10^6$ клеток или от около 1×10^6 до около 2×10^6 .

В некоторых случаях способы и композиции, описанные в данном документе, можно использовать для создания, модификации, применения или контроля рекомбинантных Т-клеток, таких как Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки). Такие CAR-Т-клетки можно использовать для лечения или профилактики рака, инфекционного заболевания или аутоиммунного заболевания у субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления один или несколько генных продуктов встраивают или осуществляют нокин в Т-клетку для экспрессии гетерологичного белка (например, химерного антигенного рецептора (CAR) или праймирующего рецептора).

Сайты вставки

Способы редактирования генома Т-клетки, в частности, включают способ редактирования генома Т-клетки человека, включающий вставку последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции в целевую область в экзоне 1 гена α -субъединицы ТКР (TRAC) в Т-клетке человека. В некоторых вариантах осуществления целевая область находится в экзоне 1 константного домена гена TRAC. В других вариантах осуществления целевая область находится в экзоне 1, экзоне 2 или экзоне 3 до начала последовательности, кодирующей трансмембранный домен TCR- α .

Способы редактирования генома Т-клетки также включают способ редактирования генома Т-клетки человека, включающий вставку последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции в целевую область в экзоне 1 гена β -субъединицы ТКР (TRBC) в Т-клетке человека. В некоторых вариантах осуществления целевая область находится в экзоне 1 гена TRBC1 или TRBC2.

Способы редактирования генома Т-клетки, в частности, включают способ редактирования генома Т-клетки человека, включающий вставку последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции в целевую область безопасного геномного локуса (GSH).

[0001] Терапия редактирования генов включает, например, интеграцию векторов и сайт-специфическую интеграцию. Сайт-специфическая интеграция является многообещающей альтернативой случайной интеграции вирусных векторов, поскольку она снижает риски инсерционного мутагенеза или инсерционного онкогенеза (Kolb et al. Trends Biotechnol. 2005 23:399-406; Porteus et al. Nat Biotechnol. 2005 23:967-973; Paques et al. Curr Gen Ther. 2007 7:49-66). Тем не менее, сайт-специфическая интеграция по-прежнему сталкивается с проблемами, такими как низкая эффективность нокина, риск инсерционного онкогенеза, нестабильная и/или аномальная экспрессия соседних генов или трансгена, низкая доступность (например, в пределах 20 т.п.н. от примыкающих

генов) и *т. д.* Эти проблемы можно частично решить путем идентификации и использования безопасных локусов или безопасных сайтов (SHS), которые представляют собой сайты, в которые могут быть включены гены или генетические элементы без нарушения экспрессии или регуляции примыкающих генов.

[0002] Наиболее широко используемым из предполагаемых безопасных сайтов у человека является сайт AAVS1 на хромосоме 19q, который первоначально был идентифицирован как сайт для рекуррентной вставки аденоассоциированного вируса. Другие потенциальные SHS были идентифицированы на основе гомологии, с сайтами, впервые идентифицированными у других видов (например, человеческий гомолог пермиссивного мышинового локуса Rosa26) или среди растущего числа генов человека, которые при некоторых обстоятельствах кажутся несущественными. Одним из предполагаемых SHS этого типа является ген хемокинового рецептора CCR5, который при разрушении придает устойчивость к инфекции вируса иммунодефицита человека. Дополнительные потенциальные геномные SHS были идентифицированы у человека и в других типах клеток на основе картирования вирусных сайтов интеграции или анализов геномных ловушек, как и исходного мышинового локуса Rosa26. Три главных SHS, AAVS1, CCR5 и Rosa26, находятся в непосредственной близости от многих кодирующих белок генов и регуляторных элементов. (См. Sadelain, M., et al. (2012). Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nature reviews Cancer*, 12(1), 51-58, соответствующие содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки).

[0003] AAVS1 (также известный как локус PPP1R12C) на хромосоме 19 человека представляет собой известный SHS для размещения трансгенов (например, трансгенов ДНК) с ожидаемой функцией. Он находится в положении 19q13.42. Он имеет открытую структуру хроматина и способен к транскрипции. Каноническим локусом SHS для AAVS1 является chr19: 55 625 241-55 629 351. См. Pellenz et al. "New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion." *Human gene therapy* vol. 30,7 (2019): 814-828, соответствующие содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Типичная нацеленная на AAVS1 нРНК и его целевая последовательность представлены ниже:

Последовательность AAVS1-нРНК:
 ggggccactagggacaggatGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
 TATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGGCTTTTTTTT (SEQ ID NO: 125)

Целевая последовательность AAVS1: ggggccactagggacaggat (SEQ ID NO: 126)

[0004] CCR5, расположенный на хромосоме 3 в положении 3p21.31, кодирует главный корецептор ВИЧ-1. Нарушение этого сайта в гене CCR5 оказалось полезным при терапии ВИЧ/СПИДа и побудило к разработке нуклеаз с цинковыми пальцами, нацеленных на его третий экзон. Каноническим локусом SHS для CCR5 является chr3: 46 414 443-46 414 942. См. Pellenz et al. "New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion." *Human gene therapy* vol. 30,7 (2019): 814-828,

соответствующие содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

[0005] Мышиный локус *Rosa26* особенно полезен для генетической модификации, поскольку на него можно нацеливаться с высокой эффективностью, и он экспрессируется в большинстве исследованных типов клеток. Irion et al. 2007 ("Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells.» *Nature biotechnology* 25.12 (2007): 1477-1482, соответствующее содержание которого включено в данный документ посредством ссылки) идентифицировал человеческий гомолог, человеческий ROSA26, в хромосоме 3 (положение 3p25.3). Каноническим локусом SHS для человеческого *Rosa26* (*hRosa26*) является chr3: 9 415 082-9 414 043. См. Pellenz et al. "New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion." *Human gene therapy* vol. 30,7 (2019): 814-828, соответствующие содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

[0006] Дополнительные примеры безопасных сайтов приведены в Pellenz et al. "New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion." *Human gene therapy* vol. 30,7 (2019): 814-828, соответствующие содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Примеры дополнительных сайтов интеграции приведены в **Таблице 1**.

[0007] В некоторых вариантах осуществления безопасные сайты обеспечивают высокую экспрессию трансгена (достаточную для обеспечения функциональности трансгена или лечения интересующего заболевания) и стабильную экспрессию трансгена в течение нескольких дней, недель или месяцев. В некоторых вариантах осуществления нокаут гена в безопасном локусе улучшает функцию клетки, или ген в безопасном локусе не имеет известной функции внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления безопасный локус приводит к стабильной экспрессии трансгена *in vitro* со стимуляцией CD3/CD28 или без нее, незначительному нецелевому расщеплению, обнаруженному с помощью iGuide-Seq или CRISPR-Seq, меньшему нецелевому расщеплению по сравнению с другими локусами, обнаруженному с помощью iGuide-Seq или CRISPR-Seq, незначительной независимой от трансгена цитотоксичности, незначительной независимой от трансгена экспрессии цитокинов, незначительной независимой от трансгена экспрессии химерного антигенного рецептора, незначительной дерегуляцией или сайленсингу близлежащих генов, и расположению за пределами гена, связанного с раком.

[0008] В том смысле, как он используется, «близлежащий ген» может относиться к гену, который находится в пределах около 100 т.п.н., около 125 т.п.н., около 150 т.п.н., около 175 т.п.н., около 200 т.п.н., около 225 т.п.н., около 250 т.п.н., около 275 т.п.н., около 300 т.п.н., около 325 т.п.н., около 350 т.п.н., около 375 т.п.н., около 400 т.п.н., около 425 т.п.н., около 450 т.п.н., около 475 т.п.н., около 500 т.п.н., около 525 т.п.н., около 550 т.п.н. от безопасного локуса (сайта интеграции).

[0009] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены вставки, которые содержат один или несколько трансгенов. Трансген может кодировать

терапевтический белок, антитело, пептид, суицидный ген, ген апоптоза или любой другой представляющий интерес ген. Интеграция трансгена может привести, например, к усилению терапевтических свойств. Эти улучшенные терапевтические свойства, используемые в данном документе, относятся к усиленным терапевтическим свойствам клетки по сравнению с типичной иммунной клеткой того же нормального типа клеток. Например, НК-клетка, обладающая «усиленными терапевтическими свойствами», имеет усиленный, улучшенный и/или повышенный результат лечения по сравнению с типичной, немодифицированной и/или встречающейся в природе НК-клеткой. Терапевтические свойства иммунных клеток могут включать, помимо прочего, клеточную трансплантацию, транспорт, хоуминг, жизнеспособность, самообновление, персистенцию, контроль и регуляцию иммунного ответа, выживаемость и цитотоксичность. Терапевтические свойства иммунных клеток проявляются также: экспрессией нацеленных на антиген рецепторов; презентацией HLA или ее отсутствием; толерантностью к внутриопухолевому микроокружению; индукцией сторонних иммунных клеток и иммунной регуляцией; улучшенной целевой специфичностью со снижением; резистентностью к таким видам лечения, как химиотерапия.

[0010] Используемый в данном документе термин «размер вставки» относится к длине нуклеотидной последовательности, которая интегрируют (вставляют) в целевой локус или безопасный сайт. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет от около 4,5 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) до около 10 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.). В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет около 5000 нуклеотидов или более пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет до 4,5, 4,8, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) или соответствует размеру между указанными значениями. В некоторых вариантах осуществления размер вставки превышает 4,5, 4,8, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 т.п.н. или превышает размер между указанными значениями. В некоторых вариантах осуществления размер вставки находится в пределах диапазона 4,5-15 т.п.н. или соответствует любому значению в этом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления размер вставки находится в пределах диапазона 4,8-8,3 т.п.н. или соответствует любому значению в этом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления размер вставки находится в пределах диапазона 5-8,3 т.п.н. или соответствует любому значению в этом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления размер вставки находится в пределах диапазона 5-15 т.п.н. или соответствует любому значению в этом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления размер вставки находится в пределах диапазона 4,5-20 т.п.н. или соответствует любому значению в этом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 5-10 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-10, 5-10, 6-10, 7-10, 8-10, 9-10 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-11, 6-11, 7-11, 8-11, 9-11 или 10-11 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12 или 11-12 т.п.н. В некоторых вариантах

осуществления размер вставки составляет 4,5-13, 6-13, 7-13, 8-13, 9-13, 10-13, 11-13 или 12-13 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-14, 6-14, 7-14, 8-14, 9-14, 10-14, 11-14, 12-14 или 13-14 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-15, 6-15, 7-15, 8-15, 9-15, 10-15, 11-15, 12-15, 13-15 или 14-15 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-16, 6-16, 7-16, 8-16, 9-16, 10-16, 11-16, 12-16, 13-16, 14-16 или 15-16 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-17, 6-17, 7-17, 8-17, 9-17, 10-17, 11-17, 12-17, 13-17 или 14-17, 15-17, или 16-17 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-18, 6-18, 7-18, 8-18, 9-18, 10-18, 11-18, 12-18, 13-18, 14-18, 15-18, 16-18 или 17-18 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-19, 6-19, 7-19, 8-19, 9-19, 10-19, 11-19, 12-19, 13-19, 14-19, 15-19, 16-19, 17-19 или 18-19 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер вставки составляет 4,5-20, 6-20, 7-20, 8-20, 9-20, 10-20, 11-20, 12-20, 13-20, 14-20, 15-20, 16-20, 17-20, 18-20 или 19-20 т.п.н.

[0011] Вставки по данному изобретению относятся к молекулам нуклеиновых кислот или полинуклеотидам, вставленным в целевой локус или безопасный сайт. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность представляет собой молекулу ДНК, например, геномную ДНК, или содержит дезоксирибонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления вставка содержит меньший фрагмент ДНК, такой как плазмидная ДНК, митохондриальная ДНК или ДНК, выделенная в виде плазмиды, фосмиды, космиды, бактериальная искусственная хромосома (BAC), дрожжевая искусственная хромосома (YAC) и/или любой другой субгеномный сегмент ДНК. В некоторых вариантах осуществления вставка представляет собой молекулу РНК или содержит рибонуклеотиды. Нуклеотиды во вставке рассматриваются как встречающиеся в природе нуклеотиды, не встречающиеся в природе и модифицированные нуклеотиды. Нуклеотиды могут быть модифицированы химически или биохимически, или могут содержать не встречающиеся в природе или дериватизированные нуклеотидные основания, что будет понятно специалистам в данной области техники. Такие модификации включают, например, метки, метилирование, замену одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации. Полинуклеотиды могут находиться в любой топологической конформации, включая одноцепочечные, двухцепочечные, частично дуплексные, триплексные, шпильчатые, кольцевые конформации и другие трехмерные конформации, рассматриваемые в данной области техники.

[0012] Вставки могут иметь кодирующие и/или не кодирующие области. Вставка может содержать не кодирующую последовательность (*например*, элементы контроля, *например*, промоторную последовательность). В некоторых вариантах осуществления вставка кодирует факторы транскрипции. В некоторых вариантах осуществления вставка кодирует антигенсвязывающие рецепторы, такие как одиночные рецепторы, Т-клеточные рецепторы (ТКР), праймирующие рецепторы, CAR, моноклональные антитела (mAb) и т. д. В некоторых вариантах осуществления вставки представляют собой молекулы РНКи,

включая, помимо прочего, микроРНК, миРНК, кшРНК и др. В некоторых вариантах осуществления вставка представляет собой последовательность человека. В некоторых вариантах осуществления вставка является химерной. В некоторых вариантах осуществления вставка представляет собой мультигенную/мультимодульную терапевтическую кассету. Мультигенная/мультимодульная терапевтическая кассета относится к вставке или кассете, содержащей один или более чем один рецептор (*например*, синтетические рецепторы), другие последовательности, кодирующие экзогенный белок, некодирующие РНК, регуляторные элементы транскрипции и/или последовательности инсуляторов, и т. д.

[0013] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты вставляют в геном Т-клетки посредством невирусной доставки. В способах невирусной доставки нуклеиновая кислота может представлять собой голую ДНК или невирусную плазмиду, или вектор. Способы невирусной доставки могут представлять собой сайт-специфические методы интеграции, описанные в данном документе или известные специалистам в данной области техники. Примеры сайт-специфических методов интеграции в безопасные локусы включают, помимо прочего, зависимое от гомологии конструирование с использованием нуклеаз и независимую от гомологии направленную вставку с использованием Cas9 или других эндонуклеаз CRISPR.

В некоторых вариантах осуществления вставку интегрируют в безопасном сайте путем введения в сконструированную клетку (а) нацеленной нуклеазы, которая расщепляет целевую область в безопасном сайте для создания сайта вставки; и (b) последовательности нуклеиновой кислоты (вставки), где вставка включена в сайт вставки, *например*, с помощью HDR. Примеры способов невирусной доставки, которые можно использовать в способах по данному изобретению, представлены в заявках США № 16/568116 и 16/622843, соответствующие содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Редактирование CRISPR-Cas

Одним из эффективных примеров редактирования генов является подход CRISPR-Cas (например, CRISPR-Cas9). Этот подход включает использование направляющего полинуклеотида (например, направляющей рибонуклеиновой кислоты или нРНК) и эндонуклеазы cas (например, эндонуклеазы Cas9).

Используемый в данном документе полипептид, называемый «эндонуклеазой Cas» или обладающий «активностью эндонуклеазы Cas», относится к связанному с CRISPR (Cas) полипептиду, кодируемому геном Cas, где полипептид Cas представляет собой целевую последовательность ДНК, которая может быть расщеплена, когда она функционально связана с одним или несколькими направляющими полинуклеотидами (см., например, патент США № 8697359). Также в это определение включены варианты эндонуклеазы Cas, которые сохраняют активность эндонуклеазы, зависимую от направляющего полинуклеотида. Эндонуклеаза Cas, используемая в способе вставки донорной ДНК, подробно описанном в данном документе, представляет собой

эндонуклеазу, которая вводит двухцепочечные разрывы в ДНК в целевом сайте (например, в целевом локусе или в безопасном сайте).

Используемый в данном документе термин «направляющий полинуклеотид» относится к полинуклеотидной последовательности, способной к образованию комплекса с эндонуклеазой Cas и позволяющей эндонуклеазе Cas распознавать и расщеплять целевой сайт ДНК. Направляющий полинуклеотид может быть одинарной молекулой или двойной молекулой. Направляющая полинуклеотидная последовательность может представлять собой последовательность РНК, последовательность ДНК или их комбинацию (комбинированная последовательность РНК-ДНК). Направляющий полинуклеотид, содержащий только рибонуклеиновую кислоту, также называют «направляющей РНК». В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидную донорную конструкцию встраивают в безопасный локус с использованием направляющей РНК (нРНК) в комбинации с эндонуклеазой cas (например, эндонуклеазой Cas9).

Направляющий полинуклеотид включает домен первой нуклеотидной последовательности (также называемый вариабельным нацеливающим доменом или доменом VT), который комплементарен нуклеотидной последовательности целевой ДНК, и второй нуклеотид, взаимодействующий с полипептидом эндонуклеазы Cas. Это может быть двойная молекула (также называемая двухцепочечным направляющим полинуклеотидом), содержащая домен последовательности (называемый доменом распознавания эндонуклеазы Cas или доменом CER). Домен CER этого направляющего полинуклеотида двойной молекулы включает две отдельные молекулы, которые гибридизуются вдоль комплементарной области. Две отдельные молекулы могут представлять собой последовательности РНК, последовательности ДНК и/или комбинированные последовательности РНК-ДНК.

Редактирование генома с использованием подходов CRISPR-Cas основано на репарации сайт-специфических двухцепочечных разрывов ДНК (DSB), индуцированных РНК-направляемой эндонуклеазой Cas (например, эндонуклеазой Cas 9). Направляемая гомологией репарация (HDR) этих DSB позволяет точно редактировать геном, вводя определенные геномные изменения, включая замены оснований, вставки последовательности и делеции. Обычное редактирование генома CRISPR/Cas9 на основе HDR включает трансфекцию клеток с помощью Cas9, нРНК и донорной ДНК, содержащей гомологичные плечи, соответствующие интересующему геномному локусу.

НПТ (независимая от гомологии направленная вставка) использует независимую от гомологии стратегию на основе негомологичного соединения концов (NHEJ), и этот способ может быть более эффективным, чем HDR. Направляющие РНК (нРНК) нацелены на сайт вставки. Для НПТ донорные плазмиды не имеют плеч гомологии, и репарация DSB не происходит по пути HDR. Донорная полинуклеотидная конструкция может быть сконструирована таким образом, чтобы она включала сайт(ы) расщепления Cas9, фланкирующий(ие) ген или последовательность, подлежащие вставке. Это приводит к расщеплению Cas9 как донорной плазмиды, так и геномной целевой последовательности.

И мишень, и донор имеют тупые концы, и линейризованная плазида донорной ДНК используется по пути NHEJ, что приводит к интеграции в геномный сайт DSB. (См., например, Suzuki, K., et al. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. Nature, 540(7631), 144-149, соответствующие содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки).

Способы проведения редактирования генов с использованием подходов CRISPR-Cas известны специалистам в данной области техники. (См., например, заявки США № US 16/312676, US 15/303722 и US 15/628533, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки). Кроме того, применение эндонуклеаз для вставки трансгенов в безопасные локусы описано, например, в заявке США № 13/036343, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Направляющие РНК и/или мРНК (или ДНК), кодирующие эндонуклеазу, могут быть химически связаны с одним или несколькими фрагментами или конъюгатами, которые усиливают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение олигонуклеотида. Неограничивающие примеры таких фрагментов включают липидные фрагменты, такие как фрагмент холестерина, холевая кислота, тиозфир, тиохолестерин, алифатическая цепь (например, остатки додекандиола или ундецила), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат триэтиламмония, цепь полиамина или полиэтиленгликоля, адамантануксусная кислота, фрагмент пальмитила и фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонил-трет-оксихолестерина. См., например, патентная публикацию США № 20180127786, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Терапевтические применения

Для терапевтических применений сконструированные клетки, их популяции или их композиции вводят субъекту, обычно млекопитающему, обычно человеку, в эффективном количестве.

Сконструированные клетки можно вводить субъекту путем инфузии (*например*, непрерывной инфузии в течение определенного периода времени) или другими способами введения, известными специалистам в данной области техники.

Предложенные в данном документе сконструированные клетки находят применение не только в генной терапии, но также и в нефармацевтических целях, таких как, например, получение животных моделей и получение рекомбинантных клеточных линий, экспрессирующих интересующий белок.

Сконструированными клетками по данному изобретению могут быть любые клетки, обычно клетки млекопитающих, обычно клетки человека, которые были модифицированы путем интеграции трансгена в безопасный локус, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки представляют собой иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки представляют собой лимфоциты. В некоторых вариантах

осуществления сконструированные клетки представляют собой Т-клетки или предшественники Т-клеток.

Сконструированные клетки, композиции и способы по данному изобретению применимы для терапевтических применений, таких как терапия CAR-T-клетками и терапия ТКР-T-клетками. В некоторых вариантах осуществления вставка последовательности, кодирующей трансген, в пределах безопасного локуса поддерживает экспрессию ТКР по сравнению со случаями, когда вставка отсутствует, и обеспечивает экспрессию трансгена при сохранении функции ТКР.

