

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392861 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.12

(51) Int. Cl. C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/87 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.13

(54) ОПОСРЕДОВАННОЕ ГОМОЛОГИЕЙ БЕЗВИРУСНОЕ СОЕДИНЕНИЕ КОНЦОВ

(31) 63/174,468

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.13

Купер Аарон, Су Пей Кэнь, Мут
Роберт, Труонг Энни, Гарднер Томас,
Су Брайан (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/024703

(87) WO 2022/221467 2022.10.20

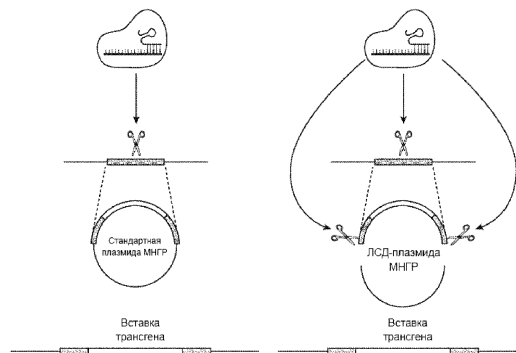
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

АРСЕНАЛ БАЙОСАЙЕНСЕЗ, ИНК.
(US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе представлены композиции и способы для получения генетически сконструированных клеток, таких как Т-клетки, со вставкой кассеты в определенный геномный локус. Также представлены способы применения генетически сконструированных клеток для лечения или предупреждения заболевания у субъекта.



A1

202392861

202392861

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579527EA/042

ОПОСРЕДОВАННОЕ ГОМОЛОГИЕЙ БЕЗВИРУСНОЕ СОЕДИНЕНИЕ КОНЦОВ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 63/174468, поданной 13 апреля 2021 года, которая настоящим включена в данный документ посредством ссылки во всей полноте и для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Применение кластеризованных, регулярно чередующихся коротких палиндромных повторов (CRISPR) и CRISPR-ассоциированных белков (Cas) произвело революцию в молекулярной биологии, сделав возможным редактирование генома. CRISPR-опосредованное редактирование генов является мощным и практичным инструментом, обладающим потенциалом для создания новых научных инструментов, коррекции клинически значимых мутаций и разработки новых видов иммунотерапии на основе клеток. Вирусные векторы доставки и электропорация появились в качестве двух стратегий редактирования иммунокомпетентных клеток на основе CRISPR. Однако область генной терапии была сопряжена с осложнениями, связанными с вирусными векторами доставки.

[0003] Способность манипулировать Т-клетками, гемопоэтическими стволовыми клетками и индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками обеспечивает как научный инструмент, так и потенциальный терапевтический путь к иммуоинженерии. До открытия CRISPR-Cas-редактирования генов в клетках человека генная терапия, направленная на иммунную систему, полагалась почти исключительно на вирусные векторы, такие как ретровирусы и лентивирусы, для введения трансгена путем (полу)случайной геномной интеграции. Однако клинические испытания имели непреднамеренные последствия, такие как лейкемия, вследствие внедрения в протоонкогены и фатальных системных иммунных реакций на вирусный вектор. Несмотря на усовершенствования вирусных векторов для минимизации генетических повреждений и иммунных реакций, вирусные вставки (такие как лентивирус, используемый в клинических условиях для генерации CAR-T-клеток) могут приводить к сверхэкспрессии генов, например, сверхэкспрессии генов, которые не поддаются эндогенной регуляции, что ограничивает клиническую применимость данного способа.

[0004] Безвирусное CRISPR-Cas-редактирование генов было описано. Однако эффективность редактирования и/или жизнеспособность при использовании таких систем, как правило, являются низкими. Например, повышение эффективности редактирования при использовании современных способов достигается за счет снижения жизнеспособности клеток, и наоборот. Необходимы усовершенствованные способы безвирусного CRISPR-Cas-редактирования генов, такие как способы, обладающие улучшенной эффективностью редактирования и обеспечивающие улучшенную жизнеспособность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В данном изобретении представлена композиция для модификации целевой нуклеиновой кислоты, содержащая: (а) белок нацеливаемой нуклеазы; и (b) донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР, англ. «HDR»); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД, англ. «CDL»), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД способна расщепляться белком нацеливаемой нуклеазы или комплексом, содержащим белок нацеливаемой нуклеазы, и при этом композиция составлена для безвирусной доставки в клетку.

[0006] Также в данном изобретении представлена композиция для модификации целевой нуклеиновой кислоты, содержащая: (а) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS; (b) донорную гидовую РНК (гРНК); и (с) донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ, англ. «PAM»), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД, и при этом композиция составлена для безвирусной доставки в клетку.

[0007] Также в данном изобретении представлен способ модификации целевой нуклеиновой кислоты клетки, способ, включающий в себя: обеспечение наличия клетки и процесс введения в клетку композиции или уже введенной в клетку композиции, составленной для безвирусной доставки, композиции, содержащей: (а) белок нацеливаемой нуклеазы; и (b) донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД способна расщепляться белком нацеливаемой нуклеазы или комплексом, содержащим белок нацеливаемой нуклеазы.

[0008] Также в данном изобретении представлен способ модификации целевой нуклеиновой кислоты клетки, способ, включающий в себя: обеспечение наличия клетки и

процесс введения в клетку композиции или уже введенной в клетку композиции, составленной для безвирусной доставки, композиции, содержащей: (a) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS; (b) донорную гидовую РНК (гРНК); и (c) донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД.

[0009] Также в данном изобретении представлен способ модификации целевой геномной последовательности клетки, способ, включающий в себя: обеспечение наличия клетки и процесс введения в клетку композиции или уже введенной в клетку композиции, составленной для безвирусной доставки, композиции, содержащей: (a) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS; (b) донорную гидовую РНК (гРНК); и (c) донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР), содержащую нуклеиновую кислоту для вставки, фланкированную гомологичными плечами; (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД, при этом донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой геномной последовательности клетки, и при этом гомологичные плечи комплементарны последовательностям нуклеиновых кислот, фланкирующим целевую геномную последовательность клетки, при этом нуклеиновая кислота для вставки сконфигурирована для вставки в целевую геномную последовательность клетки.

[0010] В некоторых аспектах белок нацеливаемой нуклеазы представляет собой РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит РНК, содержащую по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой

последовательности ЛСД. В некоторых аспектах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой белок Cas.

[0011] В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит донорную гидовую РНК (гРНК), сконфигурированную для образования комплекса, содержащего белок нацеливаемой нуклеазы, и при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит первую донорную гидовую РНК (гРНК), содержащую по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны первой целевой последовательности ЛСД, вторую донорную гРНК, содержащую по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны второй целевой последовательности ЛСД, при этом каждая донорная гРНК сконфигурирована для образования отличающегося комплекса, содержащего белок нацеливаемой нуклеазы, и при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД. В некоторых аспектах одна или большее число донорных гРНК содержат по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой геномной последовательности клетки. В некоторых аспектах матрица МНГР содержит гомологичные плечи, которые комплементарны последовательностям нуклеиновых кислот, фланкирующим целевую геномную последовательность клетки. В некоторых аспектах длина каждого из гомологичных плеч независимо выбрана из длины, составляющей по меньшей мере 400 п. о., по меньшей мере 500 п. о., по меньшей мере 600 п. о., по меньшей мере 700 п. о., по меньшей мере 800 п. о., по меньшей мере 900 п. о., 1000 п. о., по меньшей мере 1100 п. о., по меньшей мере 1200 п. о., по меньшей мере 1300 п. о., 1400 п. о., по меньшей мере 1500 п. о., по меньшей мере 1600 п. о., по меньшей мере 1700 п. о., по меньшей мере 1800 п. о., по меньшей мере 1900 п. о. или по меньшей мере 2000 п. о.

[0012] В некоторых аспектах: (а) нацеливаемая нуклеаза содержит РНК-направляемую нуклеазу, при этом РНК-направляемая нуклеаза содержит CRISPR-CAS; (b) композиция дополнительно содержит донорную гидовую РНК (гРНК), сконфигурированную для образования комплекса, содержащего белок нацеливаемой нуклеазы; и (с) при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД.

[0013] В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит второй белок нацеливаемой нуклеазы, при этом второй белок нацеливаемой нуклеазы или комплекс,

содержащий второй белок нацеливаемой нуклеазы, способен расщеплять целевую геномную последовательность клетки. В некоторых аспектах второй белок нацеливаемой нуклеазы представляет собой РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит вторую РНК, содержащую по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой геномной последовательности. В некоторых аспектах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой белок Cas. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит целевую гидовую РНК (гРНК), сконфигурированную для образования комплекса, содержащего второй белок нацеливаемой нуклеазы, и при этом: (1) целевая гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой геномной последовательности, и (2) целевая геномная последовательность функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевой геномной последовательности.

[0014] В некоторых аспектах первая целевая последовательность ЛСД, вторая целевая последовательность ЛСД и целевая геномная последовательность содержат одну и ту же последовательность нуклеиновой кислоты.

[0015] В некоторых аспектах целевая геномная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты локуса «безопасной гавани». В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты локуса «безопасной гавани» содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты: GAGCCATGCTTGGCTTACGA. В некоторых аспектах одна, обе или ни одна из последовательностей ППМ кодируются между целевыми последовательностями ЛСД и матрицей МНГР.

[0016] В некоторых аспектах нацеливаемая нуклеаза и каждая из гРНК находятся в молярном соотношении от 1:10 до 2:1, соответственно. В некоторых аспектах нацеливаемая нуклеаза и донорная матрица находятся в молярном соотношении от 10:1 до 1000:1, соответственно.

[0017] В некоторых аспектах белок нацеливаемой нуклеазы и/или второй белок нацеливаемой нуклеазы содержат ДНК-связывающий белок - эффектор, подобный активатору транскрипции (TAL), и нуклеазу.

[0018] В некоторых аспектах белок нацеливаемой нуклеазы и/или второй белок нацеливаемой нуклеазы содержат ДНК-связывающий белок с цинковыми пальцами и нуклеазу.

[0019] В некоторых аспектах белок нацеливаемой нуклеазы и/или второй белок нацеливаемой нуклеазы слиты с последовательностью сигнала ядерной локализации (СЯЛ).

[0020] В некоторых аспектах белок нацеливаемой нуклеазы и/или второй белок нацеливаемой нуклеазы представляют собой белок Cas9.

[0021] Также в данном документе представлен способ модификации целевой нуклеиновой кислоты в клетке, включающий в себя процесс введения в клетку композиций или уже безвирусно-введенных в клетку композиций, описанных в данном

документе, при этом матрица МНГР интегрирована в целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых аспектах введение включает в себя электропорацию. В некоторых аспектах клетка представляет собой первичную клетку. В некоторых аспектах первичная клетка представляет собой первичную Т-клетку.

[0022] Также в данном изобретении представлен рибонуклеопротеиновый комплекс для модификации целевой нуклеиновой кислоты, содержащий любую из композиций, описанных в данном документе.

[0023] Также в данном изобретении представлен рибонуклеопротеиновый комплекс для модификации целевой нуклеиновой кислоты, содержащий: (a) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS; и (b) донорную гидовую РНК (гРНК), при этом донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой последовательности линейаризации совместной доставки (ЛСД), и при этом композиция составлена для безвирусной доставки в клетку. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД.

[0024] Также в данном изобретении представлен способ модификации целевой нуклеиновой кислоты в клетке, включающий в себя введение в клетку любого рибонуклеопротеинового комплекса, описанного в данном документе. В некоторых аспектах введение включает в себя электропорацию. В некоторых аспектах клетка представляет собой первичную клетку. В некоторых аспектах первичная клетка представляет собой первичную Т-клетку. В некоторых аспектах способ выполняют *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*.

[0025] Также в данном изобретении представлен способ образования рибонуклеопротеинового комплекса (РНП-комплекса), включающий в себя инкубацию следующих или наличие проинкубированных следующих: (a) РНК-направляемой нуклеазы CRISPR-CAS; и (b) донорной гидовой РНК (гРНК), при этом донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой последовательности линейаризации совместной доставки (ЛСД). В некоторых аспектах белок Cas и гРНК инкубируют вместе при температуре 37°C в течение по меньшей мере 17 минут. В некоторых аспектах молярное соотношение гРНК:белок Cas составляет от

0,25:1 до 4:1. В некоторых аспектах РНП-комплекс имеет размер меньше чем 100 нм. В некоторых аспектах РНП-комплекс имеет размер от 20 нм до 90 нм.

[0026] Также в данном изобретении представлена композиция, содержащая донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД способна расщепляться белком нацеливаемой нуклеазы или комплексом, содержащим белок нацеливаемой нуклеазы. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит донорную гидовую РНК (гРНК), сконфигурированную для образования комплекса, содержащего белок нацеливаемой нуклеазы. В некоторых аспектах композиция содержит донорную белок нацеливаемой нуклеазы.

[0027] В некоторых аспектах донорная матрица содержит следующую последовательность, в направлении от 5' к 3': P1a-N1-P2b-N-P3c-N2-P4d, где: (1) P1, P2, P3 и P4 представляют собой последовательности ППМ; (2) N1 представляет собой первую целевую последовательность ЛСД и N2 представляет собой вторую целевую последовательность ЛСД; (3) N представляет собой матрицу МНГР; (4) a равно 0 и b равно 1, или a равно 1 и b равно 0; и (5) c равно 0 и d равно 1; или c равно 1 и d равно 0.

[0028] В определенных аспектах в данном изобретении представлен способ модификации целевой нуклеиновой кислоты клетки, способ, включающий в себя: обеспечение наличия клетки и процесс введения в клетку композиции или уже введенной в клетку композиции, составленной для безвирусной доставки, композиции, содержащей: (a) белок нацеливаемой нуклеазы; и (b) донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД способна расщепляться белком нацеливаемой нуклеазы или комплексом, содержащим белок нацеливаемой нуклеазы. В определенных аспектах в данном изобретении представлен способ модификации целевой нуклеиновой кислоты клетки, способ, включающий в себя: обеспечение наличия клетки и процесс введения в клетку композиции или уже введенной в клетку композиции, составленной для безвирусной доставки, композиции, содержащей: (a) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS; (b) донорную гидовую РНК (гРНК); и (c) донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной

доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД. В определенных аспектах в данном изобретении представлен способ модификации целевой геномной последовательности клетки, способ, включающий в себя: обеспечение наличия клетки и процесс введения в клетку композиции или уже введенной в клетку композиции, составленной для безвирусной доставки, композиции, содержащей: (а) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS; (б) донорную гидовую РНК (гРНК); и (с) донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР), содержащую нуклеиновую кислоту для вставки, фланкированную гомологичными плечами; (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД, при этом донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой геномной последовательности клетки, и при этом гомологичные плечи комплементарны последовательностям нуклеиновых кислот, фланкирующим целевую геномную последовательность клетки, при этом нуклеиновая кислота для вставки сконфигурирована для вставки в целевую геномную последовательность клетки. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой иммунокомпетентную клетку. В определенных вариантах осуществления иммунокомпетентная клетка представляет собой Т-клетку. В определенных вариантах осуществления Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку. В определенных вариантах осуществления предоставление композиции, составленной для безвирусной доставки, включает в себя электропорацию. В определенных вариантах осуществления количество донорной матрицы составляет по меньшей мере 80, 10-120, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 100, 110 или 120 мкг. В определенных вариантах осуществления число клеток для отдельной реакции электропорации составляет по меньшей мере 5, 1-10, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 или 10 e7. В

определенных вариантах осуществления общее число предоставляемых клеток составляет по меньшей мере больше чем 10^7 , и выполняется больше чем одна реакция электропорации. В определенных вариантах осуществления общий объем суспензии клеток составляет около 1 мл. В определенных вариантах осуществления способ приводит к увеличению вставки матрицы в целевую геномную последовательность клеток по сравнению с идентичной в остальном контрольной композицией, но не содержащей целевые последовательности ЛСД, необязательно при этом вставка матрицы увеличивается в по меньшей мере около 1-5, 1, 2, 3, 4 или 5 раз по сравнению с контролем.

Определения

[0029] При употреблении в контексте описания данного изобретения и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если из контекста явным образом не следует иное.

[0030] При употреблении в контексте данного документа «система CRISPR-Cas» относится к классу бактериальных систем для защиты от чужеродных нуклеиновых кислот. Системы CRISPR-Cas обнаружены в широком спектре эубактериальных и архейных организмов. Системы CRISPR-Cas включают в себя типы I, II и III, и подтипы. Системы CRISPR-Cas дикого II типа используют РНК-опосредованную нуклеазу, например, белок Cas9, в комплексе с гидовой и активирующей РНК (например, единой гидовой РНК, или еgРНК, англ. «sgRNA») для распознавания и расщепления чужеродных нуклеиновых кислот, например, чужеродных нуклеиновых кислот, включающих в себя встречающиеся в природе нуклеотиды или модифицированные нуклеотиды.

[0031] При употреблении в контексте данного документа термин «нацеливаемая нуклеаза» относится к белку, который может распознавать последовательность родственной последовательности нуклеиновой кислоты (например, целевой ген в геноме и/или целевую последовательность ЛСД) и связываться с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза способна модифицировать родственную последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза может представлять собой РНК-направляемую нуклеазу, например, белок Cas. В других вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза может представлять собой слитый белок, который включает в себя белок, способный связываться с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты (например, ДНК-связывающий белок - эффектор, подобный активатору транскрипции (TAL), или ДНК-связывающий белок с цинковыми пальцами), и белок, который может модифицировать родственную последовательность нуклеиновой кислоты (например, нуклеазу, активатор или репрессор транскрипции). В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза обладает нуклеазной активностью. В других вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза не обладает нуклеазной активностью. В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза способна модифицировать родственную последовательность нуклеиновой кислоты путем расщепления целевой нуклеиновой кислоты. Расщепленная целевая

нуклеиновая кислота затем может подвергаться гомологичной рекомбинации с близлежащей матрицей направляемой гомологией репарации (МНГР), например, посредством направляемой гомологией репарации или опосредованного гомологией соединения концов (ОГСК). В других вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза (например, нацеливаемые нуклеазы без какой-либо нуклеазной активности) может регулировать экспрессию родственной последовательности нуклеиновой кислоты. Например, нацеливаемая нуклеаза может представлять собой слитый белок, содержащий ДНК-связывающий белок - эффектор, подобный активатору транскрипции (TAL), и активатор транскрипции.