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы лечения субъекта, нуждающегося в лечении, путем введения субъекту композиции, содержащей любую из сконструированных клеток, описанных в данном документе. Используемые термины «лечить», «лечение» и т.п. обычно относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Этот эффект является профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания и/или терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или нежелательных явлений, возникающих в результате заболевания. Термин «лечение», используемый в данном документе, охватывает любое лечение заболевания у субъекта (например, млекопитающего, например, человека). Лечение может также относиться к введению сконструированных клеток, представленных в данном документе, субъекту, который подвержен заболеванию, но еще не диагностирован как страдающий от него, включая предотвращение возникновения заболевания; ингибирование прогрессирования заболевания или уменьшение заболевания (т.е. вызывает регресс заболевания). Кроме того, лечение может стабилизировать или уменьшить нежелательные клинические симптомы у субъектов (например, у пациентов). Предложенные в данном документе популяции клеток или их композиции можно вводить до, во время или после возникновения заболевания или повреждения.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание, состояние и/или повреждение, которые можно лечить и/или облегчить с помощью клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в клеточной терапии, представляет собой субъекта с повреждением, заболеванием или состоянием, требующим применение клеточной терапии (например, терапии, при которой субъекту вводят клеточный материал). Однако предполагается, что можно лечить, облегчать и/или уменьшать тяжесть по меньшей мере одного симптома, связанного с повреждением, заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в клеточной терапии, включает, помимо прочего, кандидата на трансплантацию костного мозга или стволовых клеток, субъекта, получавший химиотерапию или лучевую терапию, который имеет гиперпролиферативное заболевание или рак (например, гематопоетической системы), субъекта, имеющего или подверженного риску развития гиперпролиферативного заболевания или рака, субъекта, имеющего или подверженного риску развития опухоли (например, солидной опухоли), вирусной

инфекции или вируса. Он также предназначен для охвата субъектов, страдающих или подверженных риску развития заболевания, связанного с инфекцией.

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция по данному изобретению вместе с инструкциями по применению. Инструкции по применению могут присутствовать в наборах в виде листка-вкладыша, в виде маркировки контейнера набора или его компонентов или могут быть в цифровой форме (например, на компакт-диске, по ссылке в Интернете). Набор может включать одну или несколько нуклеиновых кислот, нацеленных на геном, полинуклеотид, кодирующий нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном, сайт-направленный полипептид и/или полинуклеотид, кодирующий сайт-направленный полипептид. Также предложены дополнительные компоненты в наборах, например буфер (например, восстанавливающий буфер, стабилизирующий буфер, разбавляющий буфер) и/или один или несколько контрольных векторов.

Фармацевтические композиции

Представленные в данном документе сконструированные рекомбинантные клетки можно вводить в составе фармацевтических композиций. Эти композиции могут содержать в дополнение к одной или нескольким рекомбинантным клеткам фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала может зависеть от способа введения, т.е. перорального, внутривенного, кожного или подкожного, назального, внутримышечного, внутрибрюшинного способа. Фармацевтическая композиция может содержать один или несколько фармацевтических эксципиентов. Можно использовать любой подходящий фармацевтический эксципиент, и специалист в данной области техники способен выбрать подходящие фармацевтические эксципиенты. Соответственно, представленные ниже фармацевтические эксципиенты предназначены для иллюстрации, а не для ограничения. Дополнительные фармацевтические эксципиенты включают, например, описанные в Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe et al. (Eds.) 6th Ed. (2009), полностью включенной посредством ссылки.

В данном документе рассматривают различные способы введения дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство вводят любым подходящим способом введения. Как правило, способы введения включают, без ограничения, интравитреальный, субретинальный, супрахориоидальный, внутриартериальный, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, назальный, парентеральный, местный, легочный и подкожный способы.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблеток, капсул, порошка или жидкости. Таблетка может включать твердый носитель, такой как желатин или адьювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно

включают жидкий носитель, такой как вода, нефтепродукт, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в место поражения активный ингредиент будет находиться в форме приемлемого для парентерального введения водного раствора, который не содержит пирогенов и имеет подходящий рН, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники могут приготовить подходящие растворы, используя, например, изотонические носители, такие как хлорид натрия для инъекции, раствор Рингера для инъекций, лактата Рингера для инъекций. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Независимо от того, является ли соединение по данному изобретению полипептидом, клеткой или нуклеиновой кислотой или другим фармацевтически полезным соединением, которое должно быть введено индивиду, введение предпочтительно осуществляют в «терапевтически эффективном количестве» или «профилактически эффективном количестве» (в зависимости от случая, хотя профилактика может считаться терапией), этого достаточно, чтобы показать пользу для индивида. Фактическое вводимое количество, а также скорость и продолжительность введения будут зависеть от характера и выраженность агрегации белков при заболевании, подлежащем лечению. Назначение лечения, т.е. решения о дозировке и т. д. находятся в сфере ответственности практикующих врачей и других врачей и, как правило, учитывают расстройство, подлежащее лечению, состояние отдельного пациента, место доставки, способ введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры методов и протоколов, упомянутых выше, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980.

Композицию можно вводить отдельно или в комбинации с другими видами лечения, либо одновременно, либо последовательно, в зависимости от состояния, подлежащего лечению.

ПРИМЕРЫ

Ниже приведены примеры конкретных вариантов осуществления данного изобретения. Примеры приведены только в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения объема данного изобретения. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количеств, температур и т. д.), но, конечно, следует допустить некоторую экспериментальную ошибку и отклонение.

При практиком осуществлении данного изобретения будут использовать, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, известные специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry*

(Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B(1992).

Пример 1: Невирусное редактирование иммунных клеток с большими вставками ДНК.

Вирусная доставка генных цепей или систем затруднена из-за i) ограничений по размеру кассеты экспрессии, ii) ограничений компоновки трансгенов из-за конфликтов с биологией вирусного вектора и iii) плохой и непредсказуемой работы трансгенов в случайных сайтах интеграции. Следующие примеры демонстрируют доставку больших кассет, которая была бы невозможна с помощью доступных вирусных векторов, в определенные сайты вставок, где они обладают предсказуемой высокой эффективностью.

Получение конструкции

Для создания плазмидных конструкций для нокина была заказана синтетическая ДНК от Twist, IDT и GENEWIZ, и собрана с помощью Gibson Assembly и Golden Gate Assembly. Плазмиды содержали плечи гомологии, гомологичные последовательностям, фланкирующим целевые сайты CRISPR в геноме длиной 1,2 т.п.н.

Конструирование Т-клеток

Т-клетки обогащали из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученными из лейкопаков нормальных доноров (STEMCELL Technologies), с использованием Lymphoprep (STEMCELL Technologies) и набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies). Затем Т-клетки активировали с помощью Dynabeads CD3/CD28 в соотношении гранул к клетке 1:1 (ThermoFisher, 40203D) в среде TechMACS (Miltenyi 130-197-196), дополненной 3% человеческой сывороткой AB (Gemini Bio) и 12,5 нг/мл человеческого IL-7 и IL-15 (Miltenyi высшей степени чистоты) и культивировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 48 часов перед электропорацией.

РНП CRISPR получали путем объединения 120 мкМ мнРНК (Synthego), нацеленной на последовательность ДНК GTCAGGGTTCTGGATATCTG (TRAC, SEQ ID NO: 79), 62,5 мкМ sNLS-SpCas9-sNLS (Aldevron) и буфера P3 (Lonza) в объемном соотношении 5:1:3:6, и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Оптимальное количество плазмидной ДНК, определенное с помощью экспериментов по титрованию дозы (в диапазоне от 0,5 до 3 мкг), смешивали с 3,5 мкл РНП. Т-клетки подсчитывали, удаляли гранулы, центрифугировали при 90 × G в течение 10 минут и ресуспендировали в концентрации 10⁶ клеток/14,5 мкл P3 с добавлением добавки (Lonza). 14,5 мкл суспензии Т-клеток добавляли к смеси ДНК/РНП, переносили в 16-луночный кюветный стрип Lonza и подвергали пульсации в системе Lonza 4D-Nucleofector с кодом EH-115. Клетки оставляли на 15 минут при комнатной температуре перед переносом в 96-луночные планшеты (Sarstedt) в среде TechMACS с добавлением 12,5 нг/мл IL-7 и IL-15 человека (Miltenyi высшей степени чистоты).

Экспрессию трансгена определяли путем окрашивания антителом к Мус (Cell Signaling Technology, клон 9B11) и антителом к Flag (RnD systems, клон 1042E) и анализировали на проточном цитометре Attune NxT. Другими используемыми антителами были LIVE/DEAD для фиксации в ближнем ИК-диапазоне (Thermo Fisher), антитело к ТКР-альфа/бета (BioLegend, клон IP26), антитело к CD4 (BioLegend, клон RPA-T4), антитело к CD8 (BioLegend, клон SK1).

Индукция праймирующих рецепторов

Для оценки функциональной активности трансгена (т.е. синтетической цепи) отредактированные Т-клетки совместно культивировали с линией клеток-мишеней, экспрессирующих праймирующий антиген, в соотношении Е:Т, равном 1:1, и инкубировали в течение 24 часов. Т-клетки собирали и окрашивали антителами к Мус и к Flag для оценки экспрессии Prime-рецептора и CAR, соответственно.

На Фиг. 3 представлен обзор экспериментального протокола, используемого для демонстрации точности синтетической цепи, введенной в локус TRAC Т-клеток с использованием адаптированной трансгенной кассеты, как показано на **Фиг. 1**, и технология невирусного редактирования генов. Т-клетки включают метку FLAG, которая совместно экспрессируется с CAR, и метку мус, которая совместно экспрессируется с праймирующим рецептором (primeR; англ.: priming receptor). Готовили сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие трансгенную вставку в локусе TRAC, и для начала обеспечивали экспрессию праймирующего рецептора. Затем сконструированные иммунные клетки инкубировали в течение 24 часов с клетками-мишенями K562, экспрессирующими праймирующий антиген при соотношении Е:Т, равном 1:1. Эти клетки-мишени экспрессируют когнатный лиганд для праймирующего рецептора. Т-клетки собирали и окрашивали антителами к Мус и к Flag для оценки экспрессии праймирующего рецептора и CAR, соответственно. Индукция CAR на отредактированных Т-клетках ожидается только в присутствии праймирующего антигена. Таким образом, после достаточной инкубации с клетками-мишенями сконструированные иммунные клетки экспрессируют CAR.

На Фиг. 4 представлены результаты эксперимента. Результаты анализ считывали на проточном цитометре Attune NxT. Как показано, когда Т-клетки инкубировали отдельно или с клеткой-мишенью K562 в отсутствие лиганда праймирующего рецептора, наблюдали очень низкую экспрессию CAR, но высокие уровни экспрессии праймирующего рецептора. Это указывает на то, что праймирующий рецептор специфически экспрессируется и активируется, как предполагалось. Это также указывает на то, что в отсутствие лиганда праймирующего рецептора очень немногие клетки экспрессируют CAR. Таким образом, цепь рецептора не является «дырявой» (англ.: leaky). Когда Т-клетки инкубировали с клетками-мишенями, которые имели когнатный белок праймирующего рецептора (K562^{ALPG}), многие Т-клетки проявляли экспрессию CAR. Это указывает на то, что активация праймирующего рецептора индуцирует экспрессию CAR. Существует также соответствующее снижение экспрессии праймирующего рецептора из-

за расщепления гамма-секретазой, которая также высвобождает фактор транскрипции. Таким образом, индукция CAR наблюдалась только в присутствии праймирующего антигена и коррелировала с потерей экспрессии праймирующего рецептора. Полученные результаты показывают, что точность цепи сохраняется после доставки трансгена с использованием технологии CRISPR.

Фиг. 5 представлен обзор экспериментального протокола, используемого для демонстрации точности синтетической цепи, введенной в Т-клетки с использованием адаптированной трансгенной кассеты, как показано на **Фиг. 1**, и технология невирусного редактирования генов. Т-клетки включают метку FLAG, которая совместно экспрессируется с CAR, и метку мус, которая совместно экспрессируется с праймирующим рецептором (primeR; англ.: priming receptor). Готовили сконструированные иммунные клетки, и для начала обеспечивали экспрессию праймирующего рецептора. Затем сконструированные иммунные клетки инкубировали в течение 24 часов с клетками-мишенями, экспрессирующими праймирующий антиген при соотношении Е:Т, равном 1:1. Эти клетки-мишени экспрессируют когнатный лиганд для праймирующего рецептора. Т-клетки собирали и окрашивали антителами к Мус и к Flag для оценки экспрессии праймирующего рецептора и CAR, соответственно. Индукция CAR на отредактированных Т-клетках ожидается только в присутствии праймирующего антигена. Таким образом, после достаточной инкубации с клетками-мишенями сконструированные иммунные клетки экспрессируют CAR.

На Фиг. 6 показаны дополнительные количественные данные от двух доноров, которые показывают очень небольшой процент Т-клеток, экспрессирующих CAR в отсутствие активации праймирующим рецептором. Синтетическая цепь была доставлена в Т-клетки, полученные от 2 здоровых доноров, с использованием технологии CRISPR. Отредактированные Т-клетки совместно культивировали с клеточной линией K562, экспрессирующей когнатный праймирующий рецептор при соотношении Е:Т, равном 1:1, исходной клеточной линией K562 в качестве отрицательного контроля или с гранулами Мус в качестве положительного контроля, и инкубировали в течение 24 часов. Т-клетки собирали и окрашивали антителами к Мус и к Flag для оценки экспрессии Prime-рецептора и CAR, соответственно. Результаты анализ считывали на проточном цитометре Attune NxT. Более 30% положительных по праймирующему рецептору Т-клеток экспрессировали CAR в присутствии когнатного антигена-мишени или контрольных гранул мус. Минимальная экспрессия CAR наблюдалась на базовом уровне или при культивировании с исходной клеточной линией K562. Взятые вместе, результаты демонстрируют, что нокин синтетической цепи в локусе TRAC не нарушает его функции. Это также указывает на то, что кассета ДНК, кодирующая CAR, не является «дырявой».

Пример 2: Оценка экспрессии и функции большой цепи после невирусной вставки

GS94 является потенциальным сайтом интеграции, расположенным на дистальном плече q хромосомы 11. Он находится в пределах 180-350 т.п.н. от промоторов ETS1 и FLI1

(Фиг. 7), однако считается имеющим низкий риск для генной терапии с вектором интеграции. Оценивали экспрессию цепи и функциональный потенциал гена GS94.

Получение конструкции

Для создания плазмидных конструкций для нокина была заказана синтетическая ДНК от Twist, IDT и GENEWIZ, и собрана с помощью Gibson Assembly и Golden Gate Assembly. Плазмиды содержали плечи гомологии, гомологичные последовательностям, фланкирующим целевые сайты CRISPR в геноме длиной 1,2 т.п.н. или 450 п.н. Кассета с цепью имела длину 4558 п.н. Схема кассеты показана на **Фиг. 19А**.

T-клетки подвергли интеграции кассеты с цепью с PrimeR в сайте интеграции GS79 (TRAC), сайте интеграции GS94 и сайте интеграции GS102. Последовательности мнРНК для вставки показаны в **Таблице 1**. Клетки совместно культивировали с клетками K562 в течение 48 часов, а затем MFI CAR, индуцированный PrimeR, сравнивали с MFI PrimeR.

T-клетки, активированные Dynabead CD3-CD28, подвергали электропорации с помощью РНП мнРНК/Cas9, нацеленных на GS94, а также HDRT с плечами гомологии, направляющими HDR-опосредованную интеграцию в указанные сайты. T-клетки совместно культивировали с клетками K562, экспрессирующими мишень primeR (клетки K562 с одиночной экспрессией), на 7-й день после электропорации. Затем клетки окрашивали антителом к FLAG через 48 ч после начала совместного культивирования и анализировали на проточном цитометре Attune NxT. Результаты показали, что GS94 дает превосходную индукцию CAR с высокой экспрессией primeR после 48-часового совместного культивирования с клетками K562. См. **Фиг. 8А**. GS94 приводил к зависимой от prime-антигена экспрессии CAR, которая была примерно в два раза выше, чем экспрессия в нескольких других потенциальных сайтах интеграции, а также в сайте интеграции TRAC. Кроме того, в среднем уровень поверхностной экспрессии prime-рецептора составлял не менее 50% от уровня экспрессии при использовании сайта интеграции TRAC.

Цитотоксичность и секреция цитокинов

Чтобы оценить влияние потенциального сайта интеграции на цитотоксичность и секрецию цитокинов, T-клетки, которые подвергли интеграции кассеты с цепью с PrimeR в сайте интеграции GS79 (TRAC) и сайте интеграции GS94, совместно культивировали с клетками K562, экспрессирующими мишень PrimeR (клетки K562 с одиночной экспрессией) в течение 48 часов. Клетки обрабатывали в соотношении эффектор:клетка-мишень, равном 1:1 (E:T 1:1). Вкратце, T-клетки, полученные, как описано выше, совместно культивировали с клетками K562, экспрессирующими две мишени primeR и CAR (клетки K562 с двойной экспрессией), на 7-й день после электропорации. Через 48 часов после начала совместного культивирования супернатанты собирали и анализировали с помощью Luminesx на уровне цитокинов. Показателями цитокинов были IL-2, INF γ и TNF. Цитотоксичность анализировали путем измерения люциферазной активности оставшихся клеток-мишеней через 48 часов. Каждая из точек данных на **Фиг. 8В** представляет два повтора, а линии представляют диапазон цитотоксичности для

повторов. Как показано на **Фиг. 8В**, сайты интеграции GS94 приводили к превосходной цитотоксической способности и секреции цитокинов после 48-часового совместного культивирования с клетками K562 с двойной экспрессией.

Независимая от prime цитотоксичность

Чтобы сравнить влияние потенциального сайта интеграции на цитотоксичность по сравнению с независимой от prime цитотоксичностью, Т-клетки, которые подвергли интеграции кассеты с цепью с PrimeR в сайте интеграции GS79 (TRAC) и сайте интеграции GS94, совместно культивировали с клетками K562 с двойной экспрессией ("K562 primeR/CAR) или клетками K562, экспрессирующими только мишень CAR (K562 CAR), на 7-й день после электропорации в течение 48 часов. Были протестированы соотношения клеток Е:Т, равные 0,3, 1,0 и 3,0. См. **Фиг. 9А** и **Фиг. 9В**. Через 48 ч после начала совместного культивирования цитотоксичность анализировали путем измерения люциферазной активности оставшихся клеток-мишеней. Как показано на **Фиг. 9В**, сайт интеграции GS94 приводил к цитотоксичному потенциалу, эквивалентному сайту интеграции TRAC, и не было независимой от prime цитотоксичности.

Независимая от prime часть цитокина

Чтобы сравнить влияние потенциального сайта интеграции на цитотоксичность по сравнению с независимой от prime цитотоксичностью, Т-клетки, которые подвергли интеграции кассеты с цепью с PrimeR в сайте интеграции GS79 (TRAC) и сайте интеграции GS94, полученные, как описано выше, совместно культивировали с клетками K562 с двойной экспрессией. Группу, в которой были только клетки-мишени (Е:Т=0; только мишени), сравнивали с группой с соотношением клеток Е:Т, равным 1. После 48-часового совместного культивирования с клетками K562 с двойной экспрессией супернатант собирали и анализировали с помощью Luminex для определения уровней цитокинов для измерения секреции цитокинов IL-2, INFg и TNF. См. **Фиг. 10А** и **Фиг. 10В**. Как показано на **Фиг. 10В**, сайт интеграции GS94 приводил к секреции цитокинов, эквивалентной сайту интеграции TRAC, и не было независимой от prime секреции IL-2, INFg или TNF.

Независимая от prime экспрессия CAR

Чтобы оценить влияние потенциального сайта интеграции на независимую от prime экспрессию CAR, Т-клетки, которые подвергли интеграции кассеты с цепью с PrimeR в сайте интеграции GS79 (TRAC), сайте интеграции GS94 и сайте интеграции GS102, культивировали *in vitro* в течение 32 дней. Клетки обрабатывали повторяющейся стимуляцией CD3/CD28 на 5-й, 12-й, 19-й и 28-й дни эксперимента. На 16-й день клетки оценивали на предмет экспрессии CAR с использованием анализа проточной цитометрии. Как показано на **Фиг. 11**, активация Т-клеток посредством ТКР не приводила к независимой от PrimeR экспрессию CAR, в результате интеграции кассеты с цепью в потенциальные сайты интеграции.

Т-клетки, полученные, как описано выше, культивировали в 96-луночных планшетах с заменой среды для роста Т-клеток каждые 2 дня. В дни 5, 12, 19 и 28 Т-

клетки стимулировали с помощью Dynabeads CD3/CD28 в соотношении, равном 1:1. Клетки анализировали на предмет экспрессии PrimeR с помощью окрашивания эпитопной меткой mус и на предмет экспрессии CAR с помощью окрашивания эпитопной меткой FLAG в указанные моменты времени. Анализ потока выполняли на проточном цитометре Attune NxT.

Пример 3: Оценка стабильности экспрессии праймирующего рецептора из большой вставки в течение нескольких недель

Чтобы оценить влияние потенциальных сайтов интеграции на стабильную (устойчивую) экспрессию PrimeR, Т-клетки, которые подвергли интеграции кассеты с цепью с PrimeR в сайты интеграции, указанные на **Фиг. 12А**, культивировали *in vitro* в течение 32 дней. Вкратце, Т-клетки, полученные, как описано выше, культивировали в 96-луночных планшетах с заменой среды для роста Т-клеток каждые 2 дня. В дни 5, 12, 19 и 28 Т-клетки стимулировали повторяющейся стимуляцией с помощью Dynabeads CD3/CD28 в соотношении, равном 1:1. Анализы методом проточной цитометрии проводили на 16-й и 32-й день с использованием проточного цитометра Attune NxT. Клетки анализировали на предмет экспрессии PrimeR с помощью окрашивания эпитопной меткой mус. Как показано на **Фиг. 12А** и **12В**, сайт интеграции GS94 приводил к стабильной экспрессии PrimeR в течение по меньшей мере 4-недельного периода.

Пример 4: Оценка эффективности целевого редактирования с использованием невирусной вставки

Для оценки эффективности целевого редактирования сайтов-кандидатов нокина был использован анализ iGUIDE-Seq. Способы, использованные для проведения анализа iGUIDE-Seq, проиллюстрированы на **Фиг. 13А** и представлены в книге Nobles et al., Genome Biology (2019), содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Как показано на **Фиг. 13В**, сайт интеграции GS94 имел самую высокую эффективность целевого редактирования среди оцененных потенциальных сайтов интеграции. Как показано на **Фиг. 13С**, GS94 не привел к предполагаемому нецелевому редактированию, как это наблюдалось у двух доноров.

Пример 5: Оценка различных невирусных нокинов GSH с большими вставками

Методы

Прогнозирование Elevation: Вычислительное прогнозирование потенциальных нецелевых сайтов из (gs94) было выполнено с использованием поиска Elevation (алгоритм описан в Listgarten et al. 2018. Прогнозирование нецелевой активности для сквозного дизайна направляющих РНК CRISPR. Nat Biomed Engr 2, 37-48; программное обеспечение получено с <https://github.com/Microsoft/Elevation>). Все сайты, идентифицированные с помощью поиска Elevation, подвергали анализу с использованием rhAmp-seq.

rhAmpSeq: 49 потенциальных нецелевых сайтов для GS94, идентифицированных с помощью iGUIDE или алгоритма прогнозирования Elevation, и сайт-мишень GS94 были охарактеризованы с помощью rhAmpSeq (Integrated DNA Technologies, Inc.). Это

целенаправленное усиление позволяет проводить количественную оценку на основе NGS редактирования, происходящего одновременно на нескольких сайтах. Геномная ДНК из Т-клеток по меньшей мере от 2 доноров, которые были обработаны по отдельности каждым из следующих 7 направляющих: GS84, GS94, GS95, GS96, GS102, GS108 и GS138 (**Таблица 1**), была выделена с помощью системы очистки ДНК GenFind V3. (Beckman Coulter). Для охвата 50 локусов использовали два отдельных пула амплификации rhAmpSeq, процедуру проводили в соответствии с рекомендациями Integrated DNA Technologies для каждого из образцов. Библиотеки rhAmpSeq секвенировали на MiniSeq с Mid Output Kit (300 циклов) (Illumina). Алгоритм CRISPResso2 (<https://github.com/pinellolab/CRISPResso2>) использовали для определения процента вставок и делеций в каждом из амплифицированных локусов. Статистическую значимость (р-значение с поправкой на $FDR \leq 0,001$) с использованием критерия хи-квадрат наблюдали только для сайта GS94.

Секвенирование РНК: для оценки изменений, вызванных интеграцией в GS94 на уровне транскрипции, в сайты интеграции GS79 (TRAC), GS94 и GS102 интегрировали цепь primeR/CAR. На 6-й день после интеграции отредактированные клетки в кол-ве 1×10^6 сортировали с помощью BD FACSAria на основе экспрессии трансгена. РНК выделяли из отсортированных Т-клеток с помощью набора RNeasy (Qiagen). Очищенную РНК преобразовывали в библиотеку NGS с использованием набора TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina). Библиотеки секвенировали на приборах NovaSeq 6000 или NextSeq 550 (Illumina). Выравниватель STAR 2.7.3a (Dobin A. et al. Bioinformatics. 2013. 29:15-21) использовали для выравнивания данных секвенирования РНК с эталонным транскриптомом GRCh38 человека и для получения подсчетов количества прочтений на уровне гена. edgeR (Robinson MD et al. Bioinformatics. 2010. 26: 139-140) использовали для вычисления дифференциальной экспрессии, объединяя данные по обоим донорам. Единственные гены в пределах 300 т.п.н. от сайта GS94, ETS1 и FLI1, не были дифференциально экспрессированы в клетках с интеграцией в сайт интеграции GS94 по сравнению с клетками с интеграцией в любой из двух других локусов. При пороге р-значения с поправкой на FDR, равном 0,01, количество дифференциально экспрессируемых генов было минимальным (<100 генов по всему геному).

Независимый от цитокинов анализ роста: Чтобы оценить безопасность первичных Т-клеток с локусом KI GS94, был проведен независимый от цитокинов анализ роста для оценки потенциала онкогенной трансформации. Вкратце, первичные Т-клетки человека, которые подвергли интеграции кассеты с цепью с PrimeR/CAR в локусе GS94, размораживали и восстанавливали в течение ночи. Затем 1×10^6 клеток высевали в одну лунку 24-луночного планшета GRex, культивируя в течение 5 дней в среде с цитокинами или без них. Количество клеток и их жизнеспособность регистрировали в 0-й, 3-й и 5-й дни. В качестве положительного контроля культивировали 1×10^6 клеток Jurkat параллельно в среде без цитокинов. Как показано на **Фиг. 17**, в то время как Т-клетки KI GS94 сохраняли хорошую жизнеспособность и общее количество клеток при

культивировании с цитокином, жизнеспособность Т-клеток KI GS94 резко снижалась в течение 5 дней при культивировании без цитокина, и на 5-й день не оставалось жизнеспособных клеток. Положительный контроль клетки Jurkat сохраняли хорошую жизнеспособность и размножение без цитокина на протяжении всего анализа. В совокупности эти данные показывают, что первичные Т-клетки человека, отредактированные с помощью GS94, все еще зависят от экзогенного цитокина для роста, выживания и размножения, поэтому клеточная трансформация не вызывает беспокойства.

Полученные результаты

Специфичность реагентов CRISPR (например, SpCas9 в комплексе с мнРНК) нацеленных на локусы-кандидаты, включая GS94, оценивали с помощью iGUIDE-seq (Фиг. 14). РНП CRISPR, нацеленный на GS94, показал самый высокий процент событий захвата олигокассеты iGUIDE-seq среди всех оцененных кандидатов, а контрольные последовательности мнРНК из статьи iGUIDE-seq показали сходную специфичность с той, о которой сообщали в исходной публикации, что позволяет предположить, что анализ выполнен, как и ожидалось.

Предполагаемые нецелевые сайты были взяты из выходных данных iGUIDE-seq, что уже предполагало, что предполагаемые сайты были ложными. Дополнительные целевые участки были спрогнозированы с помощью вычислительного подхода (программный пакет Elevation). rhAmp-seq использовали для подготовки высокопроизводительных библиотек секвенирования для каждого из предполагаемых нецелевых сайтов, и этот метод применяли к образцам ДНК из Т-клеток, подвергнутых электропорации с помощью РНП CRISPR, нацеленных на потенциальные целевые сайты. Полученные данные NGS обрабатывали с помощью программного обеспечения CRISPResso2, а частоту вставок и делеций (инделей) принимали за показатель активности расщепления CRISPR, как это принято в данной области техники. Т-клетки, которые подвергали электропорации с помощью РНП CRISPR, нацеленного на GS94, не показали большей частоты инделей в наборе предполагаемых нецелевых сайтов, чем Т-клетки, обработанные РНП CRISPR, нацеленные на другие сайты, что согласуется с тем, что РНП CRISPR, нацеленный на GS94, не имеет последовательной или обнаруживаемой нецелевой активности и, следовательно, является наиболее специфичным из оцениваемого набора (Фиг. 15).

Потенциальные эффекты интеграции трансгена в сайт GS94 на регуляцию транскриптома Т-клеток оценивали путем нокина большой кассеты в этот сайт, выращивания Т-клеток в течение нескольких дней, сортировки клеток, экспрессирующих трансген внутри кассеты, а затем сбора РНК из клеток. Были подготовлены и секвенированы библиотеки секвенирования РНК, и анализ полученных данных секвенирования Illumina не выявил биологически или статистически значимых различий в экспрессии каких-либо генов в пределах 300 т.п.н. от сайта GS94 в клетках с интеграцией в GS94 по сравнению с клетками с интеграцией в сайты TRAC или GS102 (Фиг. 16). Кроме того, другие различия в экспрессии генов, которые достигли статистической

значимости, были минимальными по количеству и величине эффекта, что согласуется с тем, что они являются шумом в сравнении.

Чтобы оценить, может ли интеграция трансгена в GS94 придать трансформированный фенотип, клетки с интеграциями в сайте GS94 культивировали с цитокинами и без них *in vitro*. Клетки оставались живыми и жизнеспособными при добавлении цитокинов, но погибали без добавления цитокинов и теряли свою жизнеспособность (Фиг. 17). Положительный контроль клетки Jurkat оставались жизнеспособными и пролиферировали. В целом это указывает на то, что интеграция трансгена в GS94 не придает способности к независимому от цитокинов росту, что является отличительной чертой трансформации Т-клеток.

Пример 6: Оценка невирусной вставки большой кассеты экспрессии размером 8,3 т.п.н. в GS94

Затем вставку размером 8,3 т.п.н. вставляли в Т-клетку в безопасный локус GS94 с использованием материалов/методов, описанных ранее в **Примере 1**. Увеличение длины вставки было связано с дополнительными последовательностями, кодирующими белок, в кассете. Схема кассеты представлена на **Фиг. 19B**

Получение конструкции

Для создания плазмидных конструкций для нокина была заказана синтетическая ДНК от Twist, IDT и GENEWIZ, и собрана с помощью Gibson Assembly и Golden Gate Assembly. Плазмиды содержали плечи гомологии, гомологичные последовательностям, фланкирующим целевые сайты CRISPR в геноме длиной 1,2 т.п.н. или 450 п.н.

Конструирование Т-клеток

Т-клетки обогащали из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученными из лейкопаков нормальных доноров (STEMCELL Technologies), с использованием Lymphoprep (STEMCELL Technologies) и набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies). Затем Т-клетки активировали с помощью Dynabeads CD3/CD28 в соотношении гранул к клетке 1:1 (ThermoFisher, 40203D) в среде TexMACS (Miltenyi 130-197-196), дополненной 3% человеческой сывороткой AB (Gemini Bio) и 12,5 нг/мл человеческого IL-7 и IL-15 (Miltenyi высшей степени чистоты) и культивировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 48 часов перед электропорацией.

РНП CRISPR получали путем объединения 120 мкМ мРНК (Synthego), нацеленной на последовательность ДНК GAGCCATGCTTGGCTTACGA (GS94, SEQ ID NO: 94), 62,5 мкМ sNLS-SpCas9-sNLS (Aldevron) и буфера P3 (Lonza) в объемном соотношении 5:1:3:6, и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Оптимальное количество плазмидной ДНК, определенное с помощью экспериментов по титрованию дозы (в диапазоне от 0,5 до 3 мкг), смешивали с 3,5 мкл РНП. Т-клетки подсчитывали, удаляли гранулы, центрифугировали при 90 × G в течение 10 минут и ресуспендировали в концентрации 10⁶ клеток/14,5 мкл P3 с добавлением добавки (Lonza). 14,5 мкл суспензии Т-клеток добавляли к смеси ДНК/РНП, переносили в 384-луночный планшет Nucleocuvette Lonza и подвергали пульсации в системе Lonza HT

Nucleofector с кодом EN-115. Клетки оставляли на 15 минут при комнатной температуре перед переносом в 96-луночные планшеты (Sarstedt) в среде TechMACS с добавлением 12,5 нг/мл IL-7 и IL-15 человека (Miltenyi высшей степени чистоты).

Экспрессию трансгена определяли путем окрашивания антителом к Muc (Cell Signaling Technology, клон 9B11) и антителом к Flag (RnD systems, клон 1042E) и анализировали на проточном цитометре Attune NxT. Другими используемыми антителами были LIVE/DEAD для фиксации в ближнем ИК-диапазоне (Thermo Fisher), антитело к ТКР-альфа/бета (BioLegend, клон IP26), антитело к CD4 (BioLegend, клон RPA-T4), антитело к CD8 (BioLegend, клон SK1).

Индукция праймирующих рецепторов

Для оценки функциональной активности трансгена (т.е. синтетической цепи) отредактированные Т-клетки совместно культивировали с линией клеток-мишеней, экспрессирующей праймирующий антиген, в соотношении E:T, равном 1:1, и инкубировали в течение 24 часов. Т-клетки собирали и окрашивали антителами к Muc и к Flag для оценки экспрессии Prime-рецептора и CAR, соответственно.

Чтобы оценить, приводит ли интеграция трансгена размером 8,3 т.п.н. в GS94 к функциональному нокину, клетки культивировали с исходными клетками K562 и клетками K562, экспрессирующими когнатный праймирующий антиген, при соотношении клеток E:T равном 1:1. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии через 48 часов, как описано ранее. Клетки K562 с праймирующим антигеном индуцировали экспрессию CAR, в то время как контрольные исходные клетки K562 не индуцировали (Фиг. 18). В целом это указывает на то, что PrimeR индуцирует экспрессию CAR после введения трансгенной цепи размером 8,3 т.п.н.

Пример 7: Применение in vivo Т-клеток, содержащих кассету, экспрессирующую CAR

In vivo эффективность Т-клеток с трансгенной кассетой, экспрессирующей CAR, распознающий опухолевый антиген, или CAR, распознающий опухолевый антиген под контролем праймирующего рецептора, распознающего антиген в анатомической близости от опухоли, оценивают в отношении опухолевых клеток человека, таких как K562 сконструированных для экспрессии антигена CAR или для экспрессии антигенов, распознаваемых как праймирующим рецептором, так и CAR. Опухолевые клетки (например, в кол-ве 1e6) вводят подкожно в бок мышам NSG (Jackson Laboratories). Рост опухоли оценивают измерением размеров штангенциркулем каждые 2-4 дня. Когда объем опухоли достигает ~100 куб. мм, мышам внутривенно вводят Т-клетки в кол-ве 5e6 с кассетой с цепью с CAR или primeR-CAR, интегрированной в определенный сайт с помощью CRISPR-опосредованной вставки, или Т-клетки, сконструированные только с РНП CRISPR, или только ФСБ в качестве инъекции плацебо. Рост опухоли отслеживают и мышей подвергают эвтаназии, когда объем опухоли достигает 2000 куб. мм. Периферическую кровь берут у мышей с помощью ретроорбитальной процедуры, и используют проточную цитометрию и/или кцПЦР для наблюдения за размножением

сконструированных Т-клеток с течением времени. Во время умерщвления селезенку, кровь, опухоль и/или другую ткань анализируют с помощью проточной цитометрии, кцПЦР и/или иммуногистохимии на наличие сконструированных Т-клеток. Результаты демонстрируют, что Т-клетки, сконструированные с интеграцией кассеты в один из определенных геномных локусов, приводят к регрессии опухоли и исчезновению опухоли у мышей, которым вводили инъекции, по сравнению с Т-клетками без интеграции кассеты, и что сконструированные Т-клетки обнаруживают в периферической крови и тканях мышей, которым вводили инъекции.

Таблица 1: последовательности мнРНК

ID мнРНК	Последовательность мнРНК	Стартовый кодон GRCN38 мнРНК	Целевые локусы мнРНК	Сайт интеграции	Медианное значение (% модифицированных), приведено для 2 доноров, 2 набора праймеров
мнРНК_1	GCACCTGAATACCA CGCCTG (SEQ ID NO:1)	chr16:888118 18	APRT	APRT	79,28
мнРНК_2	CGCCTGCGATGTAG TCGATG (SEQ ID NO:2)	chr16:888115 51	APRT	APRT	78,60
мнРНК_3	CAGGACGGGCGAG ATGTCCC (SEQ ID NO:3)	chr16:888116 40	APRT	APRT	85,25
мнРНК_4	CTGAATCTTTGGAG TACCTG (SEQ ID NO:4)	chr15:447154 25	B2M	B2M	78,51
мнРНК_5	GGCCACGGAGCGA GACATCT (SEQ ID NO:5)	chr15:447115 50	B2M	B2M	94,75
мнРНК_6	AAGTCAACTTCAAT GTCGGA (SEQ ID	chr15:447155 15	B2M	B2M	70,97

	NO:6)				
MHPHK_7	GCTTGGAGGCCTGA TCAGCG (SEQ ID NO:7)	chr19:361411 11	CAPNS1	CAPNS1	89,34
MHPHK_8	CTTATCTCTTCGCA GCGAGG (SEQ ID NO:8)	chr19:361423 01	CAPNS1	CAPNS1	91,09
MHPHK_9	CACACATTACTCCA ACATTG (SEQ ID NO:9)	chr19:361426 76	CAPNS1	CAPNS1	71,98
MHPHK_10	TTCCGCAAATAGA GCCCCA (SEQ ID NO:10)	chr3:1057460 19	CBLB	CBLB	91,55
MHPHK_11	TGCACAGAACTATC GTACCA (SEQ ID NO:11)	chr3:1057516 22	CBLB	CBLB	91,43
MHPHK_12	GCAATAAGACTCTT TAAAGA (SEQ ID NO:12)	chr3:1058534 70	CBLB	CBLB	76,18
MHPHK_13	CAAAGAGATTACGA ATGCCT (SEQ ID NO:13)	chr1:1167546 58	CD2	CD2	89,80
MHPHK_14	CAAGGCACCCCAGG TTCCA (SEQ ID NO:14)	chr1:1167546 63	CD2	CD2	92,70
MHPHK_15	TTACGAATGCCTTG GAAACC (SEQ ID NO:15)	chr1:1167546 66	CD2	CD2	92,82
MHPHK_16	CAGAGACGCATCTG ACCCTC (SEQ ID NO:16)	chr11:118315 540	CD3E	CD3E	90,96
MHPHK_17	CATGCAGTTCTCAC ACACTG (SEQ ID NO:17)	chr11:118313 715	CD3E	CD3E	87,47

MHPHK_1 8	GTGTGAGAACTGCA TGGAGA (SEQ ID NO:18)	chr11:118313 715	CD3E	CD3E	86,65
MHPHK_1 9	TCTCATTTTCAGGAA ACCACT (SEQ ID NO:19)	chr11:118349 748	CD3G	CD3G	87,24
MHPHK_2 0	AGTCATACACCTTA ACCAAG (SEQ ID NO:20)	chr11:118349 754	CD3G	CD3G	87,99
MHPHK_2 1	TTCAAGGAAACCAG TTGAGG (SEQ ID NO:21)	chr11:118352 458	CD3G	CD3G	86,55
MHPHK_2 2	GAGCCTTGCCTGGA AATCTG (SEQ ID NO:22)	chr11:611181 77	CD5	CD5	84,03
MHPHK_2 3	AAGCGTCAAAGTC TGCCAG (SEQ ID NO:23)	chr11:611183 24	CD5	CD5	89,19
MHPHK_2 4	CGTTCCAACCTCGAA GTGCCA (SEQ ID NO: 24)	chr11:611181 21	CD5	CD5	83,11
MHPHK_2 5	GAGCGACTGGGAC ACGGTGA (SEQ ID NO:25)	chr9:1368662 46	EDF1	EDF1	88,84
MHPHK_2 6	GCTGCGCAAGAAG GGCCCTA (SEQ ID NO:26)	chr9:1368662 11	EDF1	EDF1	91,04
MHPHK_2 7	TTGTTCTGGCCAGC AGCCCC (SEQ ID NO: 27)	chr9:1368634 33	EDF1	EDF1	85,98
MHPHK_2 8	CTTCCAGAGCCACA TCATCG (SEQ ID NO:28)	chr19:489657 91	FTL	FTL	93,10
MHPHK_2	GGGACTCACCAGAG	chr19:489656	FTL	FTL	88,86

9	AGAGGT (SEQ ID NO:29)	01			
MHPHK_30	CGGTTCGAAATAGAA GCCCTA (SEQ ID NO:30)	chr19:48965770	FTL	FTL	93,14
MHPHK_31	AAAAGGATATTGTG CAACTG (SEQ ID NO:31)	chr10:87933015	PTEN	PTEN	92,37
MHPHK_32	TGTGCATATTTATT ACATCG (SEQ ID NO:32)	chr10:87933183	PTEN	PTEN	90,64
MHPHK_33	TTTGTGAAGATCTT GACCAA (SEQ ID NO:33)	chr10:87933087	PTEN	PTEN	85,36
MHPHK_34	TGTCATGCTGAACC GCATTG (SEQ ID NO:34)	chr18:12830972	PTPN2	PTPN2	87,94
MHPHK_35	CCACTCTATGAGGA TAGTCA (SEQ ID NO:35)	chr18:12859219	PTPN2	PTPN2	92,45
MHPHK_36	TTGACATAGAAGAG GCACAA (SEQ ID NO:36)	chr18:12836828	PTPN2	PTPN2	93,96
MHPHK_37	GAGTACTACTCA GCAGCA (SEQ ID NO:37)	chr12:6952098	PTPN6	PTPN6	89,61
MHPHK_38	TCACGCACAAGAAA CGTCCA (SEQ ID NO:38)	chr12:6954872	PTPN6	PTPN6	82,74
MHPHK_39	AGGTCTCGGTGAAA CCACCT (SEQ ID NO:39)	chr12:6951610	PTPN6	PTPN6	91,27
MHPHK_40	AGCATTATCCAAAG AGTCCG (SEQ ID NO:40)	chr1:198696873	PTPRC	PTPRC	88,88