[0032] При употреблении в контексте данного документа термин «донорная матрица-плазмида» относится к полинуклеотиду, который включает в себя матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР) и целевые последовательности ЛСД. Матрица МНГР может включать в себя 5'-гомологичное плечо, нуклеотидную вставку (например, экзогенную последовательность и/или последовательность, которая кодирует гетерологичный белок или его фрагмент) и 3'-гомологичное плечо (например, см. фиг. 1). Как дополнительно описано в данном документе предварительная инкубация РНП-комплекса, содержащего нацеливаемую нуклеазу (например, белок Cas) и донорную гРНК, и донорной матрицы-плазмиды перед электропорацией улучшает выход нокина, например, за счет повышения эффективности нокина и/или снижения цитотоксичности.

[0033] При употреблении в контексте данного документа термин «целевая последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД)» относится к нуклеотидной последовательности, которая распознается и связывается нацеливаемой нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза, например, ДНК-связывающий белок - эффектор, подобный активатору транскрипции (TAL), или ДНК-связывающий белок с цинковыми пальцами, может прямо распознавать и связывать целевую последовательность ЛСД. В других вариантах осуществления нацеливаемые нуклеазы, например, РНК-направляемая нуклеаза, могут непрямо распознавать и связывать целевую последовательность ЛСД через донорную гРНК. РНК-направляемая нуклеаза связывается с донорной гРНК, в то время как донорная гРНК гибридизуется с целевой последовательностью ЛСД. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность ЛСД представляет собой часть целевой геномной нуклеиновой кислоты.

[0034] При употреблении в контексте данного документа «РНК-направляемая нуклеаза» относится к нуклеазе, которая связывается с гидовой РНК (гРНК) и использует гРНК для избирательного связывания участков внутри полинуклеотида ДНК. В общем случае, РНК-направляемая нуклеаза может избирательно связывать практически любую последовательность внутри полинуклеотида ДНК, которая комплементарна гРНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза обладает нуклеазной активностью и может расщеплять связи (например, фосфодиэфирные связи) между нуклеотидами в полинуклеотиде ДНК. В других вариантах осуществления РНК-

направляемая нуклеаза не обладает нуклеазной активностью и может использоваться для избирательного связывания и/или локализации других белков (например, активаторов или репрессоров транскрипции), которые слиты с РНК-направляемой нуклеазой, в представляющей интерес области внутри полинуклеотида ДНК.

[0035] При употреблении в контексте данного документа термин «гидовая РНК», или «гРНК», относится к ДНК-нацеливающей РНК, которая может направлять РНК-направляемую нуклеазу (например, белок Cas) к родственной последовательности нуклеиновой кислоты путем гибридизации с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК может представлять собой единую гидовую РНК (егРНК), которая содержит: (1) гидовую последовательность (например, эквивалентную sg-РНК часть единой гидовой РНК), которая направляет РНК-направляемую нуклеазу к родственной последовательности нуклеиновой кислоты, и (2) каркасную последовательность (например, эквивалентную tracr-РНК часть единой гидовой РНК), которая взаимодействует с РНК-направляемой нуклеазой. В других вариантах осуществления гидовая РНК может содержать два компонента: (1) гидовую последовательность (например, эквивалентную sg-РНК часть единой гидовой РНК), которая направляет РНК-направляемую нуклеазу к родственной последовательности нуклеиновой кислоты, и (2) каркасную последовательность (например, эквивалентную tracr-РНК часть единой гидовой РНК), которая взаимодействует с РНК-направляемой нуклеазой. Часть гидовой последовательности может гибридизоваться с частью каркасной последовательности с образованием двухкомпонентной гидовой РНК.

[0036] При употреблении в контексте данного документа термин «целевая гидовая РНК», или «целевая гРНК», относится к гРНК, которая может гибридизоваться с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей модификации, например, в местоположении в полинуклеотиде ДНК, где желательна интеграция матрицы МНГР, такой как геном Т-клетки и/или геномные местоположения локусов «безопасной гавани».

[0037] При употреблении в контексте данного документа термин «донорная гидовая РНК», или «донорная гРНК», относится к гРНК, которая может гибридизовать целевую последовательность ЛСД внутри донорной матрицы-плазмиды. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность ЛСД может быть комплементарной (например, частично комплементарной или полностью комплементарной) участку последовательности донорной гРНК, имеющему такую же длину.

[0038] При употреблении в контексте данного документа термин «единая гидовая РНК», или «егРНК», относится к ДНК-нацеливающей РНК, включающей в себя: (1) гидовую последовательность (например, эквивалентную sg-РНК часть единой гидовой РНК), которая направляет белок Cas к родственной последовательности нуклеиновой кислоты, и (2) каркасную последовательность (например, эквивалентную tracr-РНК часть единой гидовой РНК), которая взаимодействует с белком Cas.

[0039] При употреблении в контексте данного документа термин «комплементарность» или «комплементарный (-ая, -ое, -ые)» относится к способности образовывать пары оснований между нуклеиновыми основаниями, нуклеозидами или нуклеотидами, а также к способности образовывать пары оснований между одним полинуклеотидом и другим полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления один полинуклеотид может обладать «полной комплементарностью», или быть «полностью комплементарным», с другим полинуклеотидом, что означает, что когда два полинуклеотида необязательно выровнены, каждый нуклеотид в одном полинуклеотиде может образовывать пары оснований по Уотсону - Крику с соответствующим ему нуклеотидом в другом полинуклеотиде. В других вариантах осуществления один полинуклеотид может обладать «частичной комплементарностью», или быть «частично комплементарным», с другим полинуклеотидом, что означает, что когда два полинуклеотида необязательно выровнены, по меньшей мере 60% нуклеотидов (например, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 97% нуклеотидов), но меньше чем 100% нуклеотидов, в одном полинуклеотиде могут образовывать пары оснований по Уотсону - Крику с соответствующими им нуклеотидами в другом полинуклеотиде. Другими словами, при гибридизации двух таких полинуклеотидов будет по меньшей мере одна (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять) пара несовпадающих нуклеотидных оснований. Пары нуклеотидов, которые вступают в образование пар оснований по Уотсону - Крику, включают в себя, например, аденин и тимин, цитозин и гуанин, а также аденин и урацил, при этом все данные пары все соединяются посредством образования водородных связей. Примеры несовпадающих оснований включают в себя гуанин и урацил, гуанин и тимин, а также пару аденина и цитозина.

[0040] При употреблении в контексте данного документа термин «белок Cas» относится к белку или нуклеазе, ассоциированным с кластеризованными, регулярно чередующимися короткими палиндромными повторами. Белок Cas может представлять собой белок Cas дикого типа или вариант белка Cas. Белок Cas9 является примером белка Cas, который принадлежит к системе CRISPR/Cas типа II (например, Rath et al., *Biochimie* 117:119, 2015). Другие примеры белков Cas подробно описаны далее в данном документе. Встречающийся в природе белок Cas типа II, как правило, требует как cr-РНК, так и tracr-РНК для сайт-специфического распознавания и расщепления ДНК. cr-РНК связывается через область частичной комплементарности с tracr-РНК, чтобы направлять белок Cas в область целевой ДНК, гомологичную cr-РНК, называемую «протоспейсером». Встречающийся в природе белок Cas типа II расщепляет ДНК, образуя тупые концы при двухцепочечном разрыве цепи в сайтах, на которые нацеливает гидовая последовательность, содержащаяся в транскрипте cr-РНК. В некоторых вариантах осуществления композиций и способов, описанных в данном документе, белок Cas связывается с целевой гРНК или донорной гРНК с образованием рибонуклеопротеинового комплекса (РНП-комплекса). В некоторых вариантах осуществления композиций и

способов, описанных в данном документе, белок Cas обладает нуклеазной активностью. В других вариантах осуществления белок Cas не обладает нуклеазной активностью.

[0041] При употреблении в контексте данного документа термин «вариант белка Cas» относится к белку Cas, который имеет по меньшей мере одно аминокислотное замещение (например, одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или большее число аминокислотных замещений) по сравнению с последовательностью белка Cas дикого типа и/или представляет собой усеченную версию или фрагмент белка Cas дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта белка Cas на по меньшей мере 75% идентична (например, на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична) последовательности белка Cas дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант белка Cas представляет собой фрагмент белка Cas дикого типа и имеет по меньшей мере одно аминокислотное замещение по сравнению с последовательностью белка Cas дикого типа. Вариант белка Cas может представлять собой вариант белка Cas9. В некоторых вариантах осуществления вариант белка Cas обладает нуклеазной активностью. В других вариантах осуществления вариант белка Cas не обладает нуклеазной активностью.

[0042] При употреблении в контексте данного документа термин «рибонуклеопротеиновый комплекс», или «РНК-комплекс», относится к комплексу, содержащему белок или вариант Cas (например, белок или вариант Cas9) и гРНК.

[0043] При употреблении в контексте данного документа термин «модификация» в контексте модификации целевой нуклеиновой кислоты в геноме клетки относится к индуцированию изменения (например, расщепления) в целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления такое изменение может представлять собой структурное изменение в последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Например, модификация может принимать форму вставки нуклеотидной последовательности в целевую нуклеиновую кислоту. Например, экзогенная нуклеотидная последовательность может быть вставлена в целевую нуклеиновую кислоту. Целевая нуклеиновая кислота также может быть удалена и замещена экзогенной нуклеотидной последовательностью. В другом примере модификация может принимать форму расщепления целевой нуклеиновой кислоты без вставки нуклеотидной последовательности в целевую нуклеиновую кислоту. Например, целевая нуклеиновая кислота может быть расщеплена и удалена. Такую модификацию можно выполнять, например, путем индуцирования двухцепочечного разрыва внутри целевой нуклеиновой кислоты, или индуцирования пары одноцепочечных надразов на противоположных цепях, и фланкирования целевой нуклеиновой кислоты. Способы индуцирования одноцепочечных или двухцепочечных разрывов на целевой нуклеиновой кислоте или внутри нее включают в себя применение нацеливаемой нуклеазы (например, белка Cas), как описано в данном документе, направленной на целевую нуклеиновую кислоту. В других вариантах осуществления модификация целевой нуклеиновой кислоты включает в себя нацеливание другого белка

на данную целевую нуклеиновую кислоту и не включает в себя расщепление данной целевой нуклеиновой кислоты.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0044] Данная заявка включает в себя следующие графические материалы. Данные графические материалы предназначены для иллюстрации определенных вариантов осуществления и/или особенностей композиций и способов, а также для дополнения любого (любых) описания (описаний) композиций и способов. Данные графические материалы не ограничивают область применения композиций и способов, за исключением случаев, когда в письменном описании прямо указано такое ограничение.

[0045] Фиг. 1 представляет собой концептуальный чертеж, иллюстрирующий примерный механизм конструкции плазмиды ЛСД (линеаризация совместной доставки) для опосредования геномной вставки кассеты. Как показано справа, добавление последовательности ЛСД (целевой последовательности для Cas9, идентичной геномной цели Cas9 для МНГР-интеграции) и примыкающего к протоспейсеру мотива (ППМ), состоящего из 3 пар оснований, за пределами гомологичных плеч, фланкирующих кассету, позволяет эндонуклеазной активности, опосредованной рибонуклеопротеином (РНП) Cas9 - еРНК, высвободить кассету плюс гомологичные плечи из плазмиды, в дополнение к надрезу в геноме, опосредованному РНП Cas9 - еРНК. Напротив, при использовании стандартной плазмиды, показанной слева, РНП Cas9 - еРНК разрезает только геномный локус, но не плазмиду.

[0046] Фиг. 2 представляет собой точечные диаграммы проточной цитометрии и графики, показывающие эффективность нокина (КИ) и выход КИ-клеток из Т-клеток, электропорированных РНП CRISPR и матрицами направляемой гомологией репарации (МНГР) либо стандартных плазмид, либо плазмид ЛСД. Фиг. 2А представляет собой серию точечных графиков проточной цитометрии Т-клеток, электропорированных РНП CRISPR, и различных доз (увеличивающихся слева направо, в диапазоне 0-100 мг/л) матриц направляемой гомологией репарации (МНГР) либо стандартных плазмид (верхние панели), либо плазмид ЛСД (нижние панели), кодирующих поверхностный белок, меченный МУС. Фиг. 2В представляет собой график, показывающий % КИ при различных дозах либо стандартных плазмид, либо плазмид ЛСД. Фиг. 2С представляет собой график, показывающий выход жизнеспособных клеток КИ⁺ (окрашивание относительно живых/мертвых клеток; ThermoFisher) на 1 миллион исходных клеток при различных дозах либо стандартных плазмид, либо плазмид ЛСД.

[0047] Фиг. 3 представляет собой график, показывающий соотношение CD8/CD4 при различных дозах либо стандартных плазмид, либо плазмид ЛСД.

[0048] Фиг. 4 представляет собой график, показывающий экспрессию трансгена в трансфицированных Т-клетках, электропорированных 3-мя плазмидами, содержащими последовательность ЛСД - GAGCCATGCTTGGCTTACGA, и 3-мя плазмидами, содержащими последовательности не ЛСД, в сутки 6 после электропорации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0049] В нижеследующем описании перечислены различные аспекты и варианты осуществления композиций и способов, представленных в данном документе. Ни один конкретный вариант осуществления не предназначен для определения объема композиций и способов. Скорее, варианты осуществления просто предоставляют неограничивающие примеры различных композиций и способов, которые по меньшей мере включены в объем раскрытых композиций и способов. Данное описание следует читать с точки зрения рядового специалиста в данной области техники; следовательно, информация, хорошо известная квалифицированному специалисту, не обязательно включена.

I. Вступление

[0050] Модифицированные вирусом Т-клетки одобрены для иммунотерапии онкологических заболеваний, но для более широкого спектра адоптивных клеточных способов лечения необходимы более универсальные и точные модификации генома (Yin et al., *Nat Rev Clin Oncol*, 16 (5): 281-295, 2019; Dunbar et al., *Science* 359: 6372, 2018; Cornu et al., *Nat Med* 23: 415-423, 2017; и David and Doherty, *Toxicol Sci* 155: 315-325, 2017). Нуклеазная система CRISPR (кластеризованные, регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы) - Cas (CRISPR-ассоциированный белок) представляет собой сконструированную нуклеазную систему, основанную на бактериальной системе, которую можно применять для геномной инженерии. Она основана на части адаптивного иммунного ответа многих бактерий и архей. Когда вирус или плазида внедряется в бактерию, сегменты ДНК захватчика преобразуются в CRISPR-РНК (сг-РНК) в результате «иммунного» ответа. Затем сг-РНК связывается через область частичной комплементарности с другим типом РНК, называемой tracr-РНК, чтобы направлять нуклеазу Cas (например, Cas9) в область целевой ДНК, гомологичную сг-РНК, называемую «протоспейсером». Нуклеаза Cas (например, Cas9) расщепляет ДНК с образованием тупых концов при двухцепочечном разрыве цепи в сайтах, на которые нацеливает 20-нуклеотидная гидовая последовательность, содержащаяся в транскрипте сг-РНК. Нуклеазе Cas (например, Cas9) может потребоваться как сг-РНК, так и tracr-РНК для сайт-специфического распознавания и расщепления ДНК. В настоящее время данная система сконструирована так, что сг-РНК и tracr-РНК могут быть объединены в одну молекулу («единая гидовая РНК», «егРНК»), и эквивалентная сг-РНК часть егРНК может быть сконструирована так, чтобы направлять нуклеазу Cas (например, Cas9) на нацеливание на любую желаемую последовательность (см., например, работы Jinek et al. (2012) *Science* 337: 816-821; Jinek et al. (2013) *eLife* 2: e00471; Segal (2013) *eLife* 2: e00563). Следовательно, систему CRISPR-Cas можно сконструировать для создания двухцепочечного разрыва в желаемой цели в геноме клетки и использования эндогенных механизмов клетки для восстановления индуцированного разрыва путем направляемой гомологией репарации (МНГР) или негомологичного соединения концов (НГСК, англ. «NHEJ»).

[0051] Как описано в данном документе, авторы данного изобретения обнаружили, что последовательности, на которые нацелены нуклеазы, при добавлении на концах

матрицы направляемой гомологией репарации (МНГР) могут повышать эффективность модификации целевой нуклеиновой кислоты. Невирусные стратегии, такие как электропорация, для доставки системы CRISPR-Cas в клетку для генетической модификации позволяют избежать многих осложнений, связанных с вирусной доставкой, таких как фатальные системные иммунные реакции на вирусные векторы, неэффективность вирусной доставки и сверхэкспрессия генов, связанная с вирусной вставкой. Однако в некоторых случаях при использовании безвирусных стратегий доставки системы CRISPR-Cas могут возникнуть необходимость в больших количествах матрицы МНГР и дозозависимая цитотоксичность.

II. Композиции

[0052] В данном изобретении представлены композиции и способы для модификации целевой нуклеиновой кислоты, которые включают в себя: (a) белок нацеливаемой нуклеазы; и (b) донорную матрицу-плазмиду, содержащую: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД способна расщепляться белком нацеливаемой нуклеазы или комплексом, содержащим белок нацеливаемой нуклеазы, и при этом композиция составлена для безвирусной доставки в клетку. Как подробно описано далее в данном документе, в некоторых вариантах осуществления, когда нацеливаемая нуклеаза представляет собой эффектор, подобный активатору транскрипции (ТАL), эффектор ТАL может напрямую распознавать целевую последовательность ЛСД и связываться с ней. В некоторых вариантах осуществления, когда нацеливаемая нуклеаза представляет собой нуклеазу с цинковым пальцем, цинковый палец может напрямую распознавать целевую последовательность ЛСД и связываться с ней. В других вариантах осуществления, когда нацеливаемая нуклеаза представляет собой РНК-направляемую нуклеазу (например, белок Cas), РНК-направляемая нуклеаза может непрямо связываться с целевой последовательностью ЛСД через донорную гРНК, которая может гибридизоваться с целевой последовательностью ЛСД. Не ограничиваясь какой-либо теорией, нацеливаемая нуклеаза служит для расщепления целевой последовательности ЛСД, тем самым удаляя матрицу МНГР из донорной матрицы-плазмиды, позволяя матрице МНГР участвовать в опосредованном гомологией соединении концов (ОГСК, англ. «НМЕJ»). Эффективность нокина может поддерживаться или даже увеличиваться при использовании меньших количеств донорной матрицы-плазмиды с помощью ОГСК-нацеленного процесса, описанного в данном документе, а также может приводить к снижению ДНК-индуцированной цитотоксичности. Следовательно, целевые последовательности ЛСД могут повышать эффективность вставки МНГР в целевые

клетки, одновременно снижая токсичность и увеличивая общий выход отредактированных клеток.