	NO:40)				
MHPHK_4 1	ATATTAATTCTTAC CAGTGG (SEQ ID NO:41)	chr1:1986923 70	PTPRC	PTPRC	88,95
MHPHK_4 2	AGCTTTAAATCAAG GTTCAT (SEQ ID NO:42)	chr1:1987561 76	PTPRC	PTPRC	96,89
MHPHK_4 3	ATCCCGAGCCCTAA GGTGCA (SEQ ID NO:43)	chr11:674363 25	PTPRCAP	PTPRCA P	84,08
MHPHK_4 4	GGCAGCGCGGAGG ACAGCGT (SEQ ID NO:44)	chr11:674362 85	PTPRCAP	PTPRCA P	97,74
MHPHK_4 5	CTCAGGGGGCTACT ACCACC (SEQ ID NO:45)	chr11:674361 70	PTPRCAP	PTPRCA P	91,50
MHPHK_4 6	GTCACCGACGAGAC CAGAAG (SEQ ID NO:46)	chr5:8227781 0	RPS23	RPS23	79,40
MHPHK_4 7	GTCGTGGACTTCGT ACTGCT (SEQ ID NO:47)	chr5:8227784 3	RPS23	RPS23	83,07
MHPHK_4 8	TAATTTTTAGGCAA GTGTCTG (SEQ ID NO:48)	chr5:8227786 0	RPS23	RPS23	61,94
MHPHK_4 9	TTAGCTGTTAGACT TGAATA (SEQ ID NO:49)	chr14:519938 10	RTRAF	RTRAF	85,50
MHPHK_5 0	CGAGAGCCGTCAAC TTGCGT (SEQ ID NO:50)	chr14:519896 52	RTRAF	RTRAF	85,64
MHPHK_5 1	CGGCTTCAACTGCA AAGGTG (SEQ ID NO:51)	chr14:519897 00	RTRAF	RTRAF	88,77

MHPHK_5 2	TATGAAAAAGCAG AGCGACT (SEQ ID NO:52)	chr15:437930 25	SERF2	SERF2	89,61
MHPHK_5 3	TCTGGCGGGCGAGC TCACGC (SEQ ID NO:53)	chr15:437929 89	SERF2	SERF2	86,73
MHPHK_5 4	CTCACGCTGGTTAC CGCCTA (SEQ ID NO:54)	chr15:437929 77	SERF2	SERF2	80,57
MHPHK_5 5	AAAGATTACGAACT TCCCTG (SEQ ID NO:55)	chr12:462075 59	SLC38A1	SLC38A 1	92,24
MHPHK_5 6	GTAAAAACAGACA TGCCTA (SEQ ID NO:56)	chr12:462292 32	SLC38A1	SLC38A 1	91,51
MHPHK_5 7	ATGCCTAAGGAGGT TGTACC (SEQ ID NO:57)	chr12:462292 46	SLC38A1	SLC38A 1	79,48
MHPHK_5 8	CTCCAGGTATCCCA TCGAAA (SEQ ID NO:58)	chr18:478694 18	SMAD2	SMAD2	79,53
MHPHK_5 9	CACCAAATACGATA GATCAG (SEQ ID NO:59)	chr18:478705 32	SMAD2	SMAD2	86,61
MHPHK_6 0	TGGCGGCGTGAATG GCAAGA (SEQ ID NO:60)	chr18:478967 29	SMAD2	SMAD2	82,91
MHPHK_6 1	TAGGATGGTAGCAC ACAACC (SEQ ID NO:61)	chr16:112554 78	SOCS1	SOCS1	92,25
MHPHK_6 2	CAGCAGCAGAGCCC CGACGG (SEQ ID NO:62)	chr16:112554 32	SOCS1	SOCS1	83,79
MHPHK_6	CGGCGTGCGAACGG	chr16:112552	SOCS1	SOCS1	84,24

3	AATGTG (SEQ ID NO:63)	96			
MHPHK_6 4	TATAGACGCTGCCC GACGTC (SEQ ID NO:64)	chr15:400388 95	SRP14	SRP14	95,12
MHPHK_6 5	TCCAAAGAAGGGTA CTGTGG (SEQ ID NO:65)	chr15:400383 68	SRP14	SRP14	92,14
MHPHK_6 6	ACAGTACCCTTCTT TGGAAT (SEQ ID NO:66)	chr15:400383 58	SRP14	SRP14	65,82
MHPHK_6 7	GCGACGGGCGCATC TACGTG (SEQ ID NO:67)	chr12:120469 572	SRSF9	SRSF9	83,68
MHPHK_6 8	CCCGACCTCCATAA GTCCTG (SEQ ID NO:68)	chr12:120465 700	SRSF9	SRSF9	92,56
MHPHK_6 9	GGGTCCTCGAAGC GCACGA (SEQ ID NO:69)	chr12:120469 426	SRSF9	SRSF9	89,94
MHPHK_7 0	TGCTCTGTTTAGAA GATGAC (SEQ ID NO:70)	chr5:3259164 1	SUB1	SUB1	79,36
MHPHK_7 1	ATATTCTTTTCTAGT TAAAG (SEQ ID NO:71)	chr5:3259156 6	SUB1	SUB1	70,93
MHPHK_7 2	CCTGTAAAGAAACA AAAGAC (SEQ ID NO:72)	chr5:3259161 4	SUB1	SUB1	93,66
MHPHK_7 3	TGGAGAAAGACGT AACTTCG (SEQ ID NO:73)	chr4:1052343 15	TET2	TET2	83,53
MHPHK_7 4	TCTGCCCTGAGGTA TGCGAT (SEQ ID NO:74)	chr4:1052347 47	TET2	TET2	90,97

	NO:74)				
MHPHK_7 5	ATTCCGCTTGGTGA AAACGA (SEQ ID NO:75)	chr4:1052356 56	TET2	TET2	89,62
MHPHK_7 6	CAGGCACAATAGA AACAACG (SEQ ID NO:76)	chr3:1142955 71	TIGIT	TIGIT	92,65
MHPHK_7 7	CCATTTGTAATGCT GACTTG (SEQ ID NO:77)	chr3:1142957 00	TIGIT	TIGIT	60,75
MHPHK_7 8	CTGGGGTCACTTGTG CCGTGG (SEQ ID NO:78)	chr3:1142956 34	TIGIT	TIGIT	87,99
MHPHK_7 9	GTCAGGGTTCTGGA TATCTG (SEQ ID NO:79)	chr14:225475 08	TRAC	TRAC	98,20
MHPHK_8 0	TGGATTTAGAGTCT CTCAGC (SEQ ID NO:80)	chr14:225475 41	TRAC	TRAC	88,15
MHPHK_8 1	CTGCGGCTGTGGTC CAGCTG (SEQ ID NO:81)	chr14:225506 61	TRAC	TRAC	94,77
MHPHK_8 2	ACAAAACCTGTGCTA GACATG (SEQ ID NO:82)	chr14:225476 58	TRAC	TRAC	87,86
MHPHK_8 3	TTCTTCCCCAGCCC AGGTAA (SEQ ID NO:83)	chr14:225477 78	TRAC	TRAC	89,85
MHPHK_8 4	CGTCATGAGCAGAT TAAACC (SEQ ID NO:84)	chr14:225506 25	TRAC	TRAC	95,81
MHPHK_8 5	GAGAGCGCCTGCGA CCCGAG (SEQ ID NO:85)	chr19:585449 80	TRIM28	TRIM28	89,44

MHPHK_8 6	CCAGCGGGTGAAGT ACACCA (SEQ ID NO:86)	chr19:585448 69	TRIM28	TRIM28	94,79
MHPHK_8 7	GGAGCGCTTTTCGC CGCCAG (SEQ ID NO:87)	chr19:585448 39	TRIM28	TRIM28	91,81
MHPHK_8 8	TGAGGCCTGGACCT TATGCA (SEQ ID NO:88)	chr10:331341 93	chr10:331 30000- 33140000	desert_1 (GS88)	69,44
MHPHK_8 9	CCTGGTGGAGTGAA CCATGA (SEQ ID NO:89)	chr10:331329 17	chr10:331 30000- 33140000	desert_1 (GS89)	95,25
MHPHK_9 0	CAAGCACTTAGGTT CCCCTG (SEQ ID NO:90)	chr10:331346 33	chr10:331 30000- 33140000	desert_1 (GS90)	91,13
MHPHK_9 1	GGTCTCCCTACAAT TCAGCG (SEQ ID NO:91)	chr10:722945 68	chr10:722 90000- 72300000	desert_2 (GS91)	92,02
MHPHK_9 2	CACAGCGCGTGACT GCAATG (SEQ ID NO:92)	chr10:722982 68	chr10:722 90000- 72300000	desert_2 (GS92)	90,22
MHPHK_9 3	TCTGGGGCACCAAT TCTAGG (SEQ ID NO:93)	chr10:722927 86	chr10:722 90000- 72300000	desert_2 (GS93)	86,35
MHPHK_9 4	GAGCCATGCTTGGC TTACGA (SEQ ID NO:94)	chr11:128342 576	chr11:128 340000- 12835000 0	desert_3 (GS94)	91,24
MHPHK_9 5	GTACAAGTACTTAT CTCATG (SEQ ID NO:95)	chr11:128343 592	chr11:128 340000- 12835000 0	desert_3 (GS95)	89,02
MHPHK_9 6	GAGATAACAACATA ACAACA (SEQ ID	chr11:128347 170	chr11:128 340000-	desert_3 (GS96)	96,47

	NO:96)		12835000 0		
MHPHK_9 7	CATATTCATAGTC TTTGGG (SEQ ID NO:97)	chr11:654250 00	chr11:654 25000- 65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS97)	88,54
MHPHK_9 8	CTGCCCCTTAGCAA CTTAGG (SEQ ID NO:98)	chr11:654255 07	chr11:654 25000- 65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS98)	92,76
MHPHK_9 9	TGTTTAAAAATATG TTGACA (SEQ ID NO:99)	chr11:654262 64	chr11:654 25000- 65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS99)	90,76
MHPHK_1 00	CCAGGAATGGAAA CTCACGC (SEQ ID NO:100)	chr15:928303 15	chr15:928 30000- 92840000	desert_5 (GS100)	87,84
MHPHK_1 01	GAGGCCGCTGAATT AACCCG (SEQ ID NO:101)	chr15:928318 50	chr15:928 30000- 92840000	desert_5 (GS101)	85,32
MHPHK_1 02	ATACACGCACACTT GCAGAA (SEQ ID NO:102)	chr15:928311 31	chr15:928 30000- 92840000	desert_5 (GS102)	99,92
MHPHK_1 03	GAGCAGACAGAAA CCCAGGG (SEQ ID NO:103)	chr16:112256 70	chr16:112 20000- 11230000	desert_6 (GS103)	87,92
MHPHK_1 04	TGAGTCTCAAACA GAACAG (SEQ ID NO:104)	chr16:112262 84	chr16:112 20000- 11230000	desert_6 (GS104)	88,53
MHPHK_1 05	TAATATCACTGACT TCACGG (SEQ ID NO:105)	chr16:112250 29	chr16:112 20000- 11230000	desert_6 (GS105)	87,65
MHPHK_1 06	TACACACAATGTAA GCAGCA (SEQ ID	chr2:8746746 1	chr2:8746 0000-	desert_7 (GS106)	71,79

	NO:106)		87470000		
MHPHK_1 07	GGGAGCTCAATTCG AAACCA (SEQ ID NO:107)	chr2:8746880 9	chr2:8746 0000- 87470000	desert_7 (GS107)	65,89
MHPHK_1 08	TTGGACAGGTGAGA CAGTCG (SEQ ID NO:108)	chr2:8746700 1	chr2:8746 0000- 87470000	desert_7 (GS108)	72,64
MHPHK_1 09	AAGCTCACTCAGAT AGTGTG (SEQ ID NO:109)	chr3:1865113 16	chr3:1865 10000- 18652000 0	desert_8 (GS109)	76,89
MHPHK_1 10	CAGGAGAACCACCT TACACG (SEQ ID NO:110)	chr3:1865152 60	chr3:1865 10000- 18652000 0	desert_8 (GS110)	86,31
MHPHK_1 11	GGACAGACCCTGAT TCACAA (SEQ ID NO:111)	chr3:1865196 55	chr3:1865 10000- 18652000 0	desert_8 (GS111)	85,47
MHPHK_1 12	ACATGGCAGTCTAT GAACAG (SEQ ID NO:112)	chr3:5945115 4	chr3:5945 0000- 59460000	desert_9 (GS112)	87,77
MHPHK_1 13	CCTATAGAGAGTAC TACTTG (SEQ ID NO:113)	chr3:5945641 6	chr3:5945 0000- 59460000	desert_9 (GS113)	79,33
MHPHK_1 14	CCAACCGGGTCTTC ATTACG (SEQ ID NO:114)	chr3:5945702 9	chr3:5945 0000- 59460000	desert_9 (GS114)	92,21
MHPHK_1 15	TCAAGCGTAGAGTT CCGAGT (SEQ ID NO:115)	chr8:1279930 06	chr8:1279 80000- 12800000 0	desert_1 0 (GS115)	93,07
MHPHK_1 16	TCATGCAATTATGG ACCCAG (SEQ ID	chr8:1279946 63	chr8:1279 80000-	desert_1 0	89,40

	NO:116)		12800000 0	(GS116)	
мнРНК_1 17	CGGGAAAGTGACTG GCCATG (SEQ ID NO:117)	chr8:1279967 66	chr8:1279 80000- 12800000 0	desert_1 0 (GS117)	87,45
мнРНК_1 18	TGAGATTGAAATCA AATCGG (SEQ ID NO:118)	chr9:7974159	chr9:7970 000- 7980000	desert_1 1 (GS118)	84,84
мнРНК_1 19	TATGCAATATTCAT CACGCG (SEQ ID NO:119)	chr9:7977914	chr9:7970 000- 7980000	desert_1 1 (GS119)	85,44
мнРНК_1 20	AATGTGTAAATCA AATGCA (SEQ ID NO:120)	chr9:7976895	chr9:7970 000- 7980000	desert_1 1 (GS120)	83,48

Хотя данное изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления и различные альтернативные варианты осуществления, специалистам в соответствующей области техники будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения в форме и деталях, не отступая от сущности и объема данного изобретения.

Все источники, выданные патенты и патентные заявки, процитированные в данном описании включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Первичная иммунная клетка, содержащая по меньшей мере одну матрицу ДНК невирусно вставленную в целевую область генома клетки, где размер матрицы ДНК больше или равен около 5 тысячам пар нуклеотидов (т.п.н.).

2. Клетка по п. 1, отличающаяся тем, что первичная иммунная клетка не содержит вирусного вектора для введения матрицы ДНК в первичную иммунную клетку.

3. Клетка по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что размер матрицы ДНК больше или равен около 5,0 т.п.н., 5,1 т.п.н., 5,2 т.п.н., 5,3 т.п.н., 5,4 т.п.н., 5,5 т.п.н., 5,6 т.п.н., 5,7 т.п.н., 5,8 т.п.н., 5,9 т.п.н., 6,0 т.п.н., 6,1 т.п.н., 6,2 т.п.н., 6,3 т.п.н., 6,4 т.п.н., 6,5 т.п.н., 6,6 т.п.н., 6,7 т.п.н., 6,8 т.п.н., 6,9 т.п.н., 7,0 т.п.н., 7,1 т.п.н., 7,2 т.п.н., 7,3 т.п.н., 7,4 т.п.н., 7,5 т.п.н., 7,6 т.п.н., 7,7 т.п.н., 7,8 т.п.н., 7,9 т.п.н., 8,0 т.п.н., 8,1 т.п.н., 8,2 т.п.н., 8,3 т.п.н., 8,4 т.п.н., 8,5 т.п.н., 8,6 т.п.н., 8,7 т.п.н., 8,8 т.п.н., 8,9 т.п.н., 9,0 т.п.н., 9,1 т.п.н., 9,2 т.п.н., 9,3 т.п.н., 9,4 т.п.н., 9,5 т.п.н., 9,6 т.п.н., 9,7 т.п.н., 9,8 т.п.н., 9,9 т.п.н., 10,0 т.п.н. или любому размеру матрицы ДНК между этими размерами.

4. Клетка по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что размер матрицы ДНК составляет от около 5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 9 т.п.н. или от около 9 т.п.н. до около 10 т.п.н.

5. Клетка по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что матрица ДНК представляет собой матрицу двухцепочечной ДНК или матрицу одноцепочечной ДНК.

6. Клетка по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что матрица ДНК представляет собой матрицу линейной ДНК или матрицу кольцевой ДНК, при этом необязательно матрица кольцевой ДНК представляет собой плазмиду.

7. Клетка по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, гомологичные геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной клетки.

8. Клетка по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что целевая область генома клетки представляет собой локус константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) или безопасный геномный локус (GSH).

9. Клетка по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что матрица ДНК содержит гетерологичную последовательность.

10. Клетка по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что матрица ДНК содержит ген.

11. Клетка по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что матрица ДНК содержит праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

12. Клетка по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR).

13. Клетка по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

14. Клетка по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что матрица ДНК содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором.

15. Клетка по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

16. Клетка по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором, и конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

17. Клетка по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3':

индуцибельный промотор;
химерный антигенный рецептор;
конститутивный промотор и
праймирующий рецептор.

18. Клетка по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3':

конститутивный промотор;
праймирующий рецептор;
индуцибельный промотор и
химерный антигенный рецептор.

19. Клетка по любому из пп. 1-24, отличающаяся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит самовырезающийся пептид 2A (P2A).

20. Клетка по любому из пп. 1-23, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота P2A находится на 3'-конце матрицы ДНК.

21. Клетка по любому из пп. 1-20, отличающаяся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE).

22. Клетка по п. 21, отличающаяся тем, что WPRE находится на 3'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, и на 5'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей праймирующий рецептор, или при этом WPRE находится на 3'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей праймирующий рецептор, и на 5'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR.

23. Клетка по любому из пп. 1-22, отличающаяся тем, что праймирующий рецептор содержит в направлении от N-конца к С-концу:

внечелюточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном;

трансмембранный домен, содержащий один или несколько индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления, и

внутриклеточный домен, содержащий человеческий или гуманизированный эффектор транскрипции, где связывание антигена с внечелючным антигенсвязывающим доменом приводит к расщеплению в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления, тем самым высвобождая внутриклеточный домен.

24. Клетка по п. 23, отличающаяся тем, что праймирующий рецептор дополнительно содержит околочелюточный домен (JMD), расположенный между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом.

25. Клетка по любому из пп. 1-24, отличающаяся тем, что фактор транскрипции связывается с индуцибельным промотором и индуцирует экспрессию CAR.

26. Клетка по любому из пп. 1-25, отличающаяся тем, что CAR содержит, от N-конца к С-концу,

внечелюточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном;

трансмембранный домен;

внутриклеточный костимулирующий домен и

внутриклеточный домен активации.

27. Клетка по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что праймирующий рецептор и CAR связывают разные антигены.

28. Клетка по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что праймирующий рецептор и CAR связывают один и тот же антиген.

29. Клетка по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что иммунная клетка представляет собой первичную иммунную клетку человека.

30. Клетка по любому из пп. 1-29, отличающаяся тем, что первичная иммунная клетка представляет собой аутологичную иммунную клетку.

31. Клетка по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что первичная иммунная клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK), Т-клетку, CD8+ Т-клетку, CD4+ Т-клетку, первичную Т-клетку или предшественник Т-клетки.

32. Клетка по любому из пп. 1-31, отличающаяся тем, что первичная иммунная клетка представляет собой первичную Т-клетку.

33. Клетка по любому из пп. 1-32, отличающаяся тем, что первичная иммунная клетка представляет собой первичную иммунную клетку человека.

34. Клетка по любому из пп. 1-33, отличающаяся тем, что первичная иммунная клетка не содержит вирусов.

35. Популяция клеток, содержащая множество первичных иммунных клеток по любому из пп. 1-34.

36. Первичная иммунная клетка, содержащая по меньшей мере одну матрицу ДНК, вставленную в целевую область генома первичной иммунной клетки, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом первичная иммунная клетка не содержит вирусного вектора для введения матрицы ДНК в первичную иммунную клетку.

37. Первичная иммунная клетка, содержащая по меньшей мере одну матрицу ДНК, содержащую химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий транскрипционный фактор, вставленную в целевую область генома первичной иммунной клетки, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом первичная иммунная клетка не содержит вирусного вектора для введения матрицы ДНК в первичную иммунную клетку.

38. Жизнеспособная первичная клетка без вирусов, содержащая комплекс рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс-матрица ДНК, где РНП содержит нуклеазный домен и направляющую РНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной клетки.

39. Жизнеспособная первичная клетка без вирусов, содержащая комплекс рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс-матрица ДНК, где РНП содержит нуклеазный домен и направляющую РНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, при этом матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной клетки.

40. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту первичной иммунной клетки по любому из пп. 1-39.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак.

42. Невирусный вектор, содержащий матрицу ДНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной клетки.

43. Невирусный вектор по п. 42, отличающийся тем, что размер матрицы ДНК больше или равен около 5,0 т.п.н., 5,1 т.п.н., 5,2 т.п.н., 5,3 т.п.н., 5,4 т.п.н., 5,5 т.п.н., 5,6 т.п.н., 5,7 т.п.н., 5,8 т.п.н., 5,9 т.п.н., 6,0 т.п.н., 6,1 т.п.н., 6,2 т.п.н., 6,3 т.п.н., 6,4 т.п.н., 6,5 т.п.н., 6,6 т.п.н., 6,7 т.п.н., 6,8 т.п.н., 6,9 т.п.н., 7,0 т.п.н., 7,1 т.п.н., 7,2 т.п.н., 7,3 т.п.н., 7,4 т.п.н., 7,5 т.п.н., 7,6 т.п.н., 7,7 т.п.н., 7,8 т.п.н., 7,9 т.п.н., 8,0 т.п.н., 8,1 т.п.н., 8,2 т.п.н., 8,3 т.п.н., 8,4 т.п.н., 8,5 т.п.н., 8,6 т.п.н., 8,7 т.п.н., 8,8 т.п.н., 8,9 т.п.н., 9,0 т.п.н., 9,1 т.п.н., 9,2

т.п.н., 9,3 т.п.н., 9,4 т.п.н., 9,5 т.п.н., 9,6 т.п.н., 9,7 т.п.н., 9,8 т.п.н., 9,9 т.п.н., 10,0 т.п.н. или любому размеру матрицы ДНК между этими размерами.

44. Невирусный вектор по п. 42 или 43, отличающийся тем, что размер матрицы ДНК составляет от около 5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 9 т.п.н. или от около 9 т.п.н. до около 10 т.п.н.

45. Невирусный вектор по любому из пп. 42-44, отличающийся тем, что целевая область генома клетки представляет собой локус константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) или безопасный геномный локус (GSH).

46. Невирусный вектор по любому из пп. 42-44, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит гетерологичную последовательность.

47. Невирусный вектор по любому из пп. 42-44, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит ген.

48. Невирусный вектор по любому из пп. 42-47, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

49. Невирусный вектор по любому из пп. 42-48, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR).

50. Невирусный вектор по любому из пп. 42-49, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

51. Невирусный вектор по любому из пп. 42-50, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором.

52. Невирусный вектор по любому из пп. 42-51, отличающийся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

53. Невирусный вектор по любому из пп. 42-52, отличающийся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором, и конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

54. Невирусный вектор по любому из пп. 42-52, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3':

- индуцибельный промотор;
- химерный антигенный рецептор;
- конститутивный промотор и
- праймирующий рецептор.

55. Невирусный вектор по любому из пп. 42-52, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3':

конститутивный промотор;
праймирующий рецептор;
индуцибельный промотор и
химерный антигенный рецептор.

56. Невирусный вектор по любому из пп. 42-60, отличающийся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит самовырезающийся пептид 2A (P2A).

57. Невирусный вектор по любому из пп. 42-56, отличающийся тем, что P2A находится на 3'-конце матрицы ДНК.

58. Невирусный вектор по любому из пп. 42-57, отличающийся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE).

59. Невирусный вектор по любому из пп. 42-53, отличающийся тем, что праймирующий рецептор содержит в направлении от N-конца к C-концу:

внутриклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном;

трансмембранный домен, содержащий один или несколько индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления, и

внутриклеточный домен, содержащий человеческий или гуманизированный эффектор транскрипции, где связывание антигена с внутриклеточным антигенсвязывающим доменом приводит к расщеплению в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления, тем самым высвобождая внутриклеточный домен.

60. Невирусный вектор по п. 59, отличающийся тем, что праймирующий рецептор дополнительно содержит околочелювеческий домен (JMD), расположенный между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом.

61. Невирусный вектор по любому из пп. 42-58, отличающийся тем, что фактор транскрипции связывается с индуцибельным промотором и индуцирует экспрессию CAR.

62. Невирусный вектор по любому из пп. 42-58, отличающийся тем, что CAR содержит, от N-конца к C-концу,

внутриклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном;

трансмембранный домен;

внутриклеточный костимулирующий домен и

внутриклеточный домен активации.

63. Невирусный вектор по любому из пп. 42-58, отличающийся тем, что праймирующий рецептор и CAR связывают разные антигены.

64. Невирусный вектор по любому из пп. 42-58, отличающийся тем, что праймирующий рецептор и CAR связывают один и тот же антиген.

65. Способ редактирования первичной иммунной клетки, включающий:

получение комплекса рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП)-матрица ДНК, где РНП содержит нуклеазный домен и направляющую РНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной иммунной клетки;

невирусное введение комплекса РНП-матрица ДНК в первичную иммунную клетку, при этом направляющая РНК специфически гибридизуется с целевой областью генома первичной иммунной клетки, и при этом нуклеазный домен расщепляет целевую область для создания сайта вставки в геноме первичной иммунной клетки; и

редактирование первичной иммунной клетки посредством вставки матрицы ДНК в сайт вставки в геноме первичной иммунной клетки.

66. Способ по п. 65, отличающийся тем, что невирусное введение включает электропорацию.

67. Способ по п. 65 или 66, отличающийся тем, что нуклеазный домен содержит CRISPR-ассоциированную эндонуклеазу (Cas), необязательно нуклеазу Cas9.

68. Способ по любому из пп. 65-67, отличающийся тем, что размер матрицы ДНК больше или равен около 5,0 т.п.н., 5,1 т.п.н., 5,2 т.п.н., 5,3 т.п.н., 5,4 т.п.н., 5,5 т.п.н., 5,6 т.п.н., 5,7 т.п.н., 5,8 т.п.н., 5,9 т.п.н., 6,0 т.п.н., 6,1 т.п.н., 6,2 т.п.н., 6,3 т.п.н., 6,4 т.п.н., 6,5 т.п.н., 6,6 т.п.н., 6,7 т.п.н., 6,8 т.п.н., 6,9 т.п.н., 7,0 т.п.н., 7,1 т.п.н., 7,2 т.п.н., 7,3 т.п.н., 7,4 т.п.н., 7,5 т.п.н., 7,6 т.п.н., 7,7 т.п.н., 7,8 т.п.н., 7,9 т.п.н., 8,0 т.п.н., 8,1 т.п.н., 8,2 т.п.н., 8,3 т.п.н., 8,4 т.п.н., 8,5 т.п.н., 8,6 т.п.н., 8,7 т.п.н., 8,8 т.п.н., 8,9 т.п.н., 9,0 т.п.н., 9,1 т.п.н., 9,2 т.п.н., 9,3 т.п.н., 9,4 т.п.н., 9,5 т.п.н., 9,6 т.п.н., 9,7 т.п.н., 9,8 т.п.н., 9,9 т.п.н., 10,0 т.п.н. или любому размеру матрицы ДНК между этими размерами.

69. Способ по любому из пп. 65-68, отличающийся тем, что размер матрицы ДНК составляет от около 5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 9 т.п.н. или от около 9 т.п.н. до около 10 т.п.н.

70. Способ по любому из пп. 65-69, отличающийся тем, что целевая область генома клетки представляет собой локус константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) или безопасный геномный локус (GSH).

71. Способ по любому из пп. 65-70, отличающийся тем, что матрица ДНК представляет собой матрицу двухцепочечной ДНК или матрицу одноцепочечной ДНК.

72. Способ по любому из пп. 65-71, отличающийся тем, что матрица ДНК представляет собой матрицу линейной ДНК или матрицу кольцевой ДНК, при этом необязательно матрица кольцевой ДНК представляет собой плазмиду.

73. Способ по любому из пп. 65-72, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит гетерологичную последовательность.

74. Способ по любому из пп. 65-73, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит ген.

75. Способ по любому из пп. 65-74, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

76. Способ по любому из пп. 65-75, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR).

77. Способ по любому из пп. 65-76, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции.

78. Способ по любому из пп. 65-77, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором.

79. Способ по любому из пп. 65-78, отличающийся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

80. Способ по любому из пп. 65-79, отличающийся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с химерным антигенным рецептором, и конститутивный промотор, функционально связанный с праймирующим рецептором.

81. Способ по любому из пп. 65-80, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3':

индуцибельный промотор;
химерный антигенный рецептор;
конститутивный промотор и
праймирующий рецептор.

82. Способ по любому из пп. 65-80, отличающийся тем, что матрица ДНК содержит в направлении от 5' к 3':

конститутивный промотор;
праймирующий рецептор;
индуцибельный промотор и
химерный антигенный рецептор.

83. Способ по любому из пп. 65-82, отличающийся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит самовырезающийся пептид 2A (P2A).

84. Способ по п. 83, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота P2A находится на 3'-конце матрицы ДНК.

85. Способ по любому из пп. 65-84, отличающийся тем, что матрица ДНК дополнительно содержит посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE).

86. Способ по п. 85, отличающийся тем, что WPRE находится на 3'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, и на 5'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей праймирующий рецептор, или при этом WPRE находится на 3'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей праймирующий рецептор, и на 5'-конце нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR.

87. Способ по любому из пп. 65-86, отличающийся тем, что праймирующий рецептор содержит в направлении от N-конца к С-концу:

внеклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном;

трансмембранный домен, содержащий один или несколько индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления, и

внутриклеточный домен, содержащий человеческий или гуманизированный эффектор транскрипции, где связывание антигена с внеклеточным антигенсвязывающим доменом приводит к расщеплению в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления, тем самым высвобождая внутриклеточный домен.

88. Способ по п. 87, отличающийся тем, что праймирующий рецептор дополнительно содержит околосмембранный домен (JMD), расположенный между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом.

89. Способ по любому из пп. 65-88, отличающийся тем, что фактор транскрипции связывается с индуцибельным промотором и индуцирует экспрессию CAR.

90. Способ по любому из пп. 65-89, отличающийся тем, что CAR содержит, от N-конца к С-концу,

внеклеточный антигенсвязывающий домен, обладающий аффинностью связывания с антигеном;

трансмембранный домен;

внутриклеточный костимулирующий домен и

внутриклеточный домен активации.

91. Способ по любому из пп. 65-90, отличающийся тем, что праймирующий рецептор и CAR связывают разные антигены.

92. Способ по любому из пп. 65-90, отличающийся тем, что праймирующий рецептор и CAR связывают один и тот же антиген.

93. Способ по любому из пп. 65-92, отличающийся тем, что иммунная клетка представляет собой первичную иммунную клетку человека.

94. Способ по любому из пп. 65-93, отличающийся тем, что первичная иммунная клетка представляет собой аутологичную иммунную клетку.

95. Способ по любому из пп. 65-94, отличающийся тем, что первичная иммунная клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK), Т-клетку, CD8+ Т-клетку, CD4+ Т-клетку, первичную Т-клетку или предшественник Т-клетки.

96. Способ по любому из пп. 65-95, отличающийся тем, что первичная иммунная клетка представляет собой первичную Т-клетку.

97. Способ по любому из пп. 65-96, отличающийся тем, что первичная иммунная клетка представляет собой первичную Т-клетку человека.

98. Способ по любому из пп. 65-97, отличающийся тем, что первичная иммунная клетка не содержит вирусов.

99. Способ по любому из пп. 65-98, дополнительно включающий получение иммунной клетки от пациента и введение плазмиды *in vitro*.

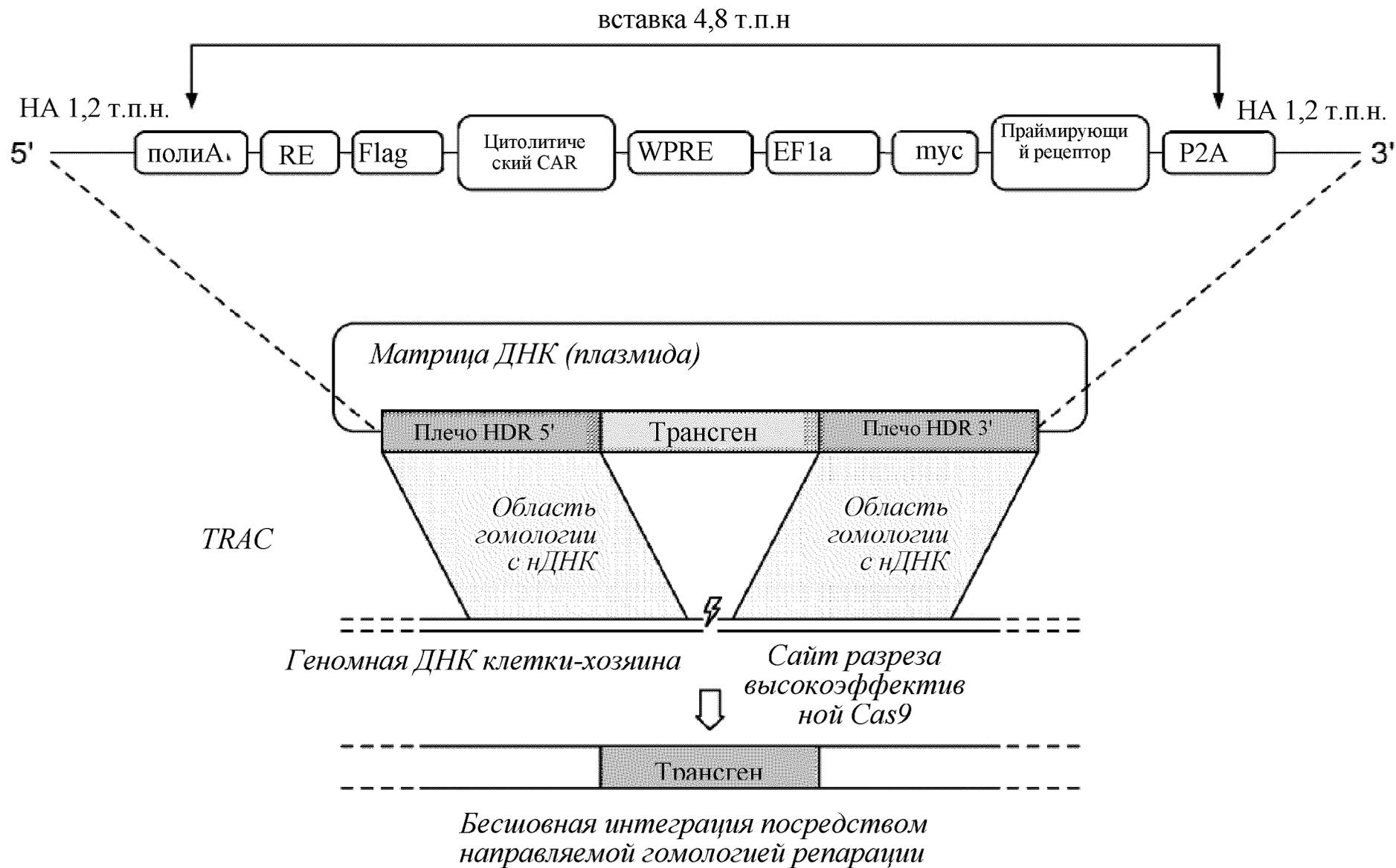
100. Способ редактирования первичной иммунной клетки, включающий:

получение комплекса рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП)-матрица ДНК, где РНП содержит нуклеазный домен и направляющую РНК, при этом размер матрицы ДНК больше или равен 5 тысячам пар нуклеотидов, при этом матрица ДНК содержит химерный антигенный рецептор (CAR) и праймирующий рецептор, содержащий фактор транскрипции, и при этом 5'- и 3'-концы матрицы ДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые гомологичны геномным последовательностям, фланкирующим сайт вставки в геноме первичной иммунной клетки.

невирусное введение комплекса РНП-матрица ДНК в первичную иммунную клетку, при этом направляющая РНК специфически гибридизуется с целевой областью генома первичной иммунной клетки, и при этом нуклеазный домен расщепляет целевую область для создания сайта вставки в геноме первичной иммунной клетки; и

редактирование первичной иммунной клетки посредством вставки матрицы ДНК в сайт вставки в геноме первичной иммунной клетки.