III. CRISPR/Cas

[0053] В некоторых вариантах осуществления композиций и способов, описанных в данном документе, нацеливаемая нуклеаза представляет собой РНК-направляемую нуклеазу, и донорная матрица дополнительно содержит примыкающие к протоспейсеру мотивы (ППМ), непосредственно примыкающие к целевым последовательностям ЛСД. Композиция может также дополнительно содержать целевую гидовую РНК (гРНК), которая комплементарна целевой нуклеиновой кислоте, подлежащей модификации, например, целевой геномной последовательности, такой как желаемый сайт для вставки трансгена в клетку (например, Т-клетку). Целевая гРНК может образовывать первый РНП-комплекс с первой РНК-направляемой нуклеазой и направлять первую РНК-направляемую нуклеазу (например, белок Cas) к целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления часть целевой гРНК (например, часть целевой гРНК, которая составляет по меньшей мере 17 нуклеотидов (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов)) комплементарна целевой нуклеиновой кислоте.

[0054] Композиция может также дополнительно содержать донорную гРНК, которая комплементарна целевой последовательности ЛСД. Донорная гРНК может образовывать второй РНП со второй РНК-направляемой нуклеазой. Целевая последовательность ЛСД в донорной матрице может гибридизоваться с донорной гРНК или ее частью. Следовательно, комплекс, содержащий вторую РНК-направляемую нуклеазу, донорную гРНК и донорную матрицу, может способствовать удалению матрицы МНГР и, не ограничиваясь какой-либо теорией, способствовать гомологичной рекомбинации, происходящей в сайте интеграции в целевой нуклеиновой кислоте, расщепляемой целевой гРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательности целевой гРНК и донорной гРНК являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления последовательности целевой гРНК и донорной гРНК являются разными. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая РНК-направляемые нуклеазы являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая РНК-направляемые нуклеазы являются разными.

[0055] Композиция может содержать нацеливаемую нуклеазу и целевую гРНК и/или донорную гРНК в молярном соотношении от 1:10 до 2:1 (например, от 1:5 до 2:1, от 2:5 до 2:1, от 3:5 до 2:1, от 4:5 до 2:1, от 1:1 до 2:1, от 1:10 до 1:1, от 1:10 до 4:5, от 1:10 до 3:5, от 1:10 до 2:5 или от 1:10 до 1:5), соответственно. Композиция может содержать нацеливаемую нуклеазу и донорную матрицу-плазмиду в молярном соотношении от 10:1 до 1000:1 (например, от 50:1 до 1000:1, от 100:1 до 1000:1, от 200:1 до 1000:1, от 300:1 до 1000:1, от 400:1 до 1000:1, от 500:1 до 1000:1, от 600:1 до 1000:1, от 700:1 до 1000:1, от 800:1 до 1000:1, от 900:1 до 1000:1, от 10:1 до 900:1, от 10:1 до 800:1, от 10:1 до 700:1, от 10:1 до 600:1, от 10:1 до 500:1, от 10:1 до 400:1, от 10:1 до 300:1, от 10:1 до 200:1, от 10:1 до 100:1 или от 10:1 до 50:1), соответственно.

[0056] РНК-направляемая нуклеаза также может быть слита с локализирующим пептидом или белком. Например, РНК-направляемая нуклеаза может быть слита с одной или большим числом последовательностей сигнала ядерной локализации (СЯЛ), которые могут направлять нуклеазу и образуемые ею РНП-комплексы в ядро для модификации целевой нуклеиновой кислоты. Примеры последовательностей СЯЛ известны в данной области техники, например, как описано в работе Lange et al., *J Biol Chem.* 282 (8): 5101-5, 2007, а также включают в себя, но не ограничиваются ими, AVKRPAAATKKAGQAKKKKLD, MSRRRKANPTKLSENAKKLAKEVEN, PAAKRVKLD, KLIKRPVK и PKKKRKV. Примеры других пептидов или белков, которые могут применяться в контексте РНК-направляемой нуклеазы, такие как проникающие в клетку пептиды и нацеленные на клетку пептиды, доступны в данной области техники и описаны, например, в работе Vivès et al., *Biochim Biophys Acta.* 1786 (2): 126-38, 2008.

IV. Единые гидовые РНК

[0057] Белок Cas может направляться к соответствующей ему родственной ДНК для расщепления (например, целевой последовательности ЛСД и/или целевой геномной последовательности) с помощью единой гидовой РНК (егРНК). егРНК представляет собой версию встречающейся в природе двухкомпонентной гидовой РНК (cr-РНК и tracr-РНК), сконструированной в единую непрерывную последовательность. егРНК может содержать гидовую последовательность (например, эквивалентную cr-РНК часть егРНК), которая нацеливает белок Cas на родственную последовательность нуклеиновой кислоты, и каркасную последовательность, которая взаимодействует с белком Cas (например, эквивалентная tracr-РНК часть егРНК). егРНК можно выбрать с помощью программного обеспечения. В качестве неограничивающего примера, соображения при выборе егРНК могут включать в себя, например, последовательность ППМ для используемого белка Cas9 и стратегии минимизации нецелевых модификаций. Такие инструменты, как NUPACK® и CRISPR Design Tool, могут предоставлять последовательности для подготовки егРНК, для оценки эффективности целевой модификации и/или оценки расщепления в нецелевых сайтах.

Гидовая последовательность

[0058] Гидовая последовательность в егРНК может быть комплементарной конкретной последовательности в пределах родственной последовательности нуклеиновой кислоты (например, целевой последовательности ЛСД и/или целевой геномной последовательности). За 3'-концом родственной последовательности нуклеиновой кислоты может следовать последовательность ППМ. Гидовая последовательность, как правило, комплементарна примерно 20 нуклеотидам, расположенным в направлении последовательности ППМ. В общем случае, белок Cas9 или его вариант расщепляет сайт, расположенный примерно на три нуклеотида выше, в направлении последовательности ППМ. Гидовая последовательность в егРНК может быть комплементарной любой цепи родственной последовательности нуклеиновой кислоты.

[0059] В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность егРНК может содержать от около 10 до около 2000 нуклеиновых кислот, например, от около 10 до около 100 нуклеиновых кислот, от около 10 до около 500 нуклеиновых кислот, от около 10 до около 1000 нуклеиновых кислот, от около 10 до около 1500 нуклеиновых кислот, от около 10 до около 2000 нуклеиновых кислот, от около 50 до около 100 нуклеиновых кислот, от около 50 до около 500 нуклеиновых кислот, от около 50 до около 1000 нуклеиновых кислот, от около 50 до около 1500 нуклеиновых кислот, от около 50 до около 2000 нуклеиновых кислот, от около 100 до около 500 нуклеиновых кислот, от около 100 до около 1000 нуклеиновых кислот, от около 100 до около 1500 нуклеиновых кислот, от около 100 до около 2000 нуклеиновых кислот, от около 500 до около 1000 нуклеиновых кислот, от около 500 до около 1500 нуклеиновых кислот, от около 500 до около 2000 нуклеиновых кислот, от около 1000 до около 1500 нуклеиновых кислот, от около 1000 до около 2000 нуклеиновых кислот или от около 1500 до около 2000 нуклеиновых кислот на 5'-конце егРНК, которые могут направлять белок Cas к родственной последовательности нуклеиновой кислоты посредством образования комплементарных пар РНК-ДНК. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность егРНК содержит около 100 нуклеиновых кислот на 5'-конце егРНК, которые могут направлять белок Cas к сайту родственной последовательности нуклеиновой кислоты посредством образования комплементарных пар РНК-ДНК. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность содержит 20 нуклеиновых кислот на 5'-конце егРНК, которые могут направлять белок Cas к сайту родственной последовательности нуклеиновой кислоты (например, целевой последовательности ЛСД и/или целевой геномной последовательности) посредством образования комплементарных пар РНК-ДНК. В других вариантах осуществления гидовая последовательность содержит меньше чем 20, например, 19, 18, 17 или меньшее число, нуклеиновых кислот, которые комплементарны родственной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях гидовая последовательность в егРНК содержит по меньшей мере одно нуклеотидное несовпадение в области комплементарности родственной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях гидовая последовательность в егРНК содержит от около 1 до около 10 нуклеотидных несовпадений в области комплементарности родственной последовательности нуклеиновой кислоты.

Каркасная последовательность

[0060] Каркасная последовательность в егРНК может служить в качестве белок-связывающей последовательности, которая взаимодействует с белком Cas или его вариантом. В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность в егРНК может содержать два комплементарных участка нуклеотидов, которые гибридизуются друг с другом с образованием дуплекса двухцепочечной РНК (дцРНК-дуплекса). Каркасная последовательность может иметь такие структуры, как нижний стержень, выступ, верхний стержень, ядро и/или шпилька. В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность в егРНК может содержать от около 90 до около 120

нуклеиновых кислот, например, от около 90 нуклеиновых кислот до около 115 нуклеиновых кислот, от около 90 нуклеиновых кислот до около 110 нуклеиновых кислот, от около 90 нуклеиновых кислот до около 105 нуклеиновых кислот, от около 90 нуклеиновых кислот до около 100 нуклеиновых кислот, от около 90 нуклеиновых кислот до около 95 нуклеиновых кислот, от около 95 нуклеиновых кислот до около 120 нуклеиновых кислот, от около 100 нуклеиновых кислот до около 120 нуклеиновых кислот, от около 105 нуклеиновых кислот до около 120 нуклеиновых кислот, от около 110 нуклеиновых кислот до около 120 нуклеиновых кислот или от около 115 нуклеиновых кислот до около 120 нуклеиновых кислот.

V. Гидовая РНК (гРНК)

[0061] Гидовые РНК (гРНК), включительно с целевыми гРНК и донорными гРНК, описанными в данном документе, в целом относятся к ДНК-нацеливающей РНК, содержащей: (1) гидовую последовательность, которая комплементарна родственной последовательности нуклеиновой кислоты (например, целевой геномной последовательности ЛСД и/или целевой геномной последовательности) и направляет РНК-направляемую нуклеазу к родственной последовательности нуклеиновой кислоты, и (2) каркасную последовательность, которая взаимодействует и связывается с РНК-направляемой нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения целевая гРНК и донорная гРНК имеют одинаковую последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения целевая гРНК и донорная гРНК включают в себя одинаковую последовательность, например, одну и ту же последовательность нуклеиновой кислоты, способную гибридизоваться как с целевой последовательностью, подлежащей модификации, так и с целевой последовательностью ЛСД. В других вариантах осуществления данного изобретения целевая гРНК и донорная гРНК имеют разные последовательности. В композициях и способах, описанных в данном документе, гРНК содержит часть, которая комплементарна родственной последовательности нуклеиновой кислоты. Как только гРНК образует РНП-комплекс с нацеливаемой нуклеазой (например, первой РНК-направляемой нуклеазой), РНП-комплекс может быть направлен к родственной последовательности нуклеиновой кислоты за счет комплементарности между гРНК и родственной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза представляет собой белок Cas9. Белок Cas9 «идентифицирует» родственную последовательность нуклеиновой кислоты, сначала идентифицируя примыкающий к протоспейсеру мотив (ППМ), состоящий из 3 пар оснований, расположенный в направлении к 3' от родственной последовательности нуклеиновой кислоты. Как только ППМ идентифицирован, гРНК в РНП-комплексе гибридизуется с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты в направлении ППМ. В некоторых вариантах осуществления гРНК включает в себя часть нуклеотидов, которые комплементарны части в родственной последовательности нуклеиновой кислоты, которая находится примерно на 20 нуклеотидов выше, в направлении последовательности ППМ. В общем случае, белок

Cas9 или его вариант расщепляет сайт, расположенный примерно на три нуклеотида выше, в направлении последовательности ППМ. гРНК можно выбрать с помощью программного обеспечения. В качестве неограничивающего примера, соображения при выборе гРНК могут включать в себя, например, последовательность ППМ для используемой РНК-направляемой нуклеазы и стратегии минимизации нецелевых модификаций. Такие инструменты, как NUPACK® и CRISPR Design Tool, могут предоставлять последовательности для подготовки гРНК, для оценки эффективности целевой модификации и/или оценки расщепления в нецелевых сайтах.

[0062] В некоторых вариантах осуществления гРНК содержит часть, состоящую из по меньшей мере 17 нуклеотидов (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов), которые комплементарны родственной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления гРНК может быть полностью комплементарна или частично комплементарна родственной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 60% нуклеотидов (например, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 97%) нуклеотидов в родственной последовательности нуклеиновой кислоты могут вступать в образование пар оснований по Уотсону - Крику с соответствующими им нуклеотидами в гРНК.

[0063] Как подробно описано далее в данном документе, целевая последовательность ЛСД и ППМ на одном или обоих концах матрицы МНГР могут быть сконструированы с различными конфигурациями.

[0064] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения целевая гРНК и донорная гРНК имеют одинаковую последовательность (например, целевая геномная последовательность и целевая последовательность ЛСД являются одинаковыми), и каждая образует комплекс с одним и тем же видом нацеливаемой нуклеазы (например, обе имеют одинаковую последовательность и образуют РНП-комплекс с одним и тем же видом белка Cas). В таком случае гРНК может образовывать первый РНП-комплекс с РНК-направляемой нуклеазой. Первый РНП-комплекс может связываться с целевой нуклеиновой кислотой посредством гибридизации между гРНК и целевой нуклеиновой кислотой. гРНК также может образовывать второй РНП-комплекс с РНК-направляемой нуклеазой и донорной матрицей. В таком втором РНП-комплексе гРНК может связываться с целевой ДНК-связывающей белковой последовательностью в донорной матрице, чтобы доставить донорную матрицу в желаемое внутриклеточное местоположение (например, в ядро) для осуществления гомологичной рекомбинации в расщепленной целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления гРНК и целевая последовательность ДНК-связывающего белка имеют только частичную комплементарность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения целевая гРНК и донорная гРНК имеют разные последовательности (например, различаются целевая геномная последовательность и целевая последовательность ЛСД). Каждая различающаяся целевая гРНК и донорная гРНК может образовывать комплекс с одними и теми же видами нацеливаемой нуклеазы (например, каждая из них образует РНП-

комплекс с одним и тем же видом белка Cas). Каждая различающаяся целевая гРНК и донорная гРНК может образовывать комплекс с разными видами нацеливаемой нуклеазы (например, каждая из них образует РНП-комплекс с одним и тем же видом белка Cas).

VI. Донорная матрица

[0065] Матрица МНГР, целевые последовательности ЛСД и соответствующие последовательности ППМ могут иметь ряд различных конфигураций в донорной матрице-плазмиде для усиления направляемой гомологией репарации между матрицей МНГР и целевой нуклеиновой кислотой. В общем случае, донорная матрица включает в себя: (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР); (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 5' от матрицы МНГР; и (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении к 3' от матрицы МНГР, и при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД способна расщепляться белком нацеливаемой нуклеазы или комплексом, содержащим белок нацеливаемой нуклеазы. В вариантах осуществления, когда нацеливаемая нуклеаза представляет собой белок Cas (например, Cas9), каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с ППМ, состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД. Целевая последовательность ЛСД и соответствующий ППМ могут быть ориентированы так, что ППМ располагается между целевой последовательностью ЛСД и матрицей МНГР. Целевая последовательность ЛСД и соответствующий ППМ могут быть ориентированы так, что целевая последовательность ЛСД располагается между ППМ и матрицей МНГР. Каждая целевая последовательность ЛСД и соответствующий ППМ в донорной матрице-плазмиде могут быть независимо ориентированы. ППМ, соответствующий первой целевой последовательности ЛСД, может быть расположен между целевой последовательностью ЛСД и матрицей МНГР. Первая целевая последовательность ЛСД может быть расположена между ППМ и матрицей МНГР. ППМ, соответствующий второй целевой последовательности ЛСД, может быть расположен между целевой последовательностью ЛСД и матрицей МНГР. Вторая целевая последовательность ЛСД может быть расположена между ППМ и матрицей МНГР. В неограничивающем примере ППМ, соответствующий первой целевой последовательности ЛСД, расположен между первой целевой последовательностью ЛСД и матрицей МНГР, а ППМ, соответствующий второй целевой последовательности ЛСД, расположен между второй целевой последовательностью ЛСД и матрицей МНГР.

[0066] В некоторых вариантах осуществления размер или длина донорной матрицы-плазмиды составляет больше чем около 200 п. о., 250 п. о., 300 п. о., 350 п. о., 400 п. о., 450 п. о., 500 п. о., 550 п. о., 600 п. о., 650 п. о., 700 п. о., 750 п. о., 800 п. о., 850 п. о., 900 п. о., 1 т. п. о., 1,1 т. п. о., 1,2 т. п. о., 1,3 т. п. о., 1,4 т. п. о., 1,5 т. п. о., 1,6 т. п. о., 1,7 т. п. о., 1,8 т. п. о., 1,9 т. п. о., 2,0 т. п. о., 2,1 т. п. о., 2,2 т. п. о., 2,3 т. п. о., 2,4 т. п. о., 2,5 т.

п. о., 2,6 т. п. о., 2,7 т. п. о., 2,8 т. п. о., 2,9 т. п. о., 3 т. п. о., 3,1 т. п. о., 3,2 т. п. о., 3,3 т. п. о., 3,4 т. п. о., 3,5 т. п. о., 3,6 т. п. о., 3,7 т. п. о., 3,8 т. п. о., 3,9 т. п. о., 4,0 т. п. о., 4,1 т. п. о., 4,2 т. п. о., 4,3 т. п. о., 4,4 т. п. о., 4,5 т. п. о., 4,6 т. п. о., 4,7 т. п. о., 4,8 т. п. о., 4,9 т. п. о., 5,0 т. п. о., 5,1 т. п. о., 5,2 т. п. о., 5,3 т. п. о., 5,4 т. п. о., 5,5 т. п. о., 5,6 т. п. о., 5,7 т. п. о., 5,8 т. п. о., 5,9 т. п. о., 6,0 т. п. о., 6,1 т. п. о., 6,2 т. п. о., 6,3 т. п. о., 6,4 т. п. о., 6,5 т. п. о., 6,6 т. п. о., 6,7 т. п. о., 6,8 т. п. о., 6,9 т. п. о., 7,0 т. п. о., 7,1 т. п. о., 7,2 т. п. о., 7,3 т. п. о., 7,4 т. п. о., 7,5 т. п. о., 7,6 т. п. о., 7,7 т. п. о., 7,8 т. п. о., 7,9 т. п. о., 8,0 т. п. о., 8,1 т. п. о., 8,2 т. п. о., 8,3 т. п. о., 8,4 т. п. о., 8,5 т. п. о., 8,6 т. п. о., 8,7 т. п. о., 8,8 т. п. о., 8,9 т. п. о., 9,0 т. п. о., 9,1 т. п. о., 9,2 т. п. о., 9,3 т. п. о., 9,4 т. п. о., 9,5 т. п. о., 9,6 т. п. о., 9,7 т. п. о., 9,8 т. п. о., 9,9 т. п. о., 10,0 т. п. о., или любой размер матрицы в пределах данных размеров, или больше чем 10 т. п. о. Например, размер матрицы может составлять от около 200 п. о. до около 500 п. о., от около 200 п. о. до около 750 п. о., от около 200 п. о. до около 1 т. п. о., от около 200 п. о. до около 1,5 т. п. о., от около 200 п. о. до около 2,0 т. п. о., от около 200 п. о. до около 2,5 т. п. о., от около 200 п. о. до около 3,0 т. п. о., от около 200 п. о. до около 3,5 т. п. о., от около 200 п. о. до около 4,0 т. п. о., от около 200 п. о. до около 4,5 т. п. о., от около 200 п. о. до около 5,0 т. п. о. В некоторых случаях размер матрицы достаточно велик и она присутствует в достаточном количестве, чтобы быть летальной в виде голой ДНК.