По доверенности

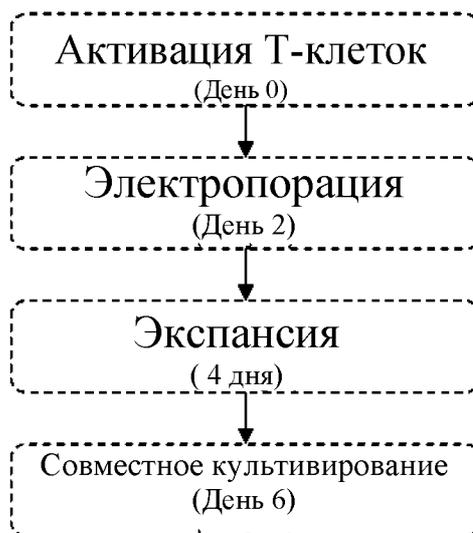


1/22

577589

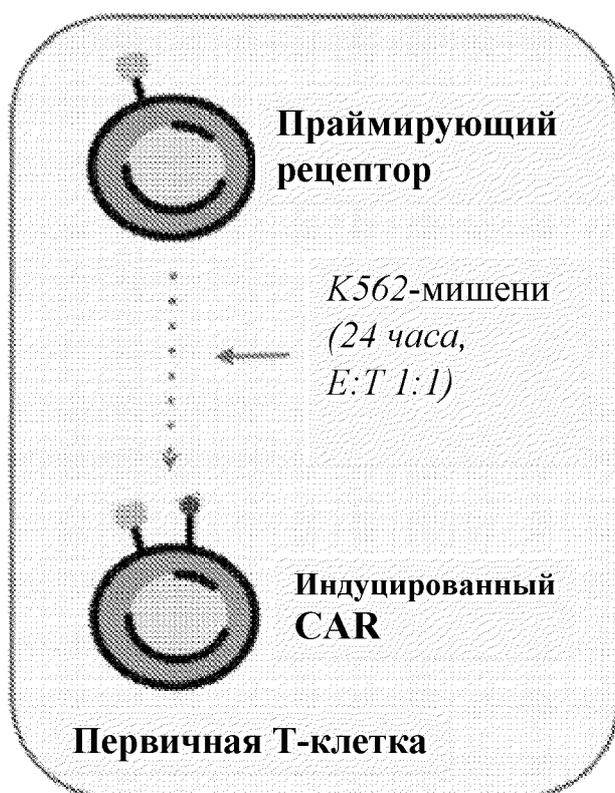
ФИГ. 1

Обзор процесса



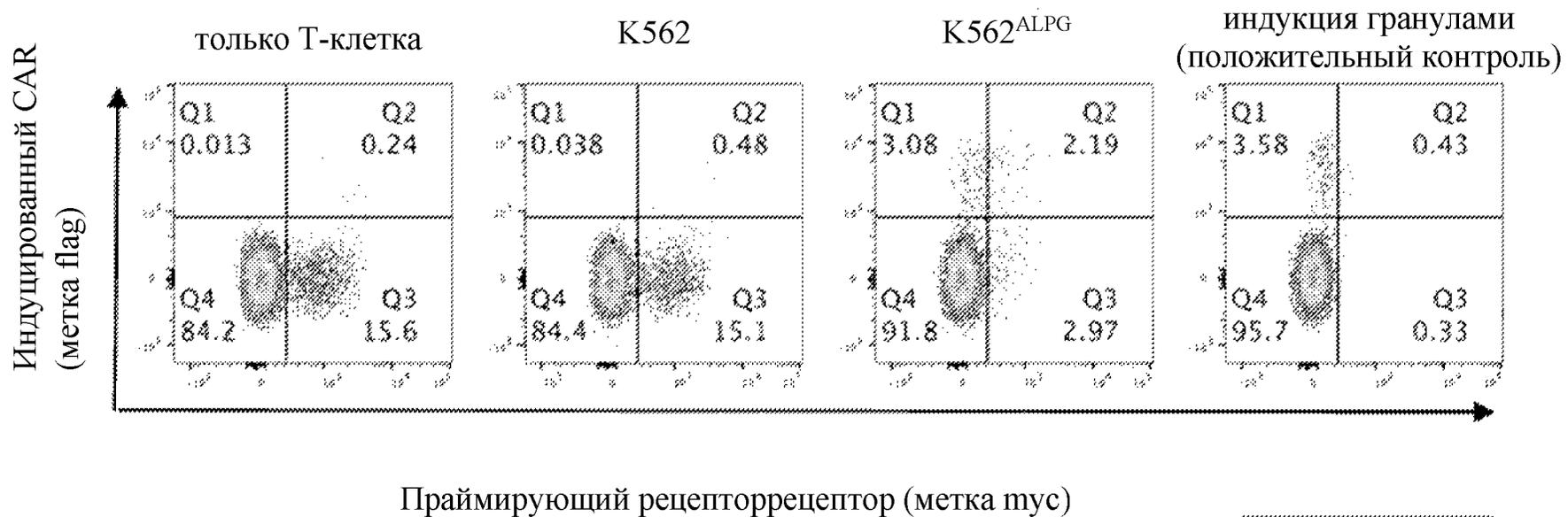
ФИГ. 2

Обзор эксперимента

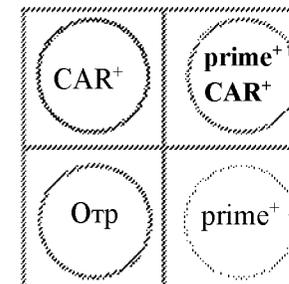


ФИГ. 3

Индукция антиген-специфического CAR

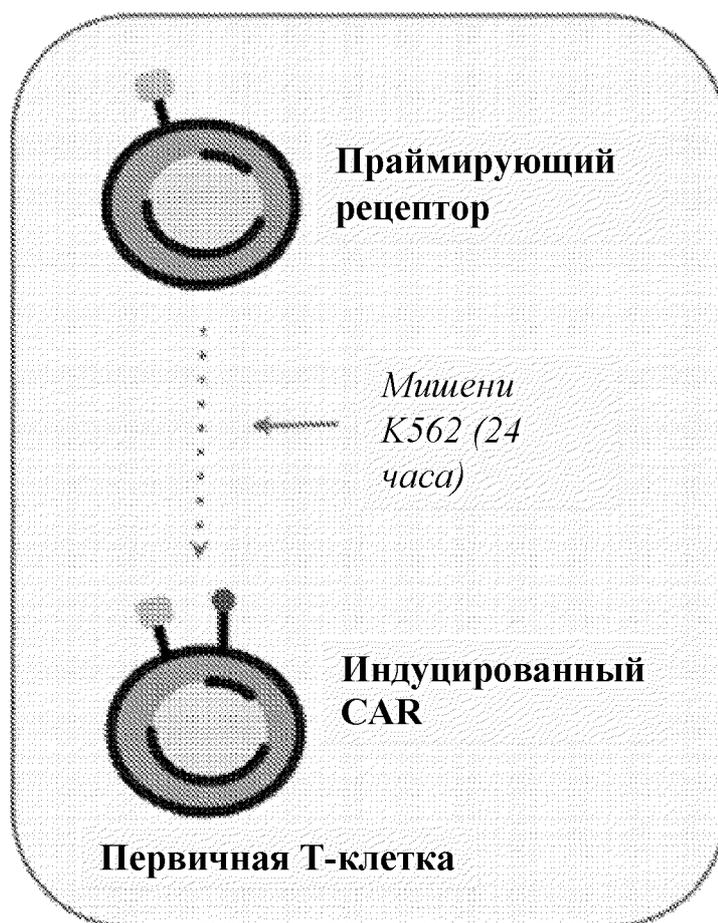


4/22



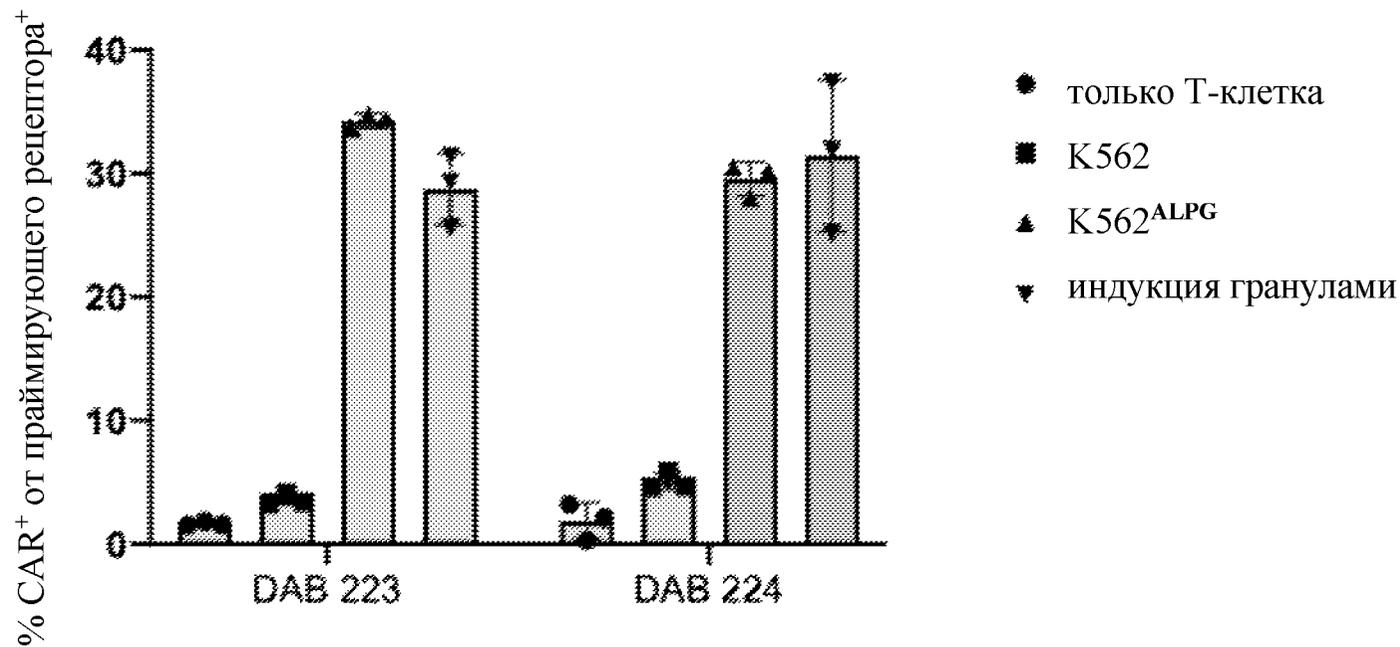
ФИГ. 4

**Обзор
эксперимента**



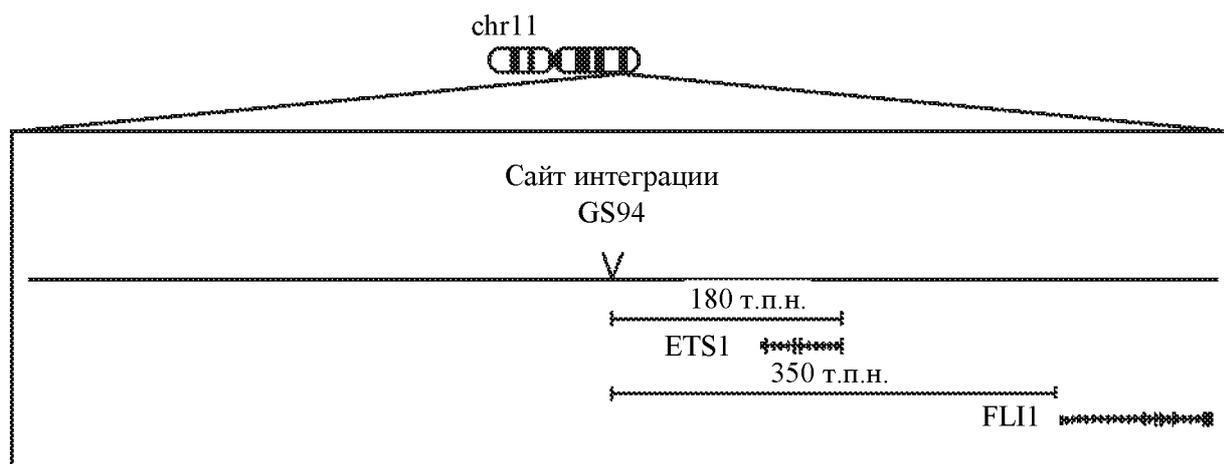
ФИГ. 5

Индукция антиген-специфического CAR

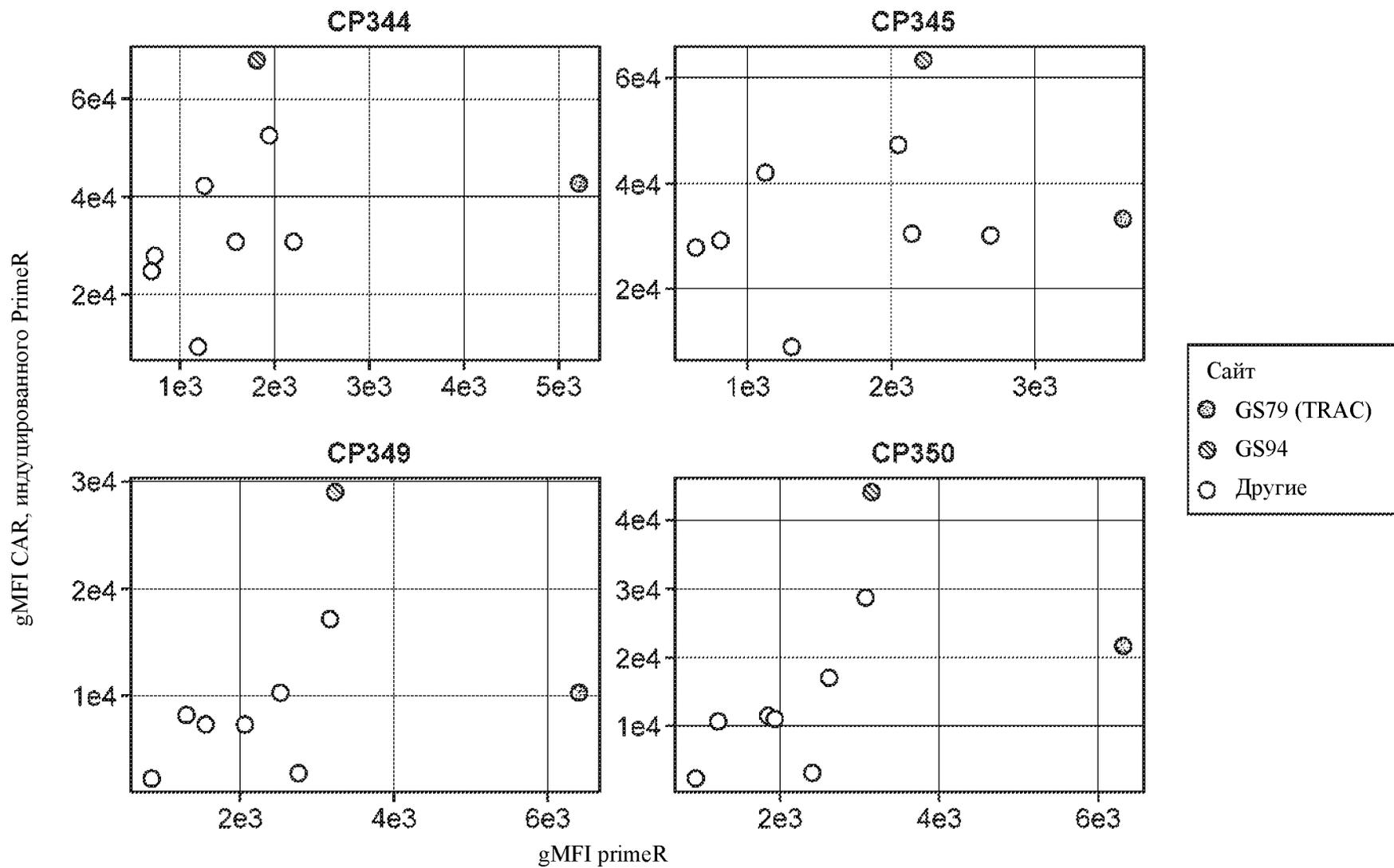


Индукция CAR как процент положительных по праймирующему рецептору клеток, присутствующих перед совместным культивированием.