[0067] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица кодирует гетерологичный белок или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица включает в себя регуляторные последовательности, например, промоторную последовательность и/или энхансерную последовательность для регуляции экспрессии гетерологичного белка или его фрагмента, например, после встраивания в геном клетки. Гетерологичный белок может включать в себя химерный антигенный рецептор (ХАР, англ. «CAR»). Гетерологичный белок может включать в себя Т-клеточный рецептор (ТКР, англ. «TCR»).

[0068] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица-плазида включает в себя экзогенную последовательность, такую как экзогенная нуклеотидная последовательность. Экзогенная последовательность может включать в себя кодируемый гетерологичный белок или его фрагмент. Экзогенная последовательность может включать в себя ген или его часть. Экзогенная нуклеотидная последовательность может представлять собой короткую последовательность, например, длиной в 3-100 нуклеотидов. Экзогенная нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, может представлять собой один нуклеотид. В дополнение к этому, экзогенная нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, может представлять собой длинную последовательность, например, длиной в 500-3000 нуклеотидов. Экзогенная нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, может представлять собой последовательность, кодирующую или не кодирующую полипептидную последовательность. В дополнение к этому, экзогенная нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, может быть вставлена в клетку так, что при вставке она

образует химерный ген. Например, участок экзогенного рецептора может быть вставлен в рамку в последовательности кодирования эндогенного рецептора для получения последовательности кодирования химерного рецептора, которая после редактирования включает в себя участок экзогенного рецептора, функционально связанный с эндогенным внутриклеточным участком (например, для передачи сигнала).

[0069] В некоторых примерах ген или его часть могут представлять собой кодирующую белок нуклеотидную последовательность (т. е. нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность). В общем случае, может использоваться любой кодирующий белок нуклеотид. В некоторых примерах кодирующая белок нуклеотидная последовательность кодирует белок, полезный для аутологичной клеточной терапии (например, аутологичной Т-клеточной терапии). В некоторых примерах кодирующая белок нуклеотидная последовательность может включать в себя, но не ограничивается ими, фактор модуляции иммунной системы, цитокин, фактор модуляции Т-клеточной функции, фактор, способствующий выживанию Т-клеток, фактор, способствующий Т-клеточной функции, или ингибитор иммунной контрольной точки. Кодирующая белок нуклеотидная последовательность, в частности, кодирующая секретиремый белок или мембраносвязанные белки, может включать в себя нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Сигнальный пептид может быть эндогенным по отношению к белку, кодируемому кодирующей белок нуклеотидной последовательностью. Сигнальный пептид может быть экзогенным по отношению к белку, кодируемому кодирующей белок нуклеотидной последовательностью.

[0070] В некоторых примерах ген или его часть могут представлять собой не кодирующую белок нуклеотидную последовательность. В общем случае, может использоваться любой не кодирующий белок нуклеотид. В некоторых случаях не кодирующая белок нуклеотидная последовательность может представлять собой нуклеотидную последовательность, полезную для аутологичной клеточной терапии (например, аутологичной Т-клеточной терапии). В некоторых случаях не кодирующая белок нуклеотидная последовательность может включать в себя, но не ограничивается ими, кшРНК, миРНК, микроРНК и длинную некодирующую РНК (днРНК, англ. «lncRNA»).

[0071] Хотя нуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере часть гена (например, представляющий интерес экзогенный ген), может, в общем случае, иметь любой размер, могут быть приняты во внимание практические соображения, такие как влияние размера гена на общий размер матрицы и на последующую общую эффективность редактирования. Следовательно, в конкретном аспекте в данном изобретении представлены клетки, которые геномно отредактированы или способны к геномному редактированию для экспрессии экзогенного гена длиной больше чем или ровно 100 оснований, с показателями эффективности НГ, превышающими ранее описанные (например, больший процент популяции, имеющей интегрированную

полинуклеотидную последовательность), особенно при использовании безвирусных способов доставки. Улучшенные показатели эффективности ГР подобным образом применимы к генам длиной больше чем 100 оснований, например, к введению экзогенных последовательностей длиной больше чем или ровно 200 оснований, длиной больше чем или ровно 400 оснований, длиной больше чем или ровно 500 оснований, длиной больше чем или ровно 600 оснований, длиной больше чем или ровно 750 оснований, длиной больше чем или ровно 1000 оснований длиной больше чем или ровно 1500 оснований, длиной больше чем или ровно 2000 оснований, длиной больше чем или ровно 3000 оснований, или длиной больше чем или ровно 4000 оснований. Указанный по меньшей мере фрагмент гена может иметь длину больше чем или ровно 800 оснований. Указанный по меньшей мере фрагмент гена может иметь длину больше чем или ровно 1600 оснований.

[0072] Экзогенные последовательности могут иметь длину от 100 до 200 оснований, от 100 до 300 оснований, от 100 до 400 оснований, от 100 до 500 оснований, от 100 до 600 оснований, от 100 до 700 оснований, от 100 до 800 оснований, от 100 до 900 оснований или от 100 до 1000 оснований. Экзогенные последовательности могут иметь длину от 100 до 2000 оснований, от 100 до 3000 оснований, от 100 до 4000 оснований, от 100 до 5000 оснований, от 100 до 6000 оснований, от 100 до 7000 оснований, от 100 до 8000 оснований, от 100 до 9000 оснований или от 100 до 10000 оснований. Экзогенные последовательности могут иметь длину от 1000 до 2000 оснований, от 1000 до 3000 оснований, от 1000 до 4000 оснований, от 1000 до 5000 оснований, от 1000 до 6000 оснований, от 1000 до 7000 оснований, от 1000 до 8000 оснований, от 1000 до 9000 оснований или от 1000 до 10000 оснований.

[0073] Экзогенные последовательности могут иметь длину больше чем или ровно 10 оснований, больше чем или ровно 20 оснований, больше чем или ровно 30 оснований, больше чем или ровно 40 оснований, больше чем или ровно 50 оснований, больше чем или ровно 60 оснований, больше чем или ровно 70 оснований, больше чем или ровно 80 оснований больше чем или ровно 90 оснований или больше чем или ровно 95 оснований. Экзогенные последовательности могут иметь длину от 1 до 100 оснований, от 1 до 90 оснований, от 1 до 80 оснований, от 1 до 70 оснований, от 1 до 60 оснований, от 1 до 50 оснований, от 1 до 40 оснований или от 1 до 30 оснований. Экзогенные последовательности могут иметь длину от 1 до 20 оснований, от 2 до 20 оснований, от 3 до 20 оснований, от 5 до 20 оснований, от 10 до 20 оснований или от 15 до 20 оснований. Экзогенные последовательности могут иметь длину от 1 до 10 оснований, от 2 до 10 оснований, от 3 до 10 оснований, от 5 до 10 оснований, от 1 до 5 оснований или от 1 до 15 оснований. Экзогенные последовательности могут иметь длину 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 115, 120, 125, 150, 175, 200, 225 или 250 оснований. Экзогенные

последовательности могут иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 оснований. Экзогенные последовательности могут иметь длину больше чем около 200 п. о., 250 п. о., 300 п. о., 350 п. о., 400 п. о., 450 п. о., 500 п. о., 550 п. о., 600 п. о., 650 п. о., 700 п. о., 750 п. о., 800 п. о., 850 п. о., 900 п. о., 1 т. п. о., 1,1 т. п. о., 1,2 т. п. о., 1,3 т. п. о., 1,4 т. п. о., 1,5 т. п. о., 1,6 т. п. о., 1,7 т. п. о., 1,8 т. п. о., 1,9 т. п. о., 2,0 т. п. о., 2,1 т. п. о., 2,2 т. п. о., 2,3 т. п. о., 2,4 т. п. о., 2,5 т. п. о., 2,6 т. п. о., 2,7 т. п. о., 2,8 т. п. о., 2,9 т. п. о., 3 т. п. о., 3,1 т. п. о., 3,2 т. п. о., 3,3 т. п. о., 3,4 т. п. о., 3,5 т. п. о., 3,6 т. п. о., 3,7 т. п. о., 3,8 т. п. о., 3,9 т. п. о., 4,0 т. п. о., 4,1 т. п. о., 4,2 т. п. о., 4,3 т. п. о., 4,4 т. п. о., 4,5 т. п. о., 4,6 т. п. о., 4,7 т. п. о., 4,8 т. п. о., 4,9 т. п. о., 5,0 т. п. о., 5,1 т. п. о., 5,2 т. п. о., 5,3 т. п. о., 5,4 т. п. о., 5,5 т. п. о., 5,6 т. п. о., 5,7 т. п. о., 5,8 т. п. о., 5,9 т. п. о., 6,0 т. п. о., 6,1 т. п. о., 6,2 т. п. о., 6,3 т. п. о., 6,4 т. п. о., 6,5 т. п. о., 6,6 т. п. о., 6,7 т. п. о., 6,8 т. п. о., 6,9 т. п. о., 7,0 т. п. о. или любую длину матрицы в пределах данных размеров.

[0074] В примерах, где вводятся множество экзогенных последовательностей, множество экзогенных последовательностей могут иметь разные размеры, например, первая экзогенная последовательность может иметь длину больше чем или ровно 100 оснований, и вторая экзогенная последовательность может иметь длину больше чем или ровно 100 оснований, или первая экзогенная последовательность может иметь длину больше чем или ровно 100 оснований, а вторая экзогенная последовательность может иметь длину меньше чем или ровно 100 оснований (например, длину от 1 до 100 оснований).

[0075] В общем случае, донорная матрица-плазмида представляет собой ДНК-плазмиду. В некоторых случаях донорная матрица-плазмида представляет собой двухцепочечную плазмиду. В некоторых случаях донорная матрица-плазмида представляет собой одноцепочечную плазмиду. В некоторых случаях донорная матрица-плазмида является миникольцевой. В некоторых случаях донорная матрица-плазмида представляет собой наноплазмиду.

[0076] Целевые последовательности ЛСД и/или компоненты матрицы МНГР (гомологичные плечи, представляющий интерес ген и т. д.) можно вводить в матрицы дцДНК любого формата, включительно с последовательностями линейных дцДНК, полученными с помощью ПЦР, расщепления рестрикционными ферментами или любым другим способом линеаризации, а также включительно с последовательностями кольцевых дцРНК, такими как плазмиды. В случае плазмиды целевые последовательности ЛСД можно клонировать в плазмиду за пределами гомологичных плеч и областей вставки ДНК, включительно, но не ограничиваясь ими, с областями, примыкающими к краю (краям) гомологичного (-ых) плеча (плеч). Подобно матрицам линейных дцРНК, ДНК-связывающий белковый комплекс (например, РНП, образованный из Cas9 и гРНК) можно кратковременно инкубировать с плазмидной ДНК-матрицей, чтобы обеспечить связывание ДНК-плазмиды с РНП до введения в клетку (например, посредством электропорации). См., например, фиг. 1, 2 и 10В международной патентной публикации

№ WO2018232356, и параграф [0100] международной патентной публикации № WO2019084552.

[0077] Донорная матрица-плазмида может дополнительно содержать одну или большее число дополнительных спейсерных последовательностей между целевой последовательностью ЛСД и матрицей МНГР. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность может содержать по меньшей мере 2 нуклеотида, например, от 2 до 24 нуклеотидов (например, от 2 до 22, от 2 до 20, от 2 до 18, от 2 до 16, от 2 до 14, от 2 до 12, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 4, от 4 до 24, от 6 до 24, от 8 до 24, от 10 до 24, от 12 до 24, от 14 до 24, от 16 до 24, от 18 до 24, от 20 до 24 или от 22 до 24 нуклеотидов; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов).

VII. Нацеливаемая нуклеаза

[0078] Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления композиций и способов, описанных в данном документе, нацеливаемая нуклеаза представляет собой РНК-направляемую нуклеазу (например, белок Cas). Нацеливаемая нуклеаза может распознавать последовательность родственной последовательности нуклеиновой кислоты (например, целевой ген в геноме и/или целевую последовательность ЛСД), связываться с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты и модифицировать родственную последовательность нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза может представлять собой слитый белок, который включает в себя белок, способный связываться с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты, и белок, который может модифицировать родственную последовательность нуклеиновой кислоты (например, нуклеазу, активатор или репрессор транскрипции).

[0079] В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза обладает нуклеазной активностью. Например, нацеливаемая нуклеаза может модифицировать родственную последовательность нуклеиновой кислоты путем расщепления родственной последовательности нуклеиновой кислоты. Расщепленная родственная последовательность нуклеиновой кислоты затем может подвергаться гомологичной рекомбинации (например, посредством НГСК) с близлежащей матрицей направляемой гомологией репарации (МНГР) (например, матрицей МНГР, предоставленной донорной матрицей-плазмидой). Например, нуклеаза Cas может направлять расщепление одной или обеих цепей в местоположение в родственной последовательности нуклеиновой кислоты. Неограничивающие примеры нуклеаз Cas включают в себя Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известна как Csn1 and Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, Cpf1, их гомологи, их варианты, их мутантные формы и их производные. Существует три основных типа нуклеаз Cas (тип I, тип II и тип III) и 10 подтипов, включительно с 5 белками типа I, 3 белками типа II и 2 белками типа III (см, например, работу Hochstrasser and Doudna, Trends Biochem Sci, 2015, 40 (1): 58-66). Нуклеазы Cas

типа II включают в себя Cas1, Cas2, Csn2, Cas9 и Cfp1. Данные нуклеазы Cas известны специалистам в данной области техники. Например, аминокислотная последовательность полипептида Cas9 дикого типа из *Streptococcus pyogenes* указана, например, в NCBI Ref. Seq. No. NP_269215, а аминокислотная последовательность полипептида Cas9 дикого типа из *Streptococcus thermophilus* указана, например, в NCBI Ref. Seq. No. WP_011681470.

[0080] Нуклеазы Cas, например, нуклеазы Cas9, можно получать из ряда видов бактерий, включающего в себя следующие, но не ограничиваясь ими: *Veillonella atypical*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Solobacterium moorei*, *Coprococcus catus*, *Treponema denticola*, *Peptoniphilus duerdenii*, *Catenibacterium mitsuokai*, *Streptococcus mutans*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Acidaminococcus intestine*, *Olsenella uli*, *Oenococcus kitaharae*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Fingoldia magna*, *Mycoplasma mobile*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma synoviae*, *Eubacterium rectale*, *Streptococcus thermophilus*, *Eubacterium dolichum*, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Torquens*, *Ilyobacter polytropus*, *Ruminococcus albus*, *Akkermansia muciniphila*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium dentium*, *Corynebacterium diphtheria*, *Elusimicrobium minutum*, *Nitratifactor salsuginis*, *Sphaerochaeta globus*, *Fibrobacter succinogenes* subsp. *Succinogenes*, *Bacteroides fragilis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Prevotella micans*, *Prevotella ruminicola*, *Flavobacterium columnare*, *Aminomonas paucivorans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Candidatus Puniceispirillum marinum*, *Verminephrobacter eiseniae*, *Ralstonia syzygii*, *Dinoroseobacter shibae*, *Azospirillum*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Bradyrhizobium*, *Wolinella succinogenes*, *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*, *Helicobacter mustelae*, *Bacillus cereus*, *Acidovorax ebreus*, *Clostridium perfringens*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Roseburia intestinalis*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida* subsp. *Multocida*, *Sutterella wadsworthensis*, *proteobacterium*, *Legionella pneumophila*, *Parasutterella excrementihominis*, *Wolinella succinogenes* и *Francisella novicida*.

[0081] Белок Cas9 относится к РНК-направляемому нуклеазному белку или никазному белку, связывающему двухцепочечную ДНК. Нуклеаза Cas9 дикого типа имеет два функциональных домена, например, RuvC и HNH, которые разрезают разные нити ДНК. Cas9 может индуцировать двухцепочечные разрывы в геномной ДНК (целевой ДНК), когда активны оба функциональных домена. Фермент Cas9 может включать в себя один или большее число доменов белка Cas9, полученных из бактерий, принадлежащих к группе, включающей в себя *Corynebacter*, *Sutterella*, *Legionella*, *Treponema*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Flavivola*, *Flavobacterium*, *Sphaerochaeta*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Neisseria*, *Roseburia*, *Parvibaculum*, *Staphylococcus*, *Nitratifactor* и *Campylobacter*. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 может представлять собой слитый белок, например, два каталитических домена получены из разных видов бактерий.

[0082] В некоторых вариантах осуществления белок Cas может представлять собой вариант белка Cas. Например, полезные варианты нуклеазы Cas9 могут включать в себя

единственный неактивный каталитический домен, например, фермент или никазу RuvC¹ или HNH. Никаза Cas9 имеет только один активный функциональный домен и может разрезать только одну цепь родственной последовательности нуклеиновой кислоты, тем самым создавая разрыв одноцепочечный разрыв или надрез. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 может представлять собой мутантную нуклеазу Cas9, имеющую одну или большее число аминокислотных мутаций. Например, мутант Cas9, имеющий по меньшей мере мутацию D10A, представляет собой никазу Cas9. В других вариантах осуществления мутантная нуклеаза Cas9, имеющая по меньшей мере мутацию N840A, представляет собой никазу Cas9. Другие примеры мутаций, присутствующих в никазе Cas9, включают в себя, но не ограничиваются ими, N854A и N863A. Двухцепочечный разрыв можно осуществлять с помощью никазы Cas9, если используются по меньшей мере две ДНК-нацеливающие РНК, которые нацелены на противоположные цепи ДНК. Репарация двухцепочечного разрыва, вызванного надрезом двух цепей, может происходить посредством НГСК или МНГР (Ran et al., 2013, Cell, 154: 1380-1389). Неограничивающие примеры нуклеаз или никаз Cas9 описаны, например, в патентах США № 8895308; № 8889418; и № 8865406, и в публикациях заявок на патент США № 2014/0356959, № 2014/0273226 и № 2014/0186919. Нуклеаза или никаза Cas9 могут быть кодон-оптимизированы в отношении целевой клетки или целевого организма.