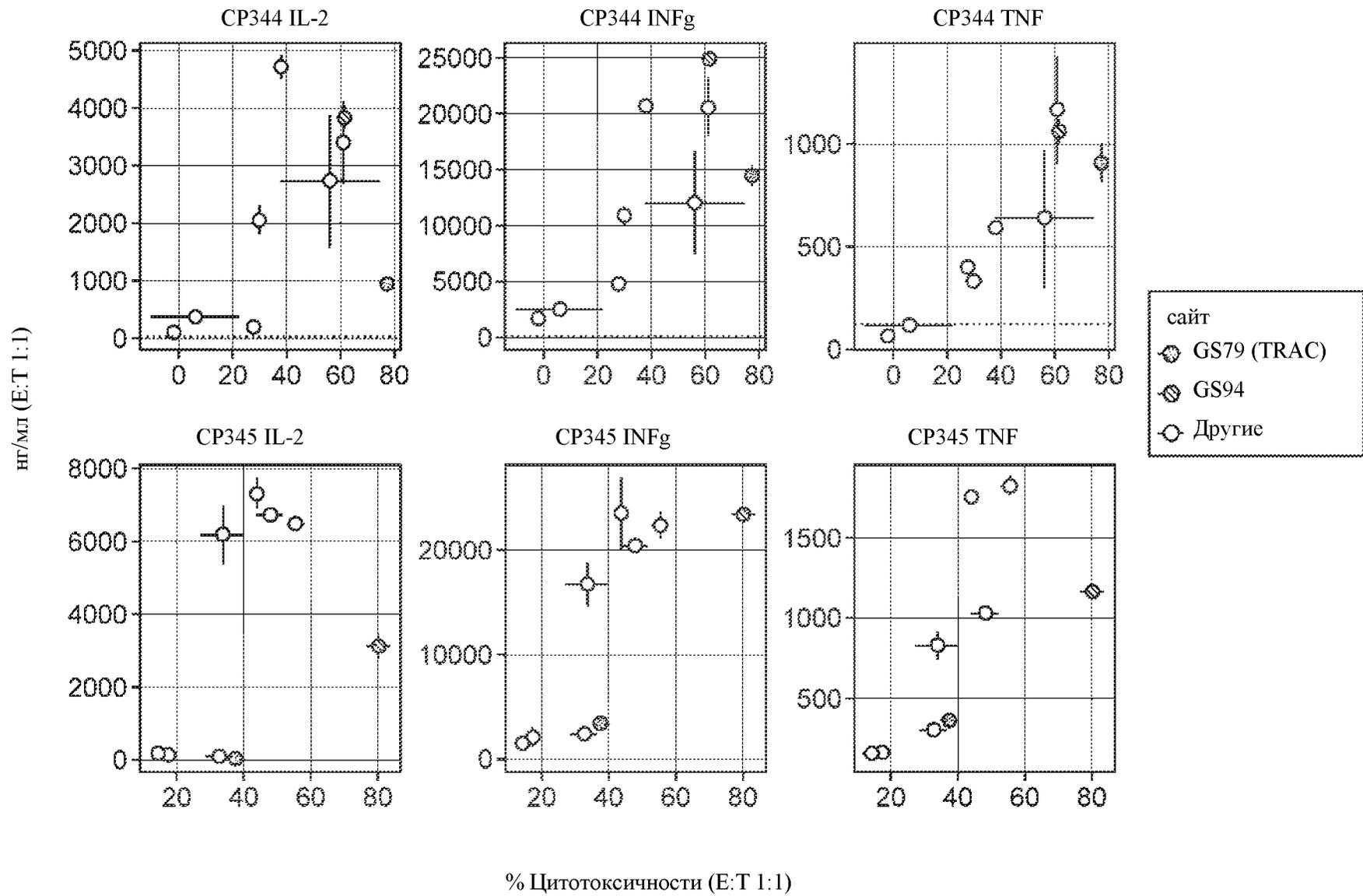
ФИГ. 6



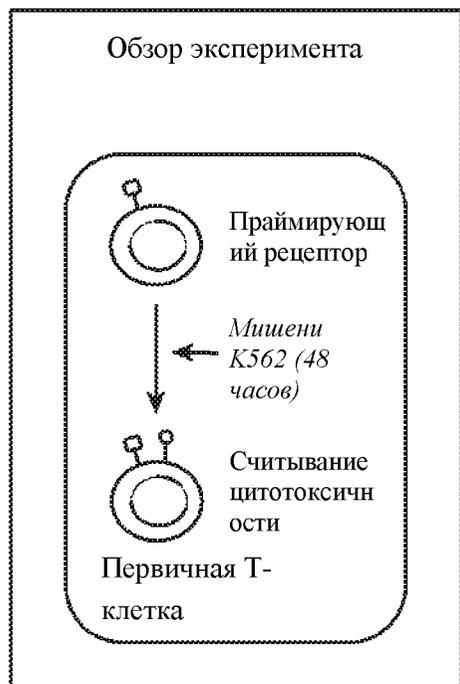
ФИГ. 7



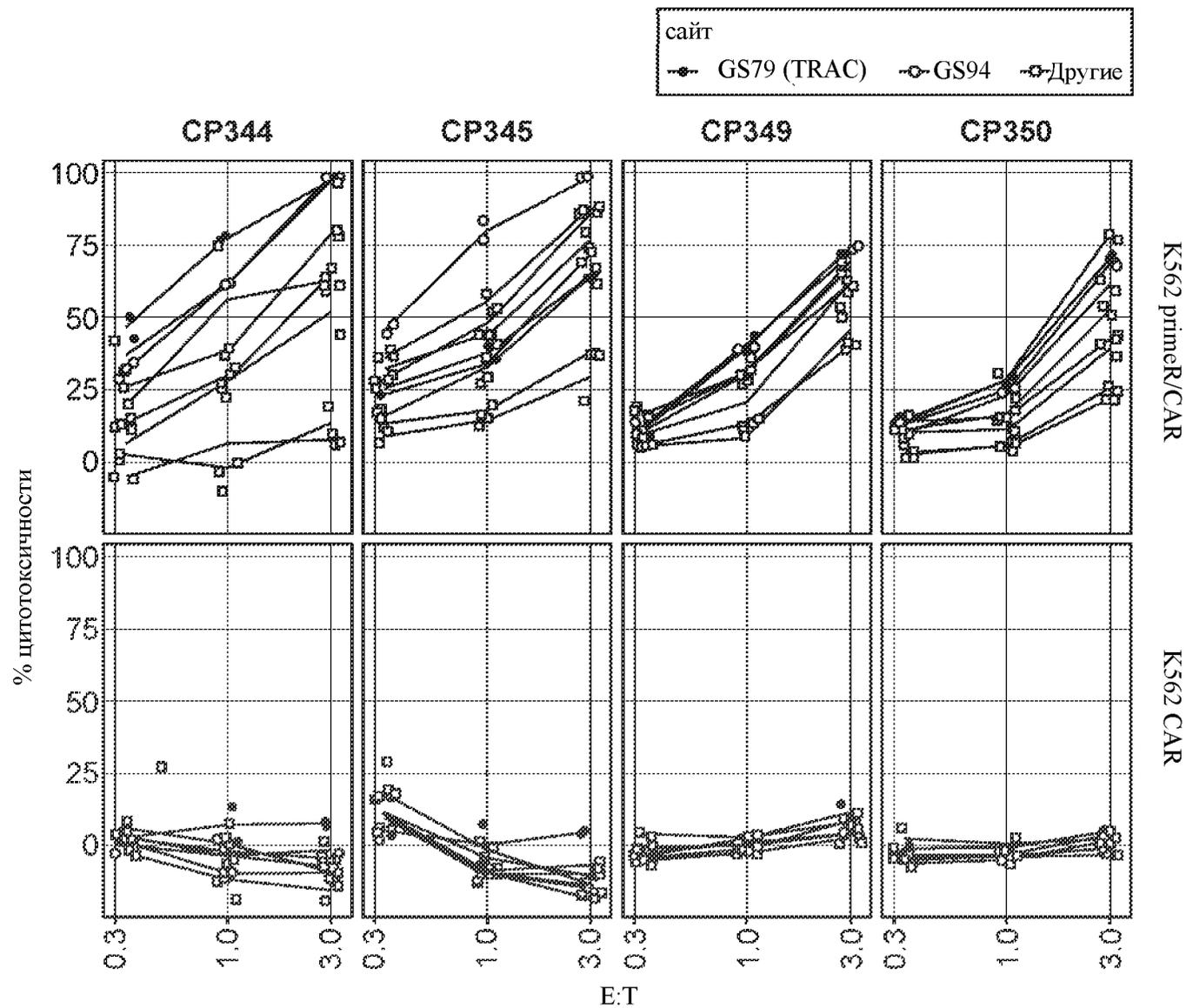
ФИГ. 8А



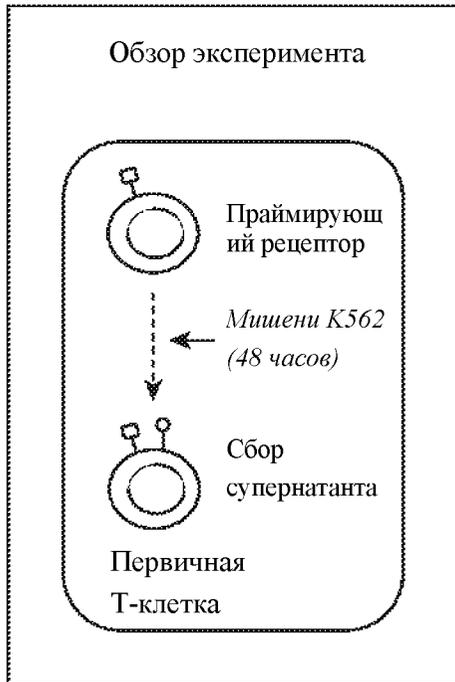
ФИГ. 8В



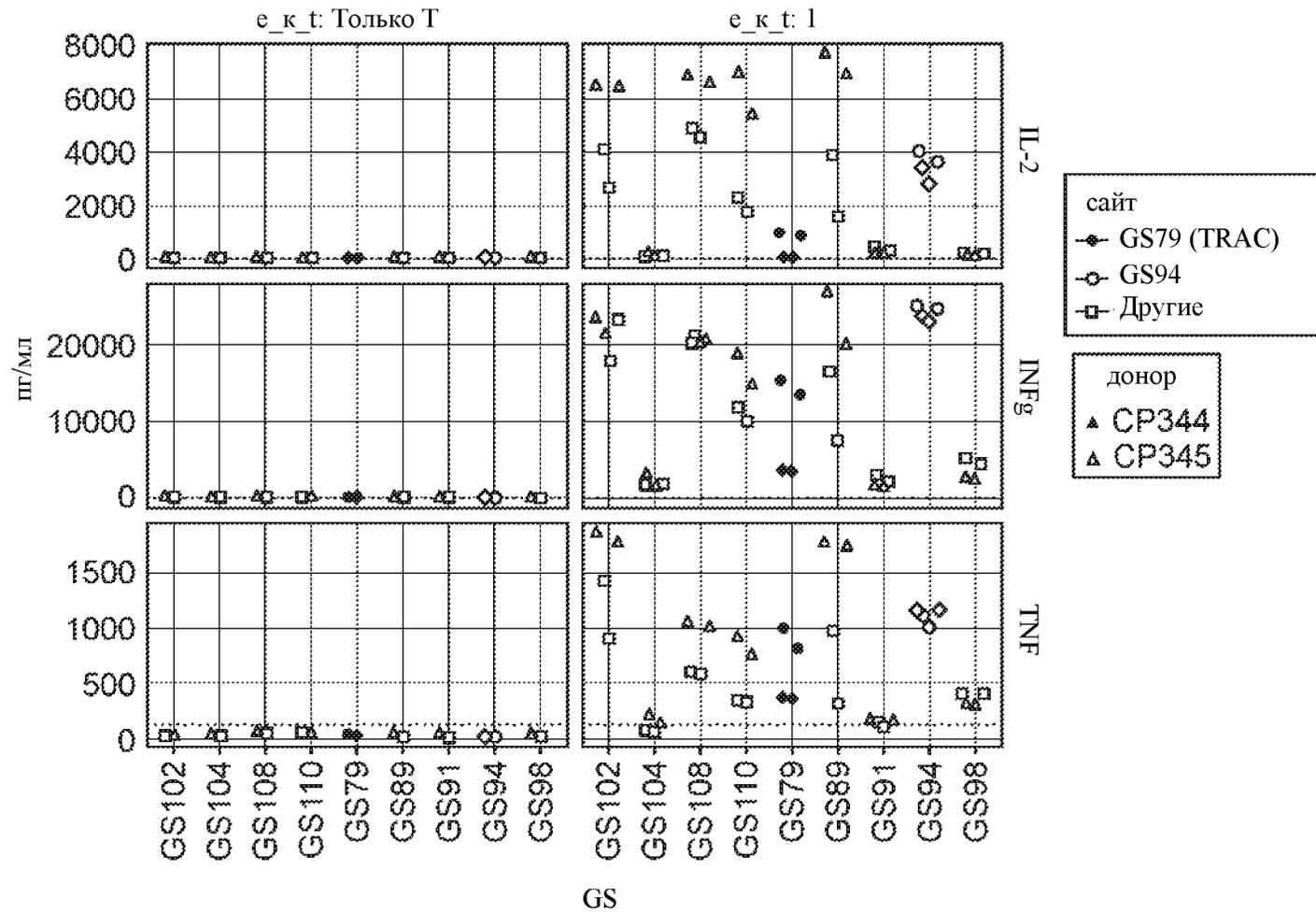
ФИГ. 9А



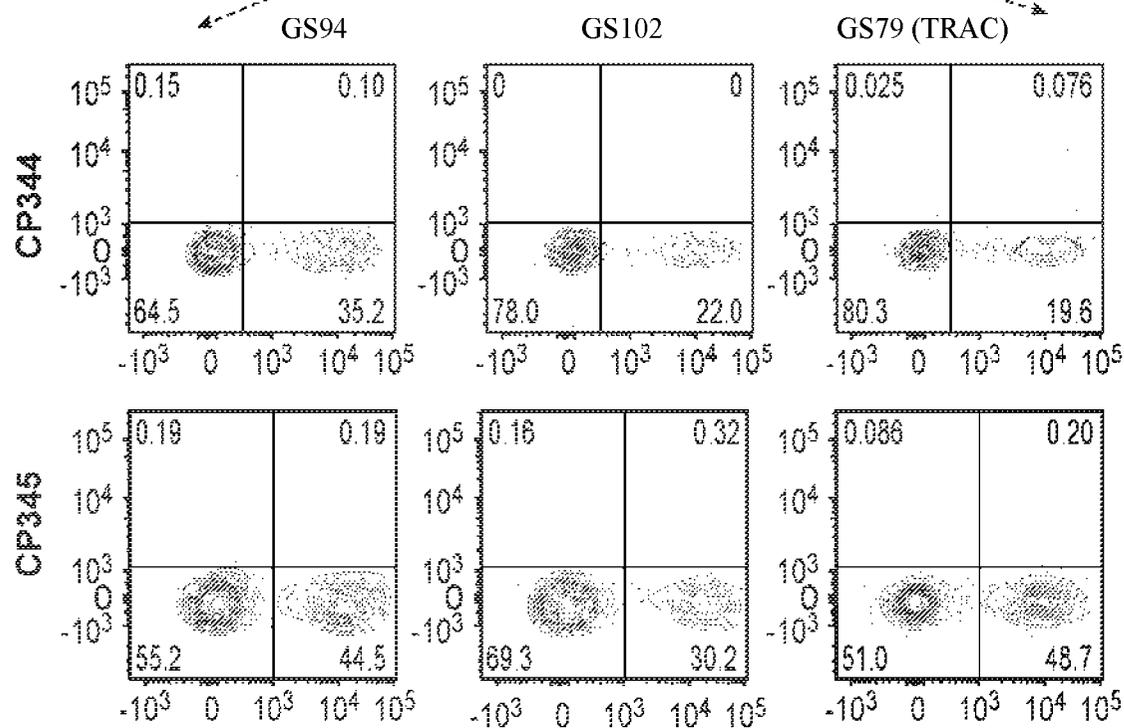
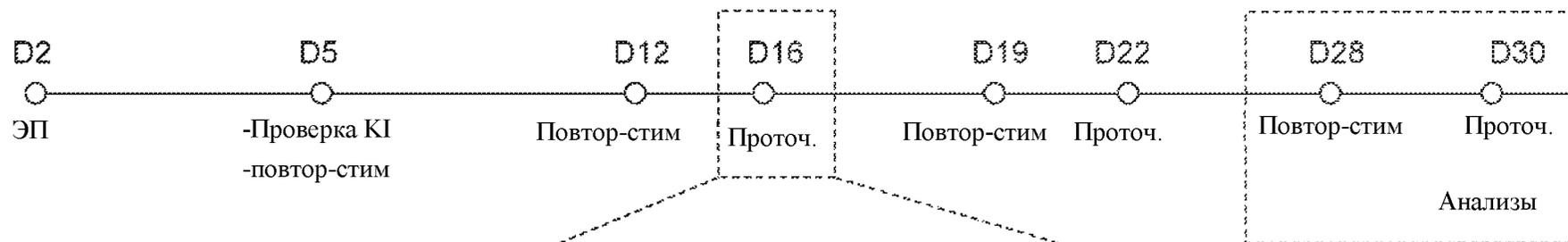
ФИГ. 9В



ФИГ. 10А



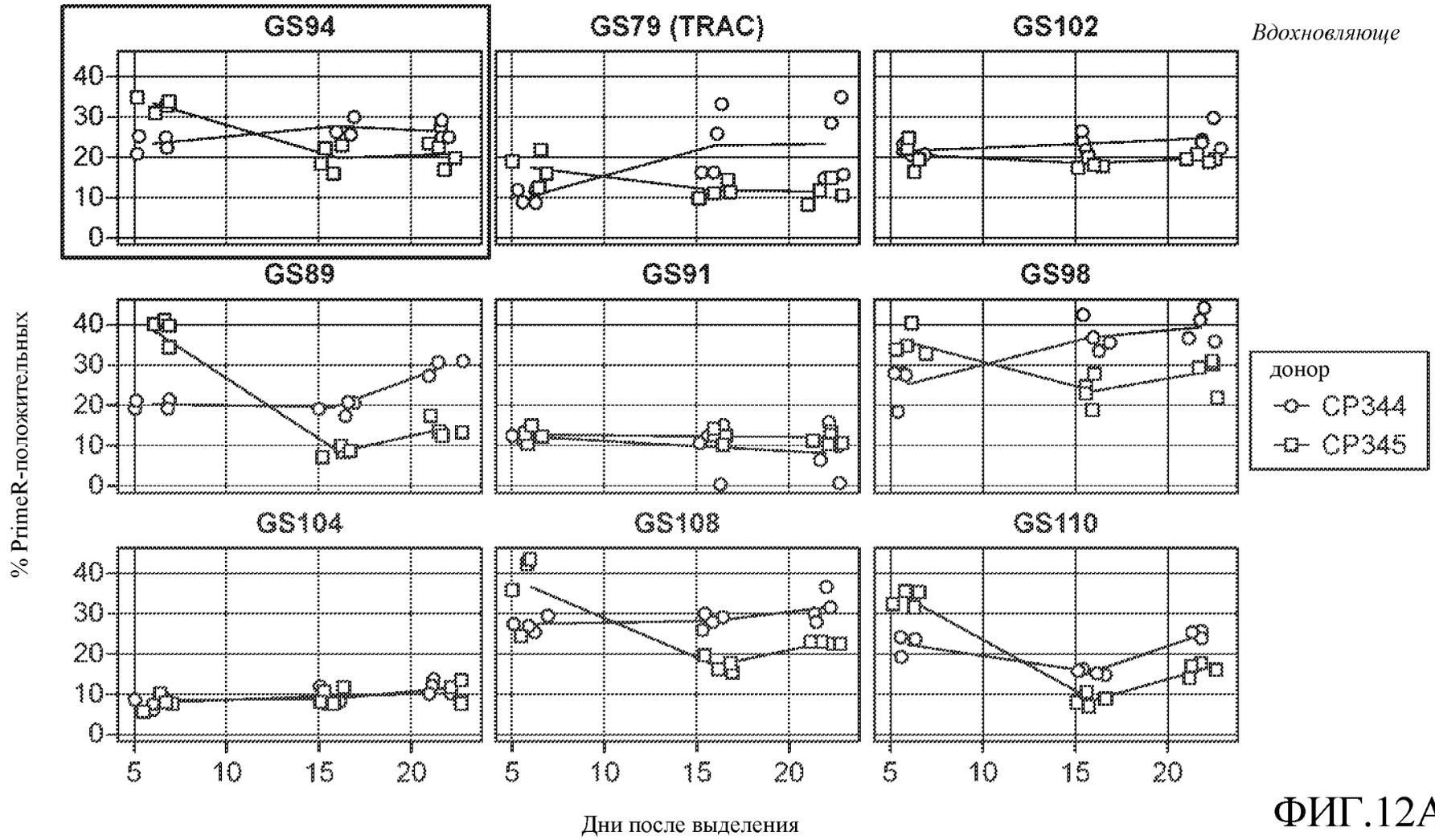
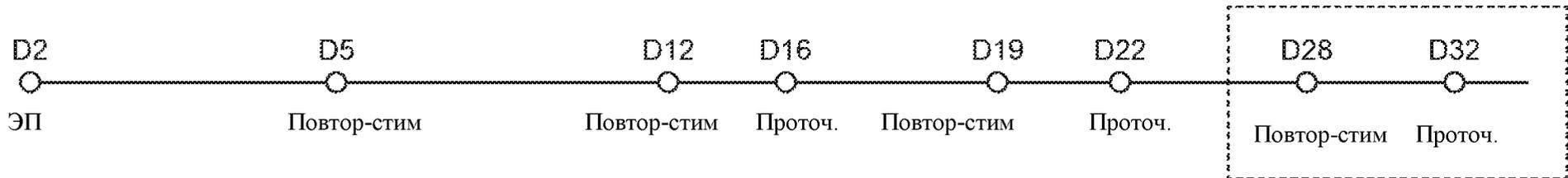
ФИГ. 10В



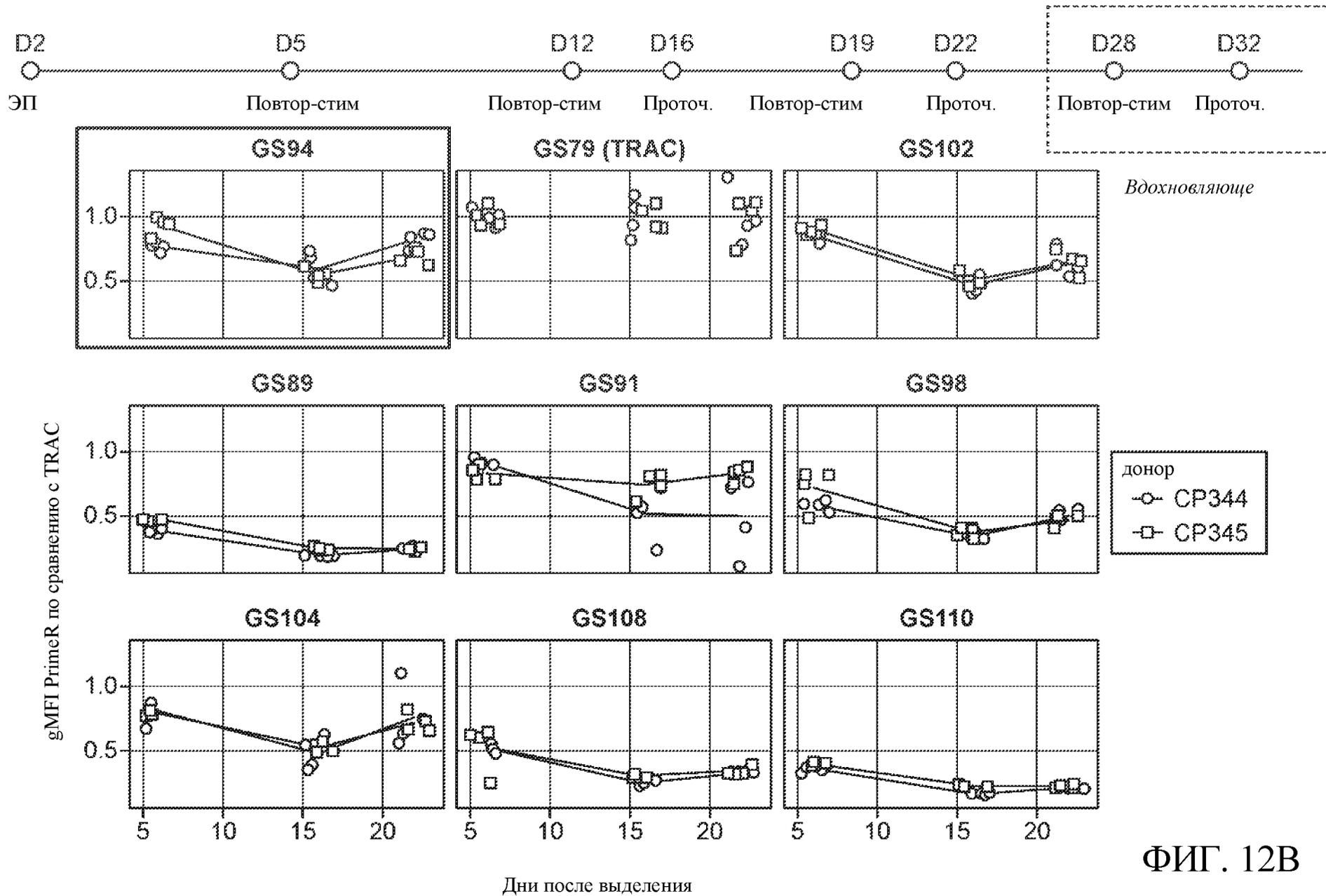
Вдохновляюще

12/22

ФИГ. 11

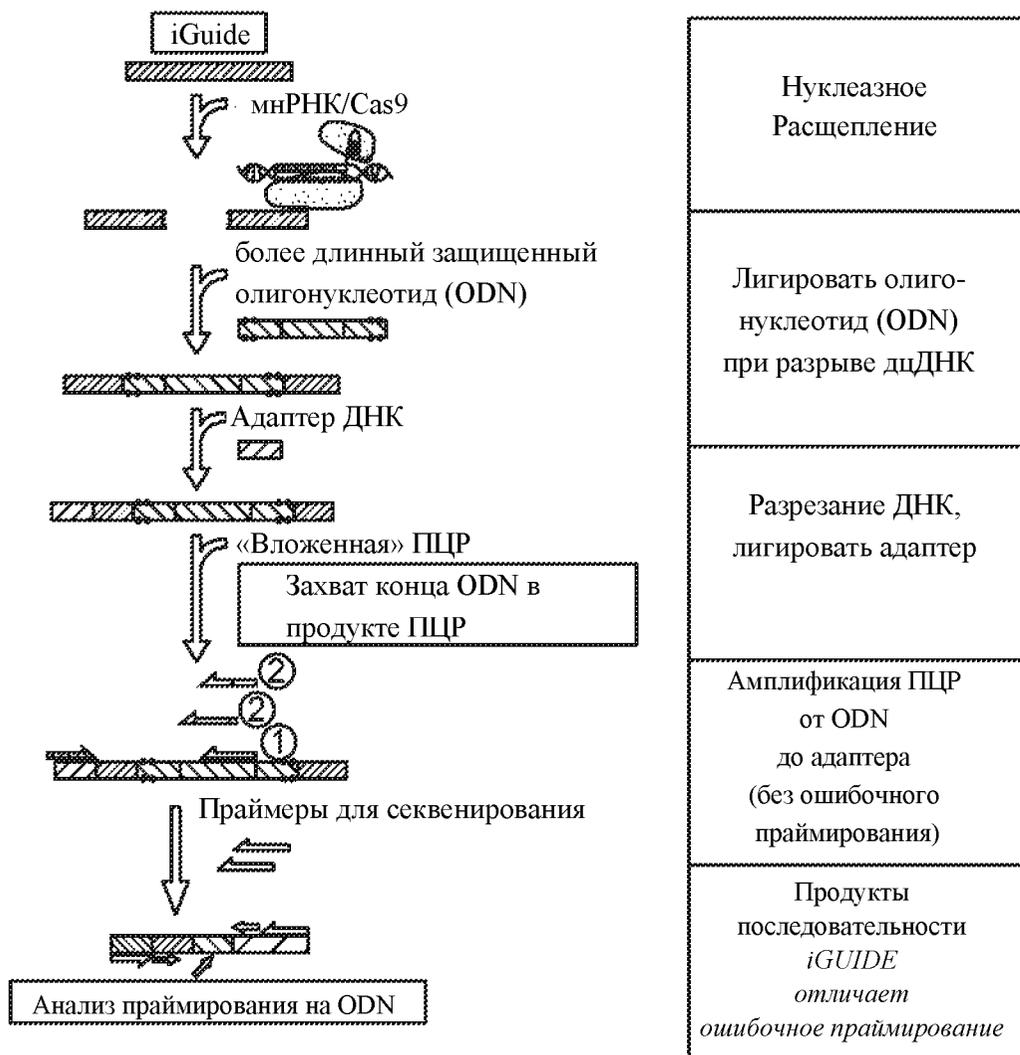


ФИГ.12А



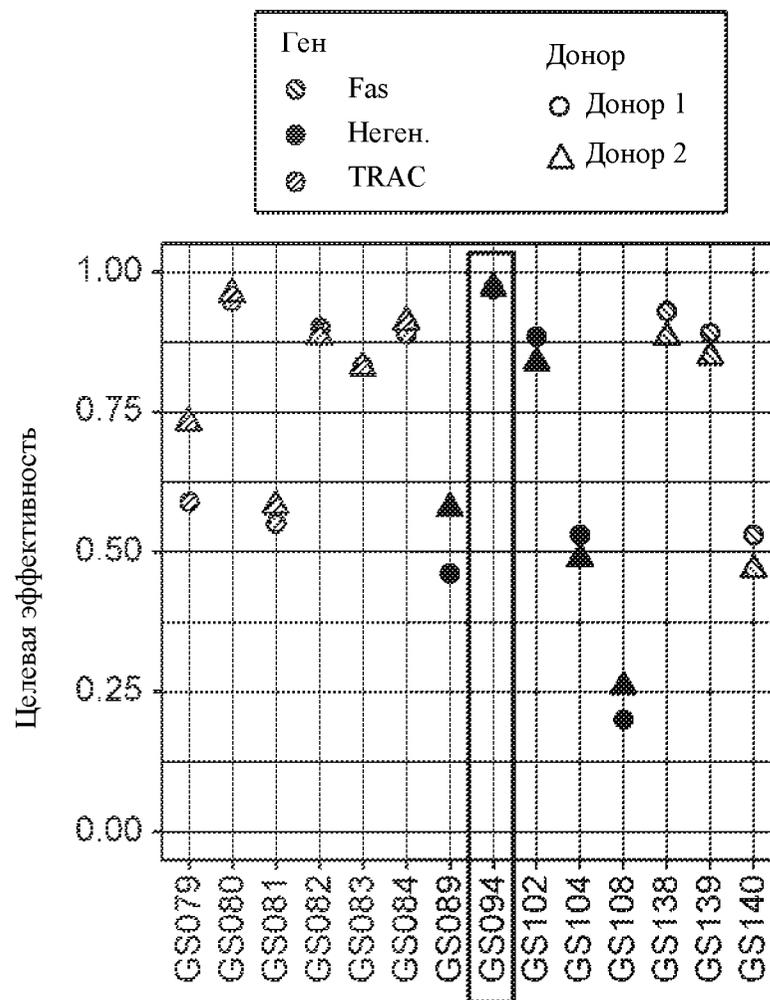
ФИГ. 12В

Анализ iGuide-Seq, используемый для определения целевой эффективности



Nobles et al. Genome Biol 2019

ФИГ. 13А



15/22

ФИГ. 13В

iGUIDE-seq 20 пМ 96 Вт мРНК _94 (G)