[0083] В некоторых вариантах осуществления вариант белка Cas не обладает расщепляющей (например, полной расщепляющей или никазной) активностью. Вариант белка Cas может содержать одну или большее число точечных мутаций, которые устраняют никазную активность данного белка. В некоторых вариантах осуществления варианты белка Cas могут быть слиты с другими белками и служить в качестве нацеливающих доменов для направления других белков к целевой нуклеиновой кислоте. Например, варианты белка Cas без активности расщепления могут быть слиты с доменами активации или репрессии транскрипции для контроля экспрессии генов (Ma et al., Protein and Cell, 2 (11): 879-888, 2011; Maeder et al., Nature Methods, 10: 977-979, 2013; и Konermann et al., Nature, 517: 583-588, 2014). Вариант белка Cas, который не обладает расщепляющей активностью, можно использовать для нацеливания на участки генома, что приводит к РНК-направленному контролю транскрипции. В некоторых вариантах осуществления вариант белка Cas без какой-либо расщепляющей активности можно использовать для нацеливания экзогенного белка на целевую нуклеиновую кислоту. Экзогенный белок может быть слит с вариантом белка Cas. Экзогенный белок может представлять собой эффекторный белковый домен. Экзогенный белок может представлять собой активатор или репрессор транскрипции. Другие примеры экзогенных белков включают в себя, но не ограничиваются ими, VP64-p65-Rta (VPR), VP64, P65, Krab, транслокационную метилцитозиндиоксигеназу десять-одиннадцать (TET) и ДНК-метилтрансферазу (DNMT). Ниже также описаны специфические варианты белка Cas, у которых отсутствует расщепляющая (например, никазная) активность.

[0084] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой высокоточный или с повышенной специфичностью вариант полипептида Cas9 с уменьшенными нецелевыми эффектами и надежным расщеплением цели. Неограничивающие примеры вариантов полипептида Cas9 с улучшенной целевой специфичностью включают в себя варианты SpCas9 (K855A), SpCas9 (K810A/K1003A/R1060A) (также называемый eSpCas9(1.0)) и SpCas9 (K848A/K1003A/R1060A) (также называемый eSpCas9(1.1)), описанные в работе Slaymaker et al., *Science*, 351 (6268): 84-8 (2016), и варианты SpCas9, описанные в работе Kleinstiver et al., *Nature*, 529 (7587): 490-5 (2016), содержащие одну, две, три или четыре из следующих мутаций: N497A, R661A, Q695A и Q926A (например, SpCas9-HF1 содержит все четыре мутации).

[0085] В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза также может представлять собой слитый белок, который содержит белок, способный связываться с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты, и белок, способный расщеплять родственную последовательность нуклеиновой кислоты. Например, белок, который может распознавать родственную последовательность нуклеиновой кислоты и связываться с ней, может представлять собой вариант белка Cas без какой-либо расщепляющей активности. Вариант белка Cas без какой-либо расщепляющей активности может представлять собой полипептид Cas9, который содержит две сайленсинг-мутации в нуклеазных доменах RuvC1 и HNH (D10A и H840A), также называемый dCas9 (Jinek et al., *Science*, 2012, 337: 816-821; Qi et al., *Cell*, 152 (5): 1173-1183). В одном варианте осуществления полипептид dCas9 из *Streptococcus pyogenes* содержит по меньшей мере одну мутацию в положении D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986, A987, или любую их комбинацию. Описания таких полипептидов dCas9 и их вариантов приведены, например, в международной патентной публикации № WO 2013/176772. Фермент dCas9 может содержать мутацию в D10, E762, H983 или D986, а также мутацию в H840 или N863. В некоторых случаях фермент dCas9 может содержать мутацию D10A или D10N. Кроме того, фермент dCas9 может содержать H840A, H840Y или H840N. В некоторых вариантах осуществления фермент dCas9 может содержать замещения D10A и H840A; D10A и H840Y; D10A и H840N; D10N и H840A; D10N и H840Y; или D10N и H840N. Замещения могут быть консервативными или неконсервативными, чтобы сделать полипептид Cas9 каталитически неактивным, сохраняя при этом способность связываться с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0086] В других вариантах осуществления белок, который может распознавать и связываться с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты, может представлять собой ДНК-связывающий белок - эффектор, подобный активатору транскрипции (TAL), или ДНК-связывающий белок с цинковыми пальцами. ДНК-связывающий белок - эффектор TAL имеет центральный домен ДНК-связывающих tandemных повторов, обычно содержащий 33-35 аминокислот в длину, и два гипервариабельных аминокислотных остатка в положениях 12 и 13, которые могут

распознавать одну или большее число специфических пар оснований ДНК. ДНК-связывающий белок с цинковыми пальцами имеет ДНК-связывающий мотив, который часто характеризуется отсутствием или присутствием одного или большего числа ионов цинка для координации и стабилизации свернутой формы мотива. ДНК-связывающий белок с цинковыми пальцами содержит множество пальцевидных выступов, которые образуют тандемные контакты с их целевой молекулой. Некоторые ДНК-связывающие белки с цинковыми пальцами также образуют солевые мостики для стабилизации пальцевидных складок. Впервые они были идентифицированы как ДНК-связывающий мотив в факторе транскрипции TFIIIA из *Xenopus laevis* (гладкая шпорцевая лягушка), однако в настоящее время установлено, что они связывают ДНК, РНК, белковые и/или липидные субстраты.

[0087] В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза в композициях и способах, описанных в данном документе, может представлять собой слитый белок, содержащий ДНК-связывающий белок - эффектор TAL и белок, который может расщеплять родственную последовательность нуклеиновой кислоты (также называемые «нуклеазами - эффекторами, подобными активатору транскрипции», или «TALEN»). В других вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза в композициях и способах, описанных в данном документе, может представлять собой слитый белок, содержащий ДНК-связывающий белок с цинковыми пальцами, и белок, который может расщеплять родственную последовательность нуклеиновой кислоты. Например, белок, который может расщеплять родственную последовательность нуклеиновой кислоты, может представлять собой эндонуклеазу FokI дикого типа или мутантную форму эндонуклеазы FokI, или каталитический домен FokI. Подробные описания TALEN и их использования для редактирования генов можно найти, например, в патентах США № 8440431; № 8440432; № 8450471; № 8586363; и № 8697853; в работах Scharenberg et al., *Curr Gene Ther*, 2013, 13 (4): 291-303; Gaj et al., *Nat Methods*, 2012, 9 (8): 805-7; Beurdeley et al., *Nat Commun*, 2013, 4: 1762; и Joung and Sander, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 49-55. Примеры ДНК-связывающего белка с цинковыми пальцами, слитого с белком, который может расщеплять целевую нуклеиновую кислоту, описаны в данной области техники и включают в себя, но не ограничиваются ими, те, которые описаны в работах Urnov et al., *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11: 636-646; Gaj et al., *Nat Methods*, 2012, 9 (8): 805-7; в патентах США № 6534261; № 6607882; № 6746838; № 6794136; № 6824978; № 6866997; № 6933113; № 6979539; № 7013219; № 7030215; № 7220719; № 7241573; № 7241574; № 7585849; № 7595376; № 6903185; № 6479626; и в публикациях заявок на патент США № 2003/0232410 и 2009/0203140.

[0088] В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза не обладает нуклеазной активностью. Например, нацеливаемая нуклеаза (например, нацеливаемые нуклеазы без какой-либо нуклеазной активности) может регулировать экспрессию родственной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нацеливаемая нуклеаза может представлять собой слитый белок, который

включает в себя белок, способный связываться с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты, такой как вариант белка Cas без какой-либо расщепляющей активности (например, dCas9), ДНК-связывающий белок - эффектор TAL и ДНК-связывающий белок с цинковыми пальцами, как описано выше, и белок, способный модифицировать родственную последовательность нуклеиновой кислоты, такой как активатор или репрессор транскрипции.

[0089] Нацеливаемая нуклеаза также может быть слита с локализирующим пептидом или белком. Например, нацеливаемая нуклеаза может быть слита с одной или большим числом последовательностей сигнала ядерной локализации (СЯЛ), которые могут направлять нацеливаемую нуклеазу и образуемые ею РНП-комплексы в ядро для модификации родственной последовательности нуклеиновой кислоты. Примеры последовательностей СЯЛ известны в данной области техники, например, как описано в работе Lange et al., *J Biol Chem.* 282 (8): 5101-5, 2007, а также включают в себя, но не ограничиваются ими, AVKRPAATKKAGQAKKKKLD, MSRRRKANPTKLSENAKKLAKEVEN, PAAKRVKLD, KLIKRPVK и PKKKRKV. Примеры других пептидов или белков, которые могут применяться в контексте нацеливаемой нуклеазы, такие как проникающие в клетку пептиды и нацеленные на клетку пептиды, доступны в данной области техники и описаны, например, в работе Vivès et al., *Biochim Biophys Acta.* 1786 (2): 126-38, 2008.

[0090] Нацеливаемая нуклеаза, которая модифицирует целевую нуклеиновую кислоту (например, целевую геномную последовательность, такую как в геноме Т-клетки), может быть такой же, как нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять целевую последовательность ЛСД. В иллюстративном неограничивающем примере нацеливаемая нуклеаза, которая модифицирует целевую нуклеиновую кислоту, и нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять целевую последовательность ЛСД, обе представляют собой белок Cas9. Нацеливаемая нуклеаза, которая модифицирует целевую нуклеиновую кислоту, может отличаться от нацеливаемой нуклеазы, способной расщеплять целевую последовательность ЛСД. Например, нацеливаемая нуклеаза, которая модифицирует целевую нуклеиновую кислоту, может представлять собой белок Cas9, а нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять целевую последовательность ЛСД, может представлять собой белок TALEN, ZFN или белок, не относящийся к Cas9. В другом примере нацеливаемая нуклеаза, которая модифицирует целевую нуклеиновую кислоту, может представлять собой белок TALEN, ZFN или белок, не относящийся к Cas9, а нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять целевую последовательность ЛСД, может представлять собой белок Cas9.

[0091] Нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять первую целевую последовательность ЛСД, может быть такой же, как и нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять вторую целевую последовательность ЛСД. В иллюстративном неограничивающем примере нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять первую целевую последовательность ЛСД, а нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять

вторую целевую последовательность ЛСД, обе представляют собой белок Cas9. Нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять первую целевую последовательность ЛСД, может отличаться от нацеливаемой нуклеазы, способной расщеплять вторую целевую последовательность ЛСД. Например, нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять первую целевую последовательность ЛСД, может представлять собой белок Cas9, а нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять вторую целевую последовательность ЛСД, может представлять собой белок TALEN, ZFN или белок, не относящийся к Cas9. В другом примере нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять первую целевую последовательность ЛСД, может представлять собой белок TALEN, ZFN или белок, не относящийся к Cas9, а нацеливаемая нуклеаза, способная расщеплять вторую целевую последовательность ЛСД, может представлять собой белок Cas9.

VIII. Целевая последовательность ЛСД

[0092] Целевая последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД) представляет собой нуклеотидную последовательность, которая распознается и связывается нацеливаемой нуклеазой, способной расщеплять целевую последовательность ЛСД. В композициях и способах, описанных в данном документе, целевые последовательности ЛСД фланкируют матрицу МНГР, так что матрица МНГР может быть линейаризована или вырезана из донорной матрицы-плазмиды. Не ограничиваясь какой-либо теорией, линейаризованная/вырезанная матрица МНГР может способствовать опосредованному гомологией соединению концов (ОГСК), в то время как доставка в виде плазмиды может снизить цитотоксичность. Следовательно, целевая последовательность ЛСД может способствовать улучшению выхода нокин-клеток, например, за счет повышения эффективности направляемой гомологией репарации и/или снижения цитотоксичности.

[0093] В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность ЛСД может прямо распознаваться и связываться ДНК-связывающим белком, например, ДНК-связывающим белком - эффектором TAL или ДНК-связывающим белком с цинковыми пальцами. В других вариантах осуществления целевая последовательность ЛСД может непрямо распознаваться и связываться ДНК-связывающим белком, например, РНК-направляемой нуклеазой, через донорную гРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 60% нуклеотидов (например, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 97%) нуклеотидов в целевой последовательности ЛСД могут вступать в образование пар оснований по Уотсону - Крику с соответствующими им нуклеотидами донорной гРНК. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность ЛСД может иметь по меньшей мере один (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять) несовпадающий нуклеотид с соответствующим ему нуклеотидом донорной гРНК при гибридизации целевой последовательности ЛСД и донорной гРНК. Примеры несовпадающих оснований включают в себя гуанин и урацил, гуанин и тимин, а также пару аденина и цитозина. В некоторых вариантах осуществления целевая

последовательность ЛСД представляет собой часть целевой нуклеиновой кислоты (например, геномной цели клетки).

[0094] В общем случае, целевые последовательности ЛСД присутствуют на обоих концах матрицы МНГР в донорной матрице-плазмиде, как описано выше. Целевая последовательность ЛСД и, в случае системы Cas, соответствующий ППМ в донорной матрице-плазмиде могут иметь различные конфигурации, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность ЛСД является комплементарной участку последовательности донорной гРНК, имеющему такую же длину. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность ЛСД имеет по меньшей мере 17 и 20 нуклеотидов, например, от 17 нуклеотидов (например, от 17 до 19, от 17 до 18, от 18 до 20, от 18 до 19, или 17, 18, 19, или 20 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность ЛСД является частично комплементарной, т. е. содержит несовпадения нуклеотидов, по сравнению с участком последовательности донорной гРНК, имеющим такую же длину. Например, целевая последовательность ДНК-связывающего белка, имеющая 20 нуклеотидов, может иметь от 1 до 6 несовпадений нуклеотидов (например, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 несовпадений нуклеотидов; 1, 2, 3, 4, 5 или 6 несовпадений нуклеотидов) по сравнению с 20-нуклеотидной частью последовательности донорной гРНК.

IX. Генное нацеливание на нуклеиновые кислоты в клетке

[0095] Композиции, описанные в данном документе, можно применять в способах модификации целевой нуклеиновой кислоты в клетке, например, в эукариотической клетке, прокариотической клетке, животной клетке, растительной клетке, грибковой клетке и тому подобное. Необязательно, клетка представляет собой клетку млекопитающего, например, клетку человека. Клетка может находиться *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Клетка может также представлять собой первичную клетку, герминальную клетку, стволовую клетку или клетку-предшественницу. Клетка-предшественница может представлять собой, например, плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную гемопоэтическую клетку, первичную гемопоэтическую стволовую клетку или первичную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления первичная гемопоэтическая клетка представляет собой иммунокомпетентную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунокомпетентная 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 D4⁻CD8⁻ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой αβ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой γδ Т-клетку. Также представлены популяции любых клеток,

модифицированных любым из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя увеличение численности популяции модифицированных клеток.

[0096] В конкретном аспекте представлена популяция клеток (например, популяция Т-клеток). Популяция клеток может содержать любую из модифицированных клеток, описанных в данном документе. Модифицированная клетка может находиться в пределах гетерогенной популяции клеток и/или гетерогенной популяции различных типов клеток. Популяция клеток может быть гетерогенной по отношению к проценту клеток, подвергшихся геномному редактированию. Популяция клеток может содержать больше чем 10%, больше чем 20%, больше чем 30%, больше чем 40%, больше чем 50%, больше чем 60%, больше чем 70%, больше чем 80% или больше чем 90% популяции клеток, содержащих интегрированную нуклеотидную последовательность. В определенном аспекте популяция клеток содержит интегрированную нуклеотидную последовательность, при этом интегрированная нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере часть гена, интегрированная нуклеотидная последовательность интегрирована в целевом эндогенном геномном локусе и интегрированная нуклеотидная последовательность ориентирована так, что по меньшей мере часть гена способна экспрессироваться, при этом популяция клеток по существу не содержит компоненты вирус-опосредованной доставки, и при этом больше чем 10%, больше чем 20%, больше чем 30%, больше чем 40%, больше чем 50%, больше чем 60%, больше чем 70%, больше чем 80% или больше чем 90% клеток в популяции содержат интегрированную нуклеотидную последовательность.

[0097] Популяция клеток может содержать больше чем 91%, больше чем 92%, больше чем 93%, больше чем 94%, больше чем 95%, больше чем 96% или больше чем 97%, больше чем 98%, больше чем 99%, больше чем 99,5%, или больше чем 99,9% популяции клеток, содержащих интегрированную нуклеотидную последовательность. Популяция клеток может содержать больше чем 20% популяции клеток, содержащих интегрированную нуклеотидную последовательность. Популяция клеток может содержать больше чем 30% популяции клеток, содержащих интегрированную нуклеотидную последовательность. Популяция клеток может содержать больше чем 60% популяции клеток, содержащих интегрированную нуклеотидную последовательность. Популяция клеток может содержать больше чем 70% популяции клеток, содержащих интегрированную нуклеотидную последовательность.

[0098] Клетка может включать в себя клетку, содержащую безвирусно-встроенную последовательность, такую как экзогенная последовательность. Клетка может не содержать вирус (вирусы). Клетка может по существу не содержать вирус (вирусы). Клетка может включать в себя по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты (например, содержащую по меньшей мере один гетерологичный ген), безвирусно введенную в по меньшей мере одну целевую область. В определенных аспектах клетка не содержит вирусный вектор, например, для введения по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты, такой как донорная матрица.

[0099] Клетка может включать в себя одну или большее число первичных клеток, которые включают в себя безвирусно-встроенную экзогенную последовательность, имеющую размер не меньше чем 200 пар оснований. Первичные клетки могут представлять собой первичные гемопоэтические клетки или первичные гемопоэтические стволовые клетки. Первичные клетки могут представлять собой первичные гемопоэтические клетки и первичные гемопоэтические клетки могут представлять собой иммунокомпетентные клетки. Иммунокомпетентные клетки могут представлять собой Т-клетки. Первичные клетки могут представлять собой клетки человека. В некоторых аспектах первичные клетки не содержат вирусный вектор. Размер экзогенной последовательности может быть больше чем длина, выбранная из группы, состоящей из: 200 п. о., 250 п. о., 300 п. о., 350 п. о., 400 п. о., 450 п. о., 500 п. о., 550 п. о., 600 п. о., 650 п. о., 700 п. о., 750 п. о., 800 п. о., 850 п. о., 900 п. о., 1 т. п. о., 1,1 т. п. о., 1,2 т. п. о., 1,3 т. п. о., 1,4 т. п. о., 1,5 т. п. о., 1,6 т. п. о., 1,7 т. п. о., 1,8 т. п. о., 1,9 т. п. о., 2,0 т. п. о., 2,1 т. п. о., 2,2 т. п. о., 2,3 т. п. о., 2,4 т. п. о., 2,5 т. п. о., 2,6 т. п. о., 2,7 т. п. о., 2,8 т. п. о., 2,9 т. п. о., 3 т. п. о., 3,1 т. п. о., 3,2 т. п. о., 3,3 т. п. о., 3,4 т. п. о., 3,5 т. п. о., 3,6 т. п. о., 3,7 т. п. о., 3,8 т. п. о., 3,9 т. п. о., 4,0 т. п. о., 4,1 т. п. о., 4,2 т. п. о., 4,3 т. п. о., 4,4 т. п. о., 4,5 т. п. о., 4,6 т. п. о., 4,7 т. п. о., 4,8 т. п. о., 4,9 т. п. о. и 5,0 т. п. о. Размер экзогенной последовательности может составлять больше чем 1,5 т. п. о. Размер экзогенной последовательности может составлять от около 200 п. о. до около 500 п. о., от около 200 п. о. до около 750 п. о., от около 200 п. о. до около 1 т. п. о., от около 200 п. о. до около 1,5 т. п. о., от около 200 п. о. до около 2,0 т. п. о., от около 200 п. о. до около 2,5 т. п. о., от около 200 п. о. до около 3,0 т. п. о., от около 200 п. о. до около 3,5 т. п. о., от около 200 п. о. до около 4,0 т. п. о., от около 200 п. о. до около 4,5 т. п. о., от около 200 п. о. до около 5,0 т. п. о. Размер экзогенной последовательности может составлять больше чем около 1 т. п. о. Экзогенная последовательность может включать в себя регуляторную последовательность, необязательно при этом регуляторная последовательность содержит промоторную последовательность и/или энхансерную последовательность.

[0100] Экзогенная последовательность может кодировать гетерологичный белок или его фрагмент. Экзогенная последовательность может кодировать химерный антигенный рецептор (ХАР). Экзогенная последовательность может кодировать Т-клеточный рецептор (ТКР).

[0101] Клетка может включать в себя первичную Т-клетку человека, содержащую безвирусно введенную ДНК-матрицу, имеющую размер больше чем 1 т. п. о.

[0102] Клетка может включать в себя первичную Т-клетку человека, содержащую: по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере один гетерологичный ген, безвирусно введенный в по меньшей мере одну целевую область одного или обоих из: эндогенного гена константной альфа-субъединицы Т-клеточного рецептора (TRAC) и эндогенного гена константной бета-субъединицы Т-клеточного рецептора (TRBC), при этом по меньшей мере один гетерологичный ген содержит по меньшей мере один из следующих: (1) переменный участок

гетерологичного гена альфа-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- α) и (2) переменный участок гетерологичного гена бета-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- β). В некоторых аспектах Т-клетка не содержит вирусный вектор для введения по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты в Т-клетку. В некоторых аспектах по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты имеет размер 1,5 т. п. о. В некоторых аспектах по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты имеет размер 500 п. о. В некоторых аспектах целевая область представляет собой экзон 1, 2 или 3 из TRAC. В некоторых аспектах целевая область представляет собой экзон 1, 2 или 3 из TRBC. В некоторых аспектах Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку или CD4⁺ Т-клетку. В некоторых аспектах по меньшей мере один гетерологичный ген содержит по меньшей мере один из следующих: (1) а) переменный участок или б) переменный участок и константный участок гетерологичного гена альфа-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- α), и (2) а) переменный участок или б) переменный участок и константный участок гетерологичного гена бета-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- β). В некоторых аспектах по меньшей мере один гетерологичный ген содержит оба из следующих: (1) а) переменный участок или б) переменный участок и константный участок гетерологичного гена альфа-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- α), и (2) а) переменный участок или б) переменный участок и константный участок гетерологичного гена бета-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- β). В некоторых аспектах Т-клетка содержит оба из следующих: (1) а) переменный участок или б) переменный участок и константный участок гетерологичного гена цепи ТКР- α , и (2) а) переменный участок или б) переменный участок и константный участок гетерологичного гена цепи ТКР- β . В некоторых аспектах гетерологичные гены при экспрессии образуют антигенспецифический Т-клеточный рецептор (ТКР). В некоторых аспектах гетерологичный ген цепи ТКР- α и гетерологичный ген цепи ТКР- β функционально связаны линкерной последовательностью, необязательно при этом линкерная последовательность представляет собой расщепляемую линкерную последовательность или полицистронный элемент. В некоторых аспектах гетерологичный ген цепи ТКР- α и гетерологичный ген цепи ТКР- β вставляются в TRAC. В некоторых аспектах экспрессия по меньшей мере одного гетерологичного гена управляется эндогенным промотором. В некоторых аспектах экспрессия одного или обоих из TRAC и TRBC снижена в клетке по сравнению с контрольной Т-клеткой, при этом контрольная Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку человека, у которой отсутствует безвирусная вставка.

[0103] Клетка может включать в себя первичную Т-клетку человека, содержащую: по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере один гетерологичный ген, введенный в по меньшей мере одну целевую область одного или обоих из: гена константной альфа-субъединицы эндогенного Т-клеточного рецептора (TRAC) и гена константной бета-субъединицы эндогенного Т-клеточного рецептора (TRBC), при этом по меньшей мере один гетерологичный ген содержит по меньшей мере один из следующих: (1) переменный участок

гетерологичного гена альфа-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- α) и (2) варибельный участок гетерологичного гена бета-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- β), и при этом Т-клетка не содержит вирусный вектор для введения по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты в Т-клетку.

[0104] Клетка может включать в себя первичную клетку, содержащую: по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере один гетерологичный ген, безвирусно вставленный в по меньшей мере одну целевую область генома клетки. В некоторых аспектах по меньшей мере один гетерологичный ген кодирует ХАР или другой химерный рецептор. В некоторых аспектах по меньшей мере один гетерологичный ген содержит по меньшей мере один или оба из следующих: (1) варибельный участок гетерологичного гена альфа-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- α) и (2) варибельный участок гетерологичного гена бета-цепи Т-клеточного рецептора (ТКР- β). В некоторых аспектах первичная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых аспектах клетка не содержит вирусный вектор для введения по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты в клетку. В некоторых аспектах по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты имеет размер 1,5 т. п. о. В некоторых аспектах по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты имеет размер 500 п. о. В некоторых аспектах целевая область находится в TRAC, например экзон 1, 2 или 3 из TRAC. В некоторых аспектах целевая область находится в TRBC, например экзон 1, 2 или 3 из TRBC. В некоторых аспектах Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку или CD4⁺ Т-клетку. В некоторых аспектах экспрессия по меньшей мере одного гетерологичного гена управляется эндогенным промотором. В некоторых аспектах экспрессия одного или обоих из TRAC и TRBC снижена в Т-клетке по сравнению с контрольной Т-клеткой, при этом контрольная Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку человека, у которой отсутствует безвирусная вставка.

[0105] В некоторых случаях ХАР называют ХАР первого, второго и/или третьего поколений. В некоторых аспектах ХАР первого поколения - это тот, который обеспечивает исключительно индуцированный цепью CD3 сигнал при связывании антигена; в некоторых аспектах ХАР второго поколения - это тот, который обеспечивает такой сигнал и костимуляторный сигнал, например, включающий в себя внутриклеточный сигнальный домен от костимуляторного рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах ХАР третьего поколения - это тот, который включает в себя множество костимуляторных доменов различных костимуляторных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает в себя внеклеточную часть, содержащую антитело или его фрагмент, представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает в себя внеклеточную часть, содержащую антитело или его фрагмент, представленные в данном документе, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент включают в себя scFv или однодоменное VH-антитело и внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых

аспектах внутриклеточный сигнальный домен включает в себя сигнальный домен цепи ζ из CD3 (цепи CD3 ζ). В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает в себя 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 напрямую или непрямо. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой из спейсеров, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимуляторной Т-клеточной молекулы, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах Т-клеточная костимуляторная молекула представляет собой CD28 или 41BB. В некоторых вариантах осуществления ХАР содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления ХАР содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления рецептор дополнительно включает в себя спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такой как молекула Ig человека, такую как шарнир Ig, например, шарнир IgG4, такой как спейсер, состоящий только из шарнирной области. В некоторых таких вариантах осуществления трансмембранный домен рецептора, например, ХАР, представляет собой трансмембранный домен CD28 человека или его вариант, например, трансмембранный домен из 27 аминокислот CD28 (учетный номер: P10747.1). В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимуляторной Т-клеточной молекулы. В некоторых аспектах Т-клеточная костимуляторная молекула представляет собой CD28 или 41BB. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный костимуляторной сигнальный домен CD28 человека, его функциональный вариант или его часть, например, его домен, состоящий из 41 аминокислоты, и/или такой домен с замещением LL на GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит внутриклеточный костимуляторной сигнальный домен 41BB, его функциональный вариант или его часть, например, цитоплазматический домен 4-1BB человека, состоящий из 42 аминокислот (учетный номер: Q07011.1), его функциональный вариант или его часть. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит стимуляторной сигнальный домен CD3-дзета человека или

его функциональный вариант, например, цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3 ζ человека (учетный номер: P20963.2), или сигнальный домен CD3 ζ , как описано в патенте США № 7446190 или патенте США № 8911993.

[0106] Способы модификации целевой нуклеиновой кислоты в клетке, описанные в данном документе, включают в себя введение в клетку композиции, описанной в данном документе, при этом матрица МНГР интегрирована в целевую нуклеиновую кислоту. Как продемонстрировано в примерах, предварительная инкубация нацеливаемой нуклеазы (например, РНК-направляемой нуклеазы) и комплекса донорная гРНК - РНП с донорной матрицей (содержащей матрицу МНГР, модифицированную целевой последовательностью ЛСД) до введения композиции в клетку повышает выход клеток с нокином. В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, вводят в клетку с помощью электропорации.

[0107] В некоторых случаях клетки извлекают из субъекта, модифицируют с использованием любого из способов, описанных в данном документе, и вводят субъекту. В других случаях композицию, описанную в данном документе, можно доставлять субъекту *in vivo*. См., например, патент США № 9737604 и работу Zhang et al. "Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy," NPG Asia Materials Volume 9, page e441 (2017).

[0108] В конкретных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, можно применять в способах модификации целевой нуклеиновой кислоты в первичной клетке. Композиции, описанные в данном документе, можно применять в способах индуцирования стабильной геномной модификации целевой нуклеиновой кислоты в первичной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя введение в первичную клетку композиции, содержащей белок Cas (например, белок Cas9), одну или большее число единых гидовых РНК (егРНК) и анионный полимер. егРНК может содержать первую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна целевой нуклеиновой кислоте, и вторую нуклеотидную последовательность, которая взаимодействует с белком Cas (например, белком Cas9). В некоторых вариантах осуществления белок Cas (например, белок Cas9) и егРНК можно инкубировать вместе для образования РНП-комплекса до введения в первичную клетку. Композицию, содержащую белок Cas (например, белок Cas9), одну или большее число единых гидовых РНК (егРНК) и донорную матрицу-плазмиду, можно электропорировать в первичную клетку. В некоторых вариантах осуществления первичная клетка выбрана из группы, состоящей из иммунокомпетентной клетки (например, первичной Т-клетки), клетки крови, их клетки-предшественницы или их стволовой клетки, мезенхимальной клетки и их комбинации. В некоторых случаях иммунокомпетентная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, дендритной клетки, клетки - естественного киллера, макрофага, нейтрофила, эозинофила, базофила, тучной клетки, их клетки-предшественницы и их комбинации. Клетка-предшественница или стволовая клетка может быть выбрана из группы, состоящей из гемопоэтической клетки-предшественницы,

гемопозитической стволовой клетки и их комбинации. В некоторых случаях клетка крови представляет собой стволовую клетку крови. В некоторых случаях мезенхимальная клетка выбрана из группы, состоящей из мезенхимальной стволовой клетки, мезенхимальной клетки-предшественницы, мезенхимальной прекурсорной клетки, дифференцированной мезенхимальной клетки и их комбинации. Дифференцированная мезенхимальная клетка может быть выбрана из группы, состоящей из костной клетки, хрящевой клетки, мышечной клетки, жировой клетки, стромальной клетки, фибробласта, дермальной клетки и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления первичная клетка может включать в себя популяцию первичных клеток. В некоторых случаях популяция первичных клеток включает в себя гетерогенную популяцию первичных клеток. В других случаях популяция первичных клеток включает в себя гомогенную популяцию первичных клеток.

[0109] В некоторых вариантах осуществления первичную клетку выделяют из млекопитающего до введения композиции, описанной в данном документе, в первичную клетку. Например, первичную клетку можно извлекать из человека. В некоторых случаях первичную клетку или ее потомство возвращают млекопитающему после введения композиции, описанной в данном документе, в первичную клетку. Другими словами, генетически модифицированная первичная клетка подвергается аутологичной трансплантации. В других случаях генетически модифицированная первичная клетка подвергается аллогенной трансплантации. Например, первичную клетку, которая не подверглась стабильной генной модификации, выделяют у субъекта-донора, а затем генетически модифицированную первичную клетку трансплантируют субъекту-реципиенту, отличному от субъекта-донора.

[0110] Композицию, описанную в данном документе, можно вводить в клетку (например, первичную клетку) с использованием способов и методик, доступных в данной области техники. Неограничивающие примеры подходящих способов включают в себя электропорацию, технологию распыления частиц и прямую микроинъекцию. В некоторых вариантах осуществления этап введения в клетку композиции, описанной в данном документе, включает в себя электропорацию композиции в клетку.

[0111] В некоторых вариантах осуществления стабильная генная модификация целевой нуклеиновой кислоты индуцируется в больше чем около 5% популяции клеток (например, популяция первичных клеток), например, в около 6%, около 7%, около 8%, около 9%, около 10%, около 12%, около 14%, около 16%, около 18%, около 20%, около 22%, около 24%, около 26%, около 28% или около 30% популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления стабильная генная модификация целевой нуклеиновой кислоты индуцируется в больше чем около 50% популяции клеток (например, популяция первичных клеток), например, в около 51%, около 52%, около 53%, около 54%, около 55%, около 56%, около 57%, около 58%, около 59%, около 60%, около 61%, около 62%, около 63%, около 64%, около 65%, около 66%, около 67%, около 68%, около 69%, около 70%, около 71%, около 72%, около 73%, около 74%, около 75%, около 76%, около 77%,

около 78%, около 79%, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% популяции клеток. В других вариантах осуществления стабильная генная модификация целевой нуклеиновой кислоты индуцируется в больше чем около 70% популяции клеток, например, в около 71%, около 72%, около 73%, около 74%, около 75%, около 76%, около 77%, около 78%, около 79%, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% популяции клеток. В других вариантах осуществления стабильная генная модификация целевой нуклеиновой кислоты индуцируется в больше чем около 90% популяции клеток, например, в около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% популяции клеток.

[0112] В других вариантах осуществления стабильная генная модификация целевой нуклеиновой кислоты включает в себя замещение генетической мутации в целевой нуклеиновой кислоте (например, для коррекции точечной мутации или однонуклеотидного полиморфизма (ОНП, англ. «SNP») в целевой нуклеиновой кислоте, которые ассоциированы с заболеванием) или вставку открытой рамки считывания (ОРС, англ. «ORF»), содержащей нормальную копию целевой нуклеиновой кислоты (например, для нокина в кДНК дикого типа целевой нуклеиновой кислоты, которая ассоциирована с заболеванием).

[0113] В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в данном документе, может также включать в себя очистку клетки (например, первичной клетки), имеющей стабильную генную модификацию целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях композиция, выделенная путем этапа очистки, включает в себя по меньшей мере около 80% клеток, имеющих стабильную генную модификацию целевой нуклеиновой кислоты например, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или больший процент клеток, имеющих стабильную генную модификацию целевой нуклеиновой кислоты.

[0114] Представлены материалы, композиции и компоненты, которые можно применять для, можно применять в сочетании с, можно применять в процессе описанных в данном документе способов и композиций, или которые являются продуктами описанных в данном документе способов и композиций. Эти и другие материалы описаны в данном документе, и следует понимать, что когда описываются комбинации, подмножества, взаимодействия, группы и т. д. этих материалов, конкретно предусматривается и описывается в данном документе каждая (-ый) из них, хотя конкретные ссылки на каждую из различных индивидуальных и коллективных

комбинаций и перестановок этих соединений могут не быть описаны явно. Например, если описываются и обсуждаются способ и ряд модификаций, которые могут быть внесены в одну или большее число молекул, включительно с данным способом, конкретно предусматриваются каждая комбинация, перестановка способа и возможные модификации, если специально не указано иное. Подобным образом, любое их подмножество или комбинация из них также конкретно предусматриваются и описываются. Данные концепции применимы ко всем аспектам данного раскрытия, включая, но не ограничиваясь ими, этапы в способах применения композиций, представленных в данном документе. Следовательно, если существует множество дополнительных этапов, которые могут быть выполнены, следует понимать, что каждый из этих дополнительных этапов может быть выполнен с любыми конкретными этапами способов или комбинациями этапов способов, представленных в данном документе, и что каждая такая комбинация или каждое такое подмножество комбинаций конкретно предусмотрены и должны считаться представленными в данном документе.

[0115] Публикации, цитируемые в данном документе, и материалы, на которые они ссылаются, настоящим конкретно включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

ПРИМЕРЫ

[0116] Нижеследующие примеры приведены только в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения. Специалисты в данной области техники легко распознают множество некритичных параметров, которые могут быть изменены для получения по существу тех же или сходных результатов.