Мишень: мРНК_94

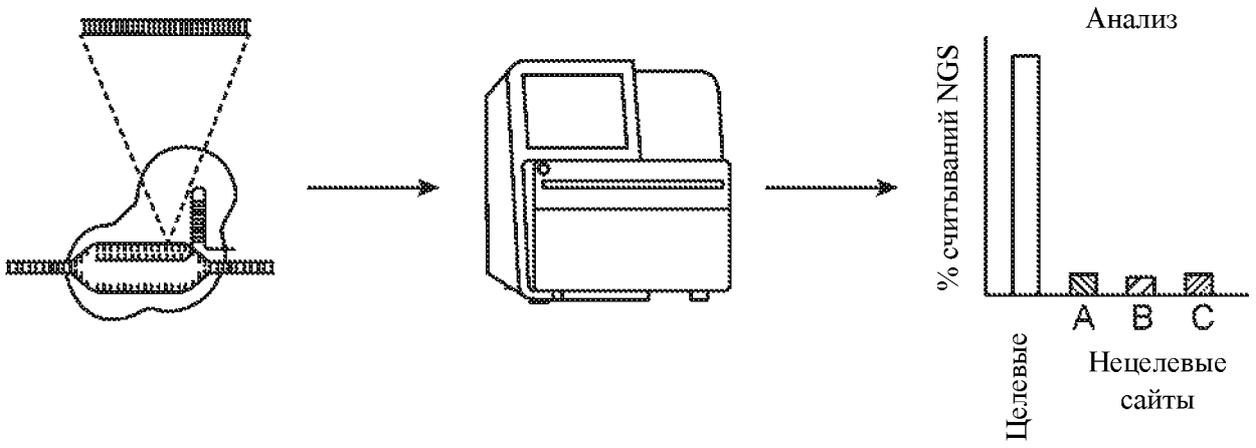
Секвенция	Несовпадение	Мишень	Содерж.	MESL	ID гена
GAAGCCATGCGCTGGCCTTACCAGCC	0	С	2,336	95,1	ETS1~
.....G	6	Без	7	23,9	RNU6-259P
A..I...I..C...T..C..TA	6	Без	5	32,3	RN7SKP254
C...A...C...C...T..C	6	Без	5	23,7	CYCSP17
...TCA...A...CA...T..	6	Без	4	95,1	RNU4-8P
..T...T...A...T...T..	6	Без	4	36,6	TBC1D14*
..A..C...S...C...TA	6	Без	4	35,4	MDFI*
..T...TCC...A...A...G..C	6	Без	3	32,3	LOC101928823*
.....A...AGCC...C...E	6	Без	3	30,0	MYBBP1A*~
CC...T...T...T...T...A	6	Без	3	29,4	HSPD1P15
..TA..A...C...CC...E					

iGUIDE-seq 20 пМ 96 Вт мРНК _94 (Донор 2)(G)

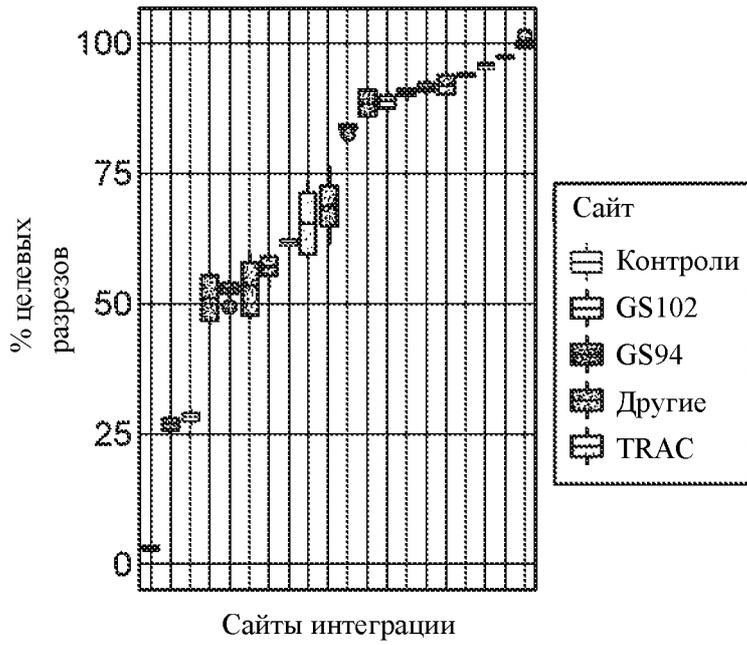
Мишень: мРНК_94

Секвенция	Несовпадение	Мишень	Содерж.	MESL	ID гена
GAAGCCATGCGCTGGCCTTACCAGCC	0	С	2164	95,5	ETS1~
.....G	6	Без	4	37,3	ZFPM1*
..A..A...I...TA...C...CA	6	Без	2	27,3	OR6D1P
..C...C...C...T..C	6	Без	2	25,2	NPHP4*
..GTE...GAG...TT	6	Без	1	80,5	ELN~
..GAT...A...E...A..T	6	Без	1	56,9	RAPGEF4*
..C...C...T...E...T...CA..T	6	Без	1	43,2	TMEM181*
..G...C...T...C...A...CA..T	6	Без	1	37,3	LDHD
..CA...C...E...A...T...AA	6	Без	1	37,3	LINC01392
..C...AG...A...E...C...C	6	Без	1	32,6	C14orf180

Объективный нецелевой рабочий процесс iGUIDE-seq

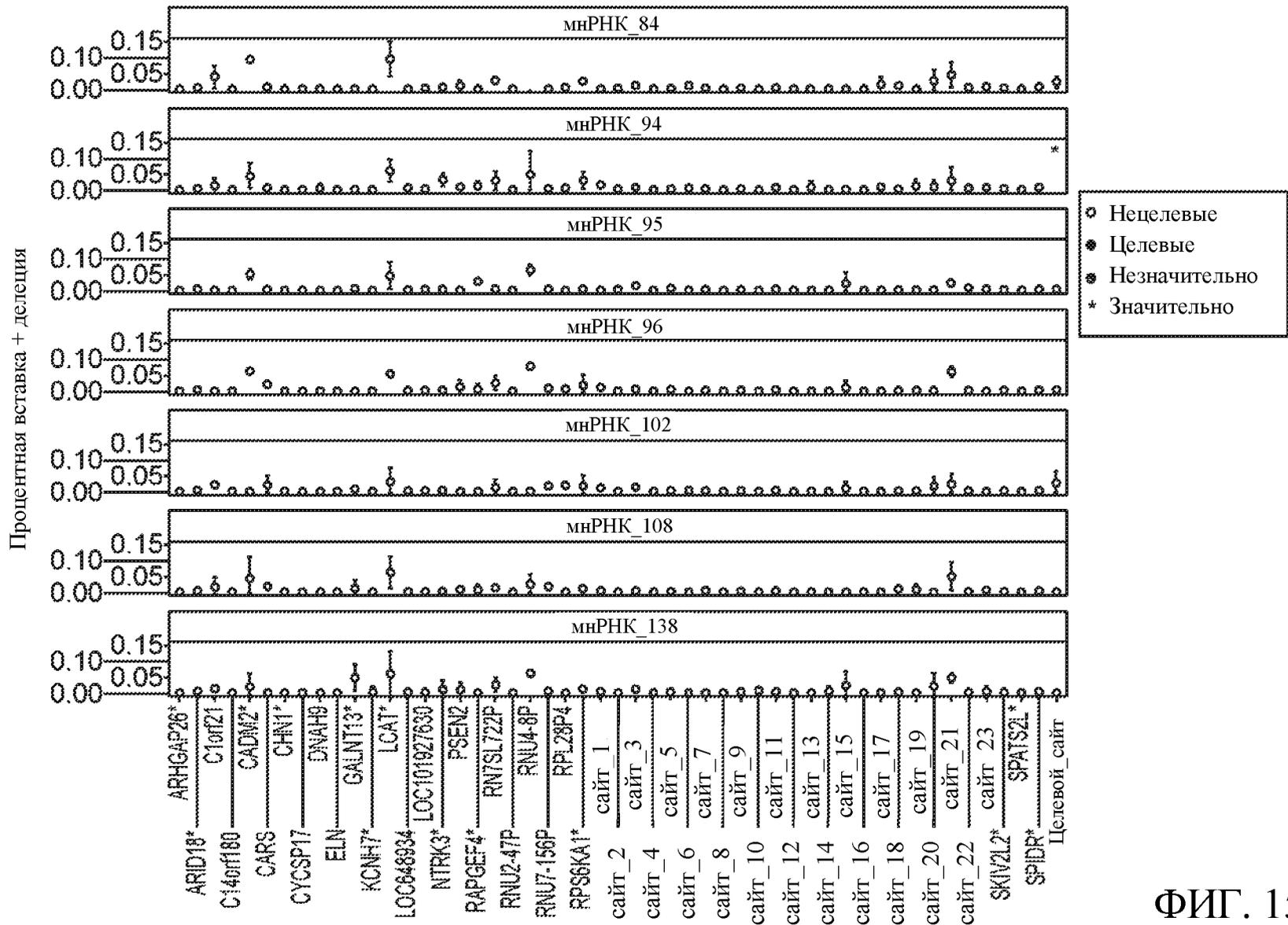


нРНК GS94 чрезвычайно специфична, и превосходит все другие оцененные нРНК.



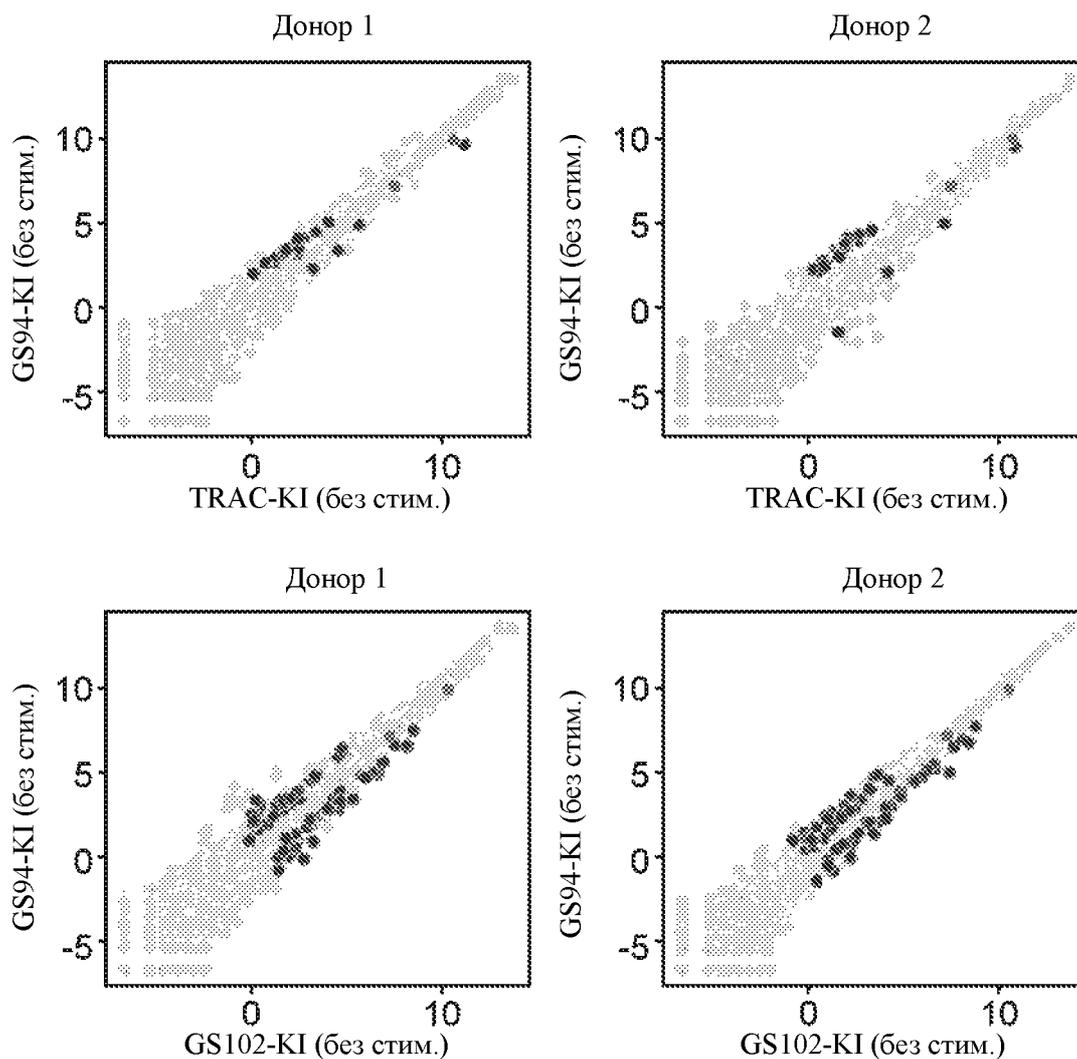
ФИГ. 14

Целевой rhAmpSeq предполагаемых нецелевых сайтов не показывает обнаруживаемых признаков расщепления с помощью РНП CRISPR EPed.



* целевое расщепление GS94 зашкаливает

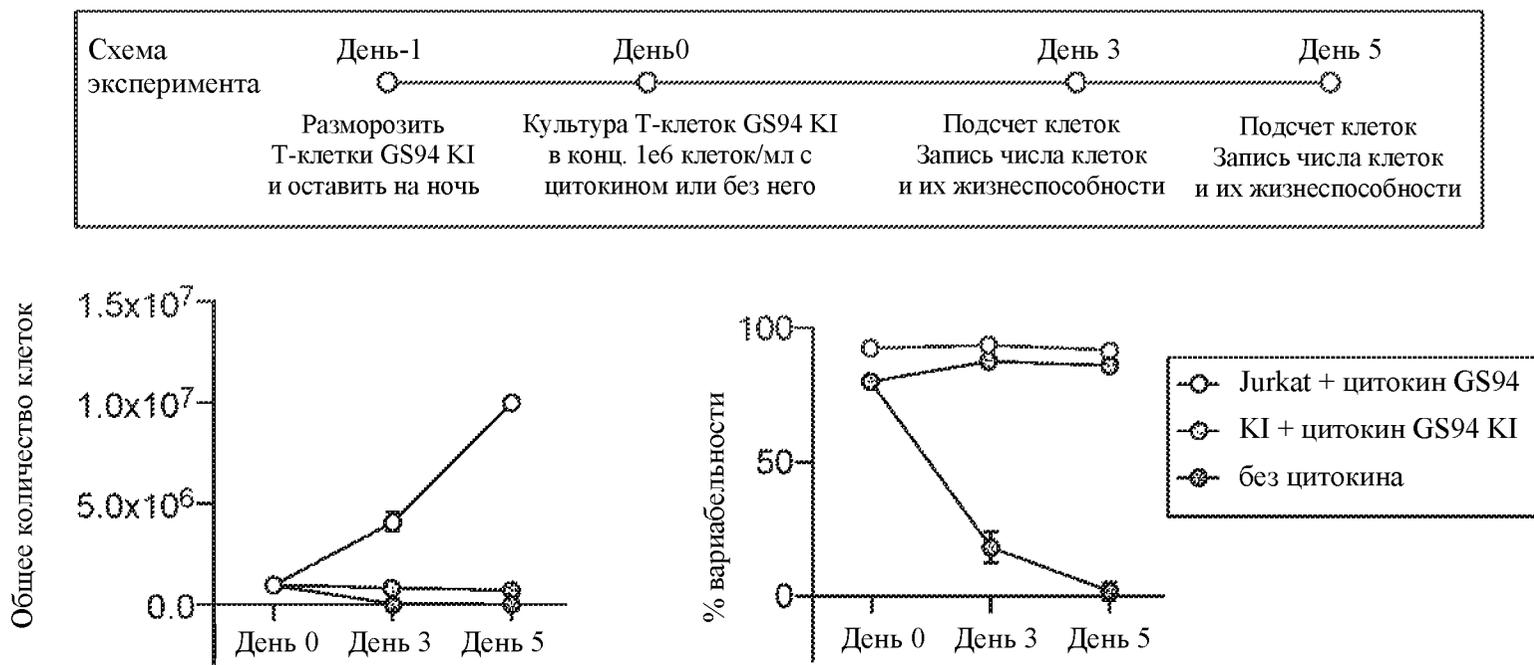
Отсутствие дифференциальной экспрессии *ETS1* и *FLII* в пределах 300 т.п.н. от GS94, минимальная дифференциальная экспрессия других генов



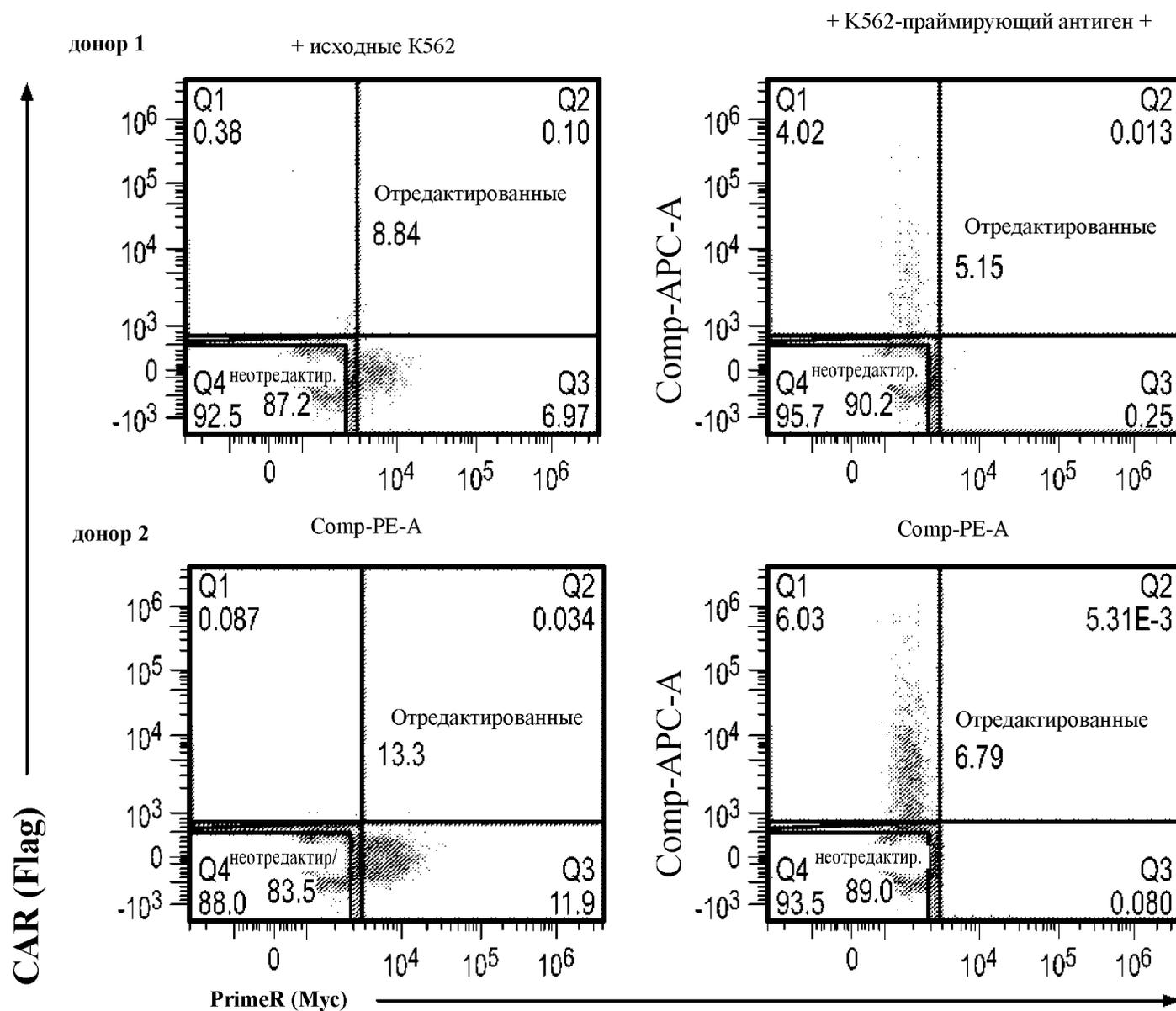
Темно-серые точки: кратность изменения > 2 , $-\log_{10}(\text{Q-значение}) > 2$, CPM > 2

ФИГ. 16

Нет доказательств независимого от цитокинов роста в первичных Т-клетках GS94 KI (краткосрочный анализ)



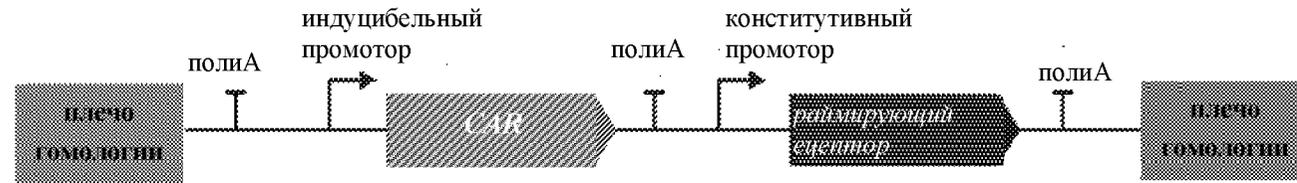
ФИГ. 17



ФИГ. 18

ФИГ. 19А

кассета 4,6 т.п.н.



ФИГ. 19В

кассета 8,3 т.п.н.