Пример 1. Способы экспериментов

Культура Т-клеток

[0117] Т-клетки обогащали из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), полученных с использованием Lymphoprep (STEMCELL Technologies) из лейкопаков нормальных доноров (STEMCELL Technologies) с использованием набора для выделения Т-клеток человека EasySep Human T-Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies). Затем Т-клетки активировали гранулами Dynabeads CD3/CD28 в соотношении 1:1 гранул к клеткам (ThermoFisher, 40203D) в среде TexMACS (Miltenyi 130-197-196) с добавлением 3% сыворотки крови АВ человека (Gemini Bio) и 12,5 нг/мл ИЛ-7 и ИЛ-15 человека (Miltenyi premium grade), и выращивали при температуре 37°C, с 5% CO₂ в течение 48 часов до электропорации.

Получение РНП и электропорация Т-клеток

[0118] РНП CRISPR получали путем объединения 120 мкМ egРНК (Synthego), нацеленной на последовательность ДНК AAGTCTCTCAGCTGGTACA (SEQ ID NO:1), 62,5 мкМ белка sNLS-SpCas9-sNLS (Aldevron) и буфера P3 (Lonza) в соотношении 5:1:3:6. Диапазон масс (конечная концентрация варьировала в диапазоне от 0 до 100 мг/л) плазмидной ДНК (плазмиды, имеющие матрицы МНГР [вставка размером ~5,7 т. п. о., кодирующая трансген, имеющий эпитопную метку Muc и 450 п. о., фланкирующая

гомологичные плечи] с последовательностями ЛСД, фланкирующими гомологичные плечи МНГР, или без них) смешивали с 3,5 мкл РНП. Т-клетки подсчитывали, центрифугировали при 90 X G в течение 10 минут и ресуспендировали в количестве 10⁶ клеток/14,5 мкл РЗ с добавкой (Lonza). 14.5 мкл суспензии Т-клеток добавляли к смеси ДНК/РНП, переносили в лунку 384-луночного планшета Nucleocuvette Plate от Lonza и воздействовали импульсами в системе нуклеофекции Lonza HT Nucleofector System с кодом EH-115. Клетки оставляли в покое на 15 минут при комнатной температуре перед переносом в 96-луночные планшеты (Sarstedt) в среде TechMACS, дополненной 12,5 нг/мл ИЛ-7 и ИЛ-15 человека (Miltenyi premium grade).

Анализ способом проточной цитометрии

[0119] Экспрессию трансгена (представляющего интерес гена с эпитопной меткой Мус) определяли путем окрашивания антителом против Мус (клон 9B11, Cell Signaling Technology) и анализа на проточном цитометре Attune NxT. Также применяли другие антитела - антитело против ТКР-альфа/бета (клон IP26, BioLegend), антитело против CD4 (клон RPA-T4, BioLegend), антитело против CD8 (клон SK1, BioLegend).

Последовательности

[0120] Протоспейсер CRISPR (например, целевая последовательность ЛСД):
GAGCCATGCTTGGCTTACGA

[0121] Полный сайт CRISPR, протоспейсер и иллюстративный ППМ:
GAGCCATGCTTGGCTTACGAGGG

[0122] Используемая каркасная последовательность стандартной донорной плазмиды (X указывает, где была произведена вставка представленного трансгена длиной 5696 п. о.; обычными заглавными буквами обозначены гомологичные плечи):
CGACCAACCCATCAAACCTCCCCGCCCCAGCACTTTTATTTCTCCTCTTTAGGAAGTACACTTCAGTATCTTTGGCACAGTGCATGAGCACGACTAAAGTAAAACATCGCAGAAACATAGCTTTAGTCTACCCTTCGTGTCCTAAAAGGAAAACCAGTAGCTTCCCAGGCACCCGGAAGGGCAACACATGTCCTCTGCAGTTTCTGCACACGGGAAGGTAAGACAGAGAGGACCTACTCCTCAACACAGAAACATTTCAAAATCTTTCCTCGCCTGCAACCCAAGCTGAAGTCATTCTCCCCAGAAATAACAAAAGTTGGAAGAGAAGCCGGAGACAGGATAGGTGCAGGAAGCCCACACTTTGAGGGCAGCACTCAGACACCCTCTCCTGTGTGCAGGACGTGCCGAATGTTTCAGGTGCAATGAGAATGAGCCATGCTTGGCTTA-XCGAGGGCAATCTGGCCCATCAAGTGGCCTTCGCCTCTGGGAGTAACAAAAATGCAC TTCAAAATAGCTTCTGTAATCAAGCTGCATGGGTGGAGTACTCCCCAGCTGACTCCAGGAAGTTCTCTATCCAAAGCTATTTCATTAGGCCAGAGCTGTGCAAATAATTAGTCACCCACTTGCTCCATAACCCTCCATGACAGCCCAGGCATTGAGTCCAGGTGGGACCATCAAGCCATGCTCTGGTGGCTCATGCATTATCATAGAAATGGGAGGCTTTATTTATTTTACTAAAAAGAACAAAAACAACAGACTGCTGTCCTTTAGACAATAGGATCACGTCATCTGAGCCCTCTGTGCCCCAGGTGACAAGCCCAGCCCCAAGTTCTCTTTCCTCAGCCTCCCCACACATGTTCTGGAGGAGATGGGCCAGCAGGCTGCTCTGAGGCCTGGC

gcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaataatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgt
 cgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagggcggttgcgtattgggcgctgtccgcttctcgtcactgactcgtcgtg
 cgctcggctgttcggctgcccgcgagcggfatacagctcactcaaaggcggttaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaag
 aacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggttgcgtggcgtttttccataggetccgccccctgacga
 gcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaccggacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgt
 gcgctctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttttctcccttccgggaagcgtggcgttttccatagctcagctgtaggt
 atctcagttcgggtgtaggtcgttccgctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttaccggtaactatc
 gtcttgagccaaccggtaagacacgacttaccgactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtagcgggtg
 ctacagagttctgaagtggggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctcgtgaagccagttaccctcggaaa
 aagagttggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagcgggtgggttttttggttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaag
 gatctcaagaagatccttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggatgagattacaaaa
 aggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtttaatacaatctaaagtatatagtaaaacttggctgacagttaccaatgctta
 cagtgaggcacctatctcagcgtatctgtctatttcgttccatagttgctgactccccgctgtgtagataactacgatacgggagggcttac
 catctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaaccacgctcaccggctccagattatcagaataaaccagccagccggaaggcc
 gagcgcagaagtggctcctgcaactttaccgctccatccagctctattaattgttggcgggaagctagagtaagtagttccagttaatagtt
 gcgcaacgttggcattgctacaggcatcgtgggtcacgctcgtcgtttggatggcttccatcagctccggttcccaacgatcaaggcga
 gttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggttagctccttcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtggtatcactcat
 gggtatggcagcactgcataattcttactgcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtagtactcaaccaagtcattctgagaata
 gtgtatcggcgaccgagttgctcttcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaa
 aacgttctcggggcgaaaactctcaaggatctaccgctgttgagatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatc
 ttttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggggcgacacggaaatgtgaata
 ctactacttcttttcaatattatgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaatag
 gggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgtctaaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcagga
 ggccctttgtctcgcgcttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgggagactgtcacagcttctgtgaagcggatg
 ccgggagcagacaagcccgcagggcgcgctcagcgggtgtggcgggtgtcggggctggcttaactatcgggcatcagagcagattgta
 ctgagagtgcaccatagcgggtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcagggccattcgcattcaggetcgc
 aactgttgggaaggcgatcgggtcgggctcttcgctattaccagcgtggcgaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggta
 acgccagggtttccagtcacgacggtgtaaacgacggccagtgaaatgacgcgtattgggat

[0123] Использованная каркасная последовательность донорной плазмиды ЛСД (X указывает, где была произведена вставка представленного трансгена длиной 5696 п. о.; жирным шрифтом выделен протоспейсер (целевая последовательность ЛСД); прописными буквами курсивом ППМ; обычными заглавными буквами обозначены гомологичные плечи):

GAGCCATGCTTGGCTTACGaggCGACCAACCCATCAAACCTCCCCGCCCCCA
 GCACTTTTATTTCTCCTCTTTAGGAAGTACACTTCAGTATCTTTGGCACAGTGCATGA
 GCACGACTAAAGTAAAACATCGCAGAAAACATAGCTTTAGTCTACCCTTCGTGTCCT
 AAAAGGAAAACAGTAGCTTCCCAGGCCACCGGAAGGGCAACACATGTCTCTGCA
 GTTTCTGCACACGGGAAGGTAAAGACAGAGAGAGGACCTACTCCTCAACACAGAAA
 CATTTCAAATCTTTCCTCGCCTGCAACCCAAGCTGAAGTCATTCTCCCCAGAAATA
 ACAAAGTTGGAAGAGAAGCCGGAGACAGGATAGGTGCAGGAAGCCCACACTTTG

AGGGCAGCACTCAGACACCCTCTCCTGTGTGCAGGACGTGCCGAATGTTTCAGGTGC
 AATGAGAATGAGCCATGCTTGGCTTA-X-
 CGAGGGCAATCTGGCCCATCAAGTGGCCTTCGCCTCTGGGAGTAACAAAAATGCAC
 TTCAAATAGCTTCTGTAATCAAGCTGCATGGGTGGAGTACTCCCCAGCTGACTCCA
 GGAAGTTCTCTATCCAAAGCTATTCATTAGGCCAGAGCTGTGCAAATAATTAGTCAC
 CCACTTGCTCCATAACCCTCCATGACAGCCCAGGCATTGAGTCCAGGTGGGACCATC
 AAGCCATGCTCTGGTGGCTCATGCATTATCATAGAAATGGGAGGCTTTATTTATTTT
 ACTAAAAGAACAACAAACAGACTGCTGTCCTTTAGACAATAGGATCACGTCAT
 CTGAGCCCTCTGTGCCCCAGGTGACAAGCCCAGCCCCAAGTTCTCTTTCCTCAGCCT
 CCCCACACATGTTCTGGAGGAGATGGGCCAGCAGGCTGCTCTGAGGCCTGGCccc**T**
CGTAAGCCAAGCATGGCTCatcccaatggcgcgccgagcttggcgtaatcatggcatagctgtttcctgtgtgaaattg
 ttatccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtglaaagcctgggggtgcctaatgagtgagctaacacattaattgc
 gttgagctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagggcggttgcgt
 attgggcgctgttccgcttctcgtcactgactcgtcgtcggcgttccggctgcccgcgagcggatcagctcactcaaaggcggta
 acggttatccacagaatcaggggataaacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgc
 gttgctggcgttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgacaggacta
 taaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgccgttaccggatacctgtccgcttttccctc
 ggaagcgtggcgcttttccatagctcacgctgtaggtatcagttcgggtgtaggtcgttccgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccc
 cgttcagcccagcctgcgcttaccggttaactatcgttctgagtcacaacccggttaagacacgacttaccgactggcagcagccactg
 gtaacaggattagcagagcggatgtagggcgtgtacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatt
 ggtatctgcgtctgctgaaccggttaccctcggaaaaagagttgtagctcttgcggcaaaacaccaccgctggtagcgggtgtttt
 tttgttgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgggtctgacgctcagtgaacgaa
 aactcacgttaagggttttggctatgagattatcaaaaagatcttccactagatccttttaaaftaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagat
 atatgagtaaaactggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggacactatctcagcagatctgtctatttctgctatccatagttgctgactc
 cccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctgccccagtgctgcaatgataaccgcgagaaccacgctcaccggtcca
 gatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttaccgctccatccagctatttaattgttgc
 cgggaagctagaglaagtagttccagttaatagtttgcgaacgttggccattgctacagcagcgtggtgtcacgctcgtcgttggat
 ggcttattcagctccggttcccaacgatcaaggcaggttaccatgatccccatgttggcaaaaaagcgggttagctcctcggctcctccgatc
 gttgtcagaagtaagttggccgaggttactcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctg
 tgactggtgagfactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatacgggataataccgcg
 ccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaaacgttctcggggcgaaaacttcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcga
 tgaaccactcgtgcaaccaactgatcttcagcacttttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaa
 aaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcactcttcttttcaatatttgaagcatttaccaggggtattgtctcatgagcg
 gatacatattgaaatgatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaccattatt
 atcatgacattaacctataaaaaatagggctatcacgagggccttttctcgcgcgttccgggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagc
 tcccgagactgtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcgg
 ggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgfactgagagtgccatatgcgggtgtaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaat
 accgcatcagcgcacattccacattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtcggggcctctcgtattacgccagctggcga
 aagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggtttccagctcacgacgttgaaaacgacggccagtgaaatgacgcg
 tattgggat

Пример 2. Конструкции линейризации совместной доставки (ЛСД) для CRISPR-опосредованного редактирования генов Т-клеток

[0124] Генную инженерию Т-клеток с использованием электропорации РНП исследовали путем сравнения донорных матриц-плазмид с: (1) кассетой матрицы направляемой гомологией репарации (ММНГР, англ. «HDRТ»), имеющей стандартную конструкцию ММНГР-трансгена, просто фланкированного гомологичными плечами (фиг. 1, панель слева) или (2) конструкцией линейризации совместной доставки (ЛСД), в которой ММНГР дополнительно фланкирована целевыми последовательностями ЛСД (целевые сайты CRISPR, соответствующие протоспейсеру гРНК CRISPR, используемому для нацеливания на геном Т-клеток) и примыкающим к протоспейсеру мотивом (ППМ) (фиг. 1, панель справа).

[0125] Как показано на фиг. 2, Т-клетки прошли электропорацию РНП-комплексами с различными количествами либо стандартной донорной матрицы-плазмиды, либо донорной матрицы-плазмиды с ЛСД, а затем данные клетки оценивали на предмет интеграции трансгена способом проточной цитометрии (фиг. 2А, количественное определение представлено в таблице 1). Конструкция ЛСД продемонстрировала больший % КІ при меньших дозах ДНК ММНГР, чем стандартная плазида МНГР без модификаций последовательностями ЛСД (фиг. 2В, количественное определение представлено в таблице 2). Кроме того, общий выход Т-клеток был увеличен при этих низких дозах ДНК по сравнению со стандартной ММНГР-плазмидой (фиг. 2С, количественное определение представлено в таблице 3). Соответственно, конструкция донорной плазмиды ЛСД продемонстрировала значительное ($P < 0,0001$) увеличение выхода генетически модифицированных Т-клеток по сравнению со стандартными конструкциями плазмид. В дополнение к этому, соотношение CD8 к CD4 Т-клеткам было меньше чем $\sim 0,5$ при использовании матрицы ЛСД МНГР для всех протестированных концентраций, в отличие от стандартной плазмиды МНГР (Фиг. 3, количественное определение представлено в таблице 4). Вариабельность выхода нокин-клеток из Т-клеток, полученных от 4 отдельных доноров, также оценивали по процентному коэффициенту вариации (%CV) и соотношению максимального к минимальному (Макс./Мин., фактор кратности), используя либо стандартные плазмиды, либо плазмиды с ЛСД в различных дозах. Примечательно, что различие между выходами было значительно ниже при использовании конструкций с ЛСД по сравнению со стандартными конструкциями плазмид в дозах $\leq 0,5$ (таблица 5). Эти данные продемонстрировали, что конструкция донорной плазмиды с ЛСД обеспечивает больший выход и большую однородность результатов среди разных доноров при опосредованном электропорацией Cas9-редактировании Т-клеток, и является основным преимуществом в процессе клеточной инженерии.

Таблица 1. Количественное определение процента нокина из репрезентативных изображений проточной спектрометрии (% от метки Мус)

К1%	Доза (мкг)	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000
		2,68	4,63	8,86	17,22	32,70
ЛСД		21,98	29,57	33,87	35,99	42,62

Таблица 2. Количественное определение процента нокина (% от метки Мус)

К1%	Доза (мкг)	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000
	средняя	2,95	4,77	8,45	19,86	37,35
ЛСД	средняя	18,29	26,80	37,15	41,58	46,15

Таблица 3. Количественное определение выхода клеток с нокином

выход К1/клетки le6	Доза (мкг)	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000
	средняя	61829,3	92116,2	133162,1	174020,3	183254,9
ЛСД	средняя	453577,2	604795,1	377600,0	50655,0	14933,3

Таблица 4. Количественное определение соотношения CD8/CD4

Соотношение CD8/CD4	Доза (мкг)	0,000	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000
	среднее	0,27	0,56	0,79	0,96	1,11	0,87
ЛСД	среднее	0,27	0,36	0,49	0,55	0,30	0,31

Таблица 5. Вариабельность выхода клеток с нокином среди множества доноров

Доза (мкг)	Стандарт		ЛСД	
	Макс/Мин кратность %КВ	%КВ	Макс/Мин кратность %КВ	%КВ
0,125	80,36	5,39	41,58	2,21
0,150	83,75	8,02	52,84	3,62
0,300	92,34	13,40	89,28	22,56
1,000	99,75	33,37	119,03	144,73
2,000	101,37	45,00	147,25	162,58

Пример 3. Производительность на платформе клинического масштаба и включение последовательности ЛСД в кассету МНГР увеличивает процент клеток с интеграцией трансгена после трансфекции в клиническом масштабе

Материалы и способы

[0126] Выделение и активация первичных Т-клеток человека. Свежие популяции клеток, собранные способом афереза у здоровых доноров, приобретали у NemaCare Corporation. CD4 и CD8 Т-клетки выделяли из популяции донорских клеток с использованием набора для положительного выделения Miltenyi CD4 CD8 и Miltenyi

AutoMACS Pro Separator. Выделенные CD4/8 Т-клетки активировали после выделения с помощью Т-активирующих гранул Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28, ThermoFisher. Клетки активировали в среде Miltenyi TexMACS, дополненной 3% сывороткой крови АВ человека (Gemini Bio) с ИЛ-7 и ИЛ-15 (Miltenyi Biotech). Клетки инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C после добавления активирующей среды.

[0127] Подготовка первичных Т-клеток человека к электропорации. После активации Т-клетки извлекали из активационного сосуда и переносили в конические пробирки объемом на 50 мл. Для получения популяции активированных клеток без гранул соблюдался протокол удаления гранул, предоставленный компанией Miltenyi Biotech.

[0128] Подготовка рибонуклеопротеинового комплекса для электропорации. Единую гидовую РНК, нацеленную на локус GS94, приобретали у Synthego Corporation и ресуспендировали до рабочей концентрации в TE/воде. Белок каспазы SpCas9 приобретали у Aldevron. Гидовую РНК и белок каспазы соединяли в комплекс при комнатной температуре с образованием рибонуклеопротеинового комплекса (РНП-комплекса).

[0129] ДНК-плазмида. ДНК-плазмида, содержащая последовательности ЛСД, была сконструирована собственными силами и получена компанией Elim Bio.

[0130] Опосредованная электропорацией трансфекция первичных Т-клеток. Активированные Т-клетки, подготовленные так, как описано выше, подсчитывали, и 5×10^7 клеток на реакцию электропорации переносили в конические пробирки объемом на 50 мл. Клетки осаждали при 300 x g в течение 5 минут, затем промывали в ФСБ и осаждали при 300 x g в течение 5 минут. Затем клетки ресуспендировали в буфере Lonza P3. Объем буфера рассчитывали так, чтобы общий объем суспензии клеток после добавления РНП и ДНК составлял 1 мл. Чтобы оценить эффективность нескольких конструкций ДНК, для тестирования отобрали три конструкции с ЛСД и три конструкции без ЛСД, содержащие трансген «Х». Для каждой конструкции использовали по 20 мкг ДНК на одну трансфекцию. ДНК смешивали с раствором РНП, затем тщательно перемешивали с суспензией клеток. Затем суспензию клеток, РНП и ДНК переносили в картридж Lonza LV. Клетки подвергали электропорации на устройстве Lonza LV и оставляли восстанавливаться в течение 10 минут при комнатной температуре после электропорации. Затем клеточную смесь переносили в G-rex 100 (Wilson Wolf Manufacturing), содержащий 350 мл среды, и инкубировали при температуре 37°C.

[0131] Анализ результатов способом проточной цитометрии Результаты получали с помощью проточной цитометрии на 6-е сутки после трансфекции или на 8-е сутки после активации. Чтобы подготовить клетки к анализу, контрольные лунки смешивали для получения гомогенного раствора и подсчитывали с помощью Nexcelom K2 Cellometer с окрашиванием АОРІ для дифференциации живых и мертвых клеток. Используя полученное значение, из каждой лунки удаляли 2×10^5 клеток и переносили в 96-луночный планшет с V-образными лунками. Клетки осаждали, затем однократно промывали в

буфере для окрашивания (BD Biosciences) и осаждали при 400 x g в течение 5 минут. Во время центрифугирования готовили окрашивающий раствор. Панель цитометрии включала в себя следующие окрашивания: Мус PE (BioLegend) и Zombie L/D (BioLegend). Клетки ресуспендировали в окрашивающем растворе и инкубировали при температуре 4°C в течение 30 минут. После инкубации в лунки добавляли буфер для окрашивания и осаждали клетки при 400 x g в течение 5 минут. Затем клетки однократно промывали буфером для окрашивания и ресуспендировали в буфере для окрашивания с добавлением гранул для количественного анализа (ThermoFisher). Анализ способом проточной цитометрии выполняли на цитометре ThermoFisher Attune, результаты анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo.

Результаты

[0132] Производительность платформы в клиническом масштабе. Эффект модификации последовательности нуклеиновой кислоты плазмиды, содержащей матрицу направляемой гомологией репарации, для включения последовательности ЛСД непосредственно выше, в направлении 5'-плеча МНГР, и ниже, в направлении 3'-плеча МНГР, оценивали в контексте ранее описанной системы CRISPR-Cas9 на платформе и в масштабе, значимых для клинического производства продуктов для клеточной терапии. Цель данного исследования состояла в том, чтобы продемонстрировать полезность последовательности ЛСД в клиническом контексте и подчеркнуть применимость данной технологии в производстве продуктов для клеточной терапии.

[0133] Включение последовательности ЛСД в каскету МНГР увеличивает процент клеток с интеграцией трансгена после трансфекции в клиническом масштабе. Т-клетки, электропорированные плазмидами, содержащими последовательность ЛСД - GAGCCATGCTTGGCTTACGA - и последовательность, кодирующую трансген, или контрольными плазмидами, содержащими последовательности, кодирующие трансген без последовательности ЛСД, оценивали как на предмет числа клеток, так и на предмет экспрессии трансгена на 6-е сутки после электропорации. Длина полинуклеотидной последовательности, кодирующей трансген, составляла: 6533 пар оснований (для плазмиды pS3798), 7042 пар оснований (для плазмиды pS3631) и 6236 пар оснований (для плазмиды pS3797). Результаты, представленные на фиг. 4, указывают на значительное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии трансгена в условиях введения плазмиды, содержащей последовательность ЛСД, по сравнению с условиями введения контрольных плазмид, содержащих сайт не-ЛСД. Очевидна разница в процентном соотношении клеток, содержащих интегрированный трансген. В среднем, экспрессия трансгена, определенная способом проточной цитометрии, увеличилась с 3,35% для условий без ЛСД, до 9,76% для условий с ЛСД, при 20 мкг ДНК. В целом, эти данные демонстрируют усиленный эффект, который включение последовательности ЛСД оказывает на процесс редактирования генов.

ПЕРЕЧЕНЬ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Yin, H., Xue, W. & Anderson, D. G. CRISPR-Cas: a tool for cancer research and therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol*, doi:10.1038/s41571-019-0166-8 (2019).
2. Dunbar, C. E. et al. Gene therapy comes of age. *Science* **359**, doi:10.1126/science.aan4672 (2018).
3. Cornu, T. I., Mussolino, C. & Cathomen, T. Refining strategies to translate genome editing to the clinic. *Nat Med* **23**, 415-423, doi:10.1038/nm.4313 (2017).
4. David, R. M. & Doherty, A. T. Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity. *Toxicol Sci* **155**, 315-325, doi:10.1093/toxsci/kfw220 (2017).
5. Roth, T. L. et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature* **559**, 405-409, doi:10.1038/s41586-018-0326-5 (2018).
6. Vo, L. T. et al. Regulation of embryonic haematopoietic multipotency by EZH1. *Nature* **553**, 506-510, doi:10.1038/nature25435 (2018).
7. Pouton, C. W., Wagstaff, K. M., Roth, D. M., Moseley, G. W. & Jans, D. A. Targeted delivery to the nucleus. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 698-717, doi:10.1016/j.addr.2007.06.010 (2007).
8. Doudna, J. A. & Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096, doi:10.1126/science.1258096 (2014).
10. Jiang, F. & Doudna, J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* **46**, 505-529, doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822 (2017).
11. Luecke, S. et al. cGAS is activated by DNA in a length-dependent manner. *EMBO Rep* **18**, 1707-1715, doi:10.15252/embr.201744017 (2017).
12. Richardson, C. D., Ray, G. J., Bray, N. L. & Corn, J. E. Non-homologous DNA increases gene disruption efficiency by altering DNA repair outcomes. *Nat Commun* **7**, 12463, doi:10.1038/ncomms12463 (2016).
13. Bernkop-Schnurch, A. Strategies to overcome the polycation dilemma in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **136-137**, 62-72, doi:10.1016/j.addr.2018.07.017 (2018).
14. Vakulskas, C. A. et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med* **24**, 1216-1224, doi:10.1038/s41591-018-0137-0 (2018).
15. Ran, F. A. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**, 1380-1389, doi:10.1016/j.cell.2013.08.021 (2013).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для модификации целевой нуклеиновой кислоты, содержащая:
 - (a) белок нацеливаемой нуклеазы; и
 - (b) донорную матрицу-плазмиду, содержащую:
 - (i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР);
 - (ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 5' от матрицы МНГР; и
 - (iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 3' от матрицы МНГР, и при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД способна расщепляться белком нацеливаемой нуклеазы или комплексом, содержащим белок нацеливаемой нуклеазы, и при этом композиция составлена для безвирусной доставки в клетку.
2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что белок нацеливаемой нуклеазы представляет собой РНК-направляемую нуклеазу.
3. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит РНК, содержащую по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой последовательности ЛСД.
4. Композиция по п. 2 или п. 3, отличающаяся тем, что указанная РНК-направляемая нуклеаза представляет собой белок Cas.
5. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит донорную гидовую РНК (гРНК), полученную с возможностью образования комплекса, содержащего белок нацеливаемой нуклеазы, и при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с прилегающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении 3' от целевых последовательностей ЛСД.
6. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит первую донорную гидовую РНК (гРНК), содержащую по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны первой целевой последовательности ЛСД, вторую донорную гРНК, содержащую по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны второй целевой последовательности ЛСД, при этом каждая донорная гРНК получена с возможностью образования отличающегося комплекса, содержащего белок нацеливаемой нуклеазы, и при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с прилегающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении 3' от целевых последовательностей ЛСД.

7. Композиция по п. 5 или п. 6, отличающаяся тем, что одна или несколько донорных гРНК содержат по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой геномной последовательности клетки.

8. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что указанная матрица МНГР содержит гомологичные плечи, которые комплементарны последовательностям нуклеиновых кислот, фланкирующим целевую геномную последовательность клетки.

9. Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что длина каждого из указанных гомологичных плеч независимо выбрана из длины, составляющей по меньшей мере 400 п. о., по меньшей мере 500 п. о., по меньшей мере 600 п. о., по меньшей мере 700 п. о., по меньшей мере 800 п. о., по меньшей мере 900 п. о., 1000 п. о., по меньшей мере 1100 п. о., по меньшей мере 1200 п. о., по меньшей мере 1300 п. о., 1400 п. о., по меньшей мере 1500 п. о., по меньшей мере 1600 п. о., по меньшей мере 1700 п. о., по меньшей мере 1800 п. о., по меньшей мере 1900 п. о. или по меньшей мере 2000 п. о.

10. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что:

(a) указанная нацеливаемая нуклеаза содержит РНК-направляемую нуклеазу, при этом РНК-направляемая нуклеаза содержит CRISPR-CAS;

(b) указанная композиция дополнительно содержит донорную гидовую РНК (гРНК), полученную с возможностью образования комплекса, содержащего белок нацеливаемой нуклеазы; и

(c) при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с прилегающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении 3' от целевых последовательностей ЛСД.

11. Композиция для модификации целевой нуклеиновой кислоты, содержащая:

(a) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS;

(b) донорную гидовую РНК (гРНК); и

(c) донорную матрицу-плазмиду, содержащую:

(i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР);

(ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 5' от матрицы МНГР; и

(iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 3' от матрицы МНГР, и

при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с прилегающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении к 3' от целевых последовательностей ЛСД, и

при этом композиция составлена для безвирусной доставки в клетку.

12. Композиция по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит второй белок нацеливаемой нуклеазы, при этом второй белок нацеливаемой нуклеазы или комплекс, содержащий второй белок нацеливаемой нуклеазы, способен расщеплять целевую геномную последовательность клетки.

13. Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что указанный белок нацеливаемой нуклеазы представляет собой РНК-направляемую нуклеазу.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит вторую РНК, содержащую по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой геномной последовательности.

15. Композиция по п. 13 или п. 14, отличающаяся тем, что указанная РНК-направляемая нуклеаза представляет собой белок Cas.

16. Композиция по п. 15, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит целевую гидовую РНК (гРНК), полученную с возможностью образования комплекса, содержащего второй белок нацеливаемой нуклеазы, и при этом: (1) целевая гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой геномной последовательности, и (2) целевая геномная последовательность функционально связана с прилегающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении 3' от целевой геномной последовательности.

17. Композиция по любому из пп. 12-16, отличающаяся тем, что указанные первая целевая последовательность ЛСД, вторая целевая последовательность ЛСД и целевая геномная последовательность содержат одну и ту же последовательность нуклеиновой кислоты.

18. Композиция по любому из пп. 12-17, отличающаяся тем, что указанная целевая геномная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты локуса «безопасной гавани».

19. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что указанная последовательность нуклеиновой кислоты локуса «безопасной гавани» содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты: GAGCCATGCTTGGCTTACGA.

20. Композиция по любому из пп. 5-19, отличающаяся тем, что одна, обе последовательности ППМ кодируются или ни одна из них не кодируется между целевыми последовательностями ЛСД и матрицей МНГР.

21. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, отличающаяся тем, что указанная нацеливаемая нуклеаза и каждая из гРНК находятся в молярном соотношении от 1:10 до 2:1 соответственно.

22. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, отличающаяся тем, что указанная нацеливаемая нуклеаза и донорная матрица находятся в молярном соотношении от 10:1 до 1000:1 соответственно.

23. Композиция по п. 1 или п. 12, отличающаяся тем, что указанный белок нацеливаемой нуклеазы и/или второй белок нацеливаемой нуклеазы содержат ДНК-связывающий белок-эффектор, подобный активатору транскрипции (TAL), и нуклеазу.

24. Композиция по п. 1 или п. 12, отличающаяся тем, что указанный белок нацеливаемой нуклеазы и/или второй белок нацеливаемой нуклеазы содержат ДНК-связывающий белок с цинковыми пальцами и нуклеазу.

25. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, отличающаяся тем, что указанный белок нацеливаемой нуклеазы и/или второй белок нацеливаемой нуклеазы слиты с последовательностью сигнала ядерной локализации (СЯЛ).

26. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, отличающаяся тем, что указанный белок нацеливаемой нуклеазы и/или второй белок нацеливаемой нуклеазы представляют собой белок Cas9.

27. Способ модификации целевой нуклеиновой кислоты в клетке, включающий в себя введение в клетку композиции или уже безвирусно-введенной в клетку композиции по любому из пп. 1-26, отличающийся тем, что указанная матрица МНГР интегрирована в целевую нуклеиновую кислоту.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанное введение включает в себя электропорацию.

29. Способ по п. 27 или п. 28, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой первичную клетку.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что указанная первичная клетка представляет собой первичную Т-клетку.

31. Рибонуклеопротеиновый комплекс для модификации целевой нуклеиновой кислоты, содержащий композицию по любому из пп. 1-26.

32. Рибонуклеопротеиновый комплекс для модификации целевой нуклеиновой кислоты, содержащий:

(а) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS; и

(б) донорную гидовую РНК (гРНК), при этом донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой последовательности линейаризации совместной доставки (ЛСД), и

при этом композиция составлена для безвирусной доставки в клетку.

33. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит донорную матрицу-плазмиду, содержащую:

(i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР);

(ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 5' от матрицы МНГР; и

(iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 3' от матрицы МНГР, и

при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с прилегающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении 3' от целевых последовательностей ЛСД.

34. Способ модификации целевой нуклеиновой кислоты в клетке, включающий в себя введение в клетку композиции по любому из п. 32 или п. 33.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанное введение включает в себя электропорацию.

36. Способ по любому из пп. 32-35, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой первичную клетку.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что указанная первичная клетка представляет собой первичную Т-клетку.

38. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, отличающийся тем, что указанный способ выполняют *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*.

39. Способ образования рибонуклеопротеинового комплекса (РНП-комплекса), включающий в себя инкубацию следующих или наличие инкубированных следующих: (а) РНК-направляемой нуклеазы CRISPR-CAS; и (б) донорной гидовой РНК (гРНК), при этом донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой последовательности линейаризации совместной доставки (ЛСД).

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанный белок Cas и гРНК инкубируют вместе при температуре 37°C в течение по меньшей мере 17 минут.

41. Способ по п. 39 или п. 40, отличающийся тем, что указанное молярное соотношение гРНК:белок Cas составляет от 0,25:1 до 4:1.

42. Способ по любому из пп. 39-41, отличающийся тем, что указанный РНП-комплекс имеет размер меньше чем 100 нм.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что указанный РНП-комплекс имеет размер от 20 нм до 90 нм.

44. Композиция, содержащая донорную матрицу-плазмиду, содержащую:

(i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР);

(ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 5' от матрицы МНГР; и

(iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 3' от матрицы МНГР, и

при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД способна расщепляться белком нацеливаемой нуклеазы или комплексом, содержащим белок нацеливаемой нуклеазы.

45. Композиция по п. 44, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит донорную гидовую РНК (гРНК), полученную с возможностью образования комплекса, содержащего белок нацеливаемой нуклеазы.

46. Композиция по п. 44 или п. 45, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит белок нацеливаемой нуклеазы.

47. Композиция по любому из пп. 44-46, отличающаяся тем, что указанная матрица содержит следующую последовательность, в направлении от 5' к 3': P1a-N1-P2b-H-P3c-N2-P4d, где:

(1) P1, P2, P3 и P4 представляют собой последовательности ППМ;

(2) N1 представляет собой первую целевую последовательность ЛСД и N2 представляет собой вторую целевую последовательность ЛСД;

(3) H представляет собой матрицу МНГР;

(4) a равно 0 и b равно 1, или a равно 1 и b равно 0; и

(5) c равно 0 и d равно 1; или c равно 1 и d равно 0.

48. Способ модификации целевой нуклеиновой кислоты клетки, включающий в себя:

- предоставление клетки и

- введение в клетку композиции или наличие уже введенной в клетку композиции, составленной для безвирусной доставки, композиции, содержащей:

(a) белок нацеливаемой нуклеазы; и

(b) донорную матрицу-плазмиду, содержащую:

(i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР);

(ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 5' от матрицы МНГР; и

(iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 3' от матрицы МНГР, и

при этом каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД способна расщепляться белком нацеливаемой нуклеазы или комплексом, содержащим белок нацеливаемой нуклеазы.

49. Способ модификации целевой нуклеиновой кислоты клетки, включающий в себя:

- предоставление клетки и

- введение в клетку композиции или наличие уже введенной в клетку композиции, составленной для безвирусной доставки, композиции, содержащей:

(a) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS;

(b) донорную гидовую РНК (гРНК); и

(c) донорную матрицу-плазмиду, содержащую:

(i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР);

(ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 5' от матрицы МНГР; и

(iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 3' от матрицы МНГР, и

при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с прилегающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении 3' от целевых последовательностей ЛСД.

50. Способ модификации целевой геномной последовательности клетки, включающий в себя:

- предоставление клетки и

- введение в клетку композиции или наличие уже введенной в клетку композиции, составленной для безвирусной доставки, композиции, содержащей:

(a) РНК-направляемую нуклеазу CRISPR-CAS;

(b) донорную гидовую РНК (гРНК); и

(c) донорную матрицу-плазмиду, содержащую:

(i) матрицу направляемой гомологией репарации (МНГР), содержащую нуклеиновую кислоту для вставки, фланкированную гомологичными плечами;

(ii) первую целевую последовательность линейаризации совместной доставки (ЛСД), при этом первая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 5' от матрицы МНГР; и

(iii) вторую целевую последовательность ЛСД, при этом вторая целевая последовательность ЛСД функционально связана в направлении 3' от матрицы МНГР, и

при этом: (1) донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны каждой из первой и второй целевых последовательностей ЛСД, и (2) каждая из первой и второй целевых последовательностей ЛСД функционально связана с прилегающим к протоспейсеру мотивом (ППМ), состоящим из 3 пар оснований, расположенным в направлении 3' от целевых последовательностей ЛСД

при этом донорная гРНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые комплементарны целевой геномной последовательности клетки, и

при этом гомологичные плечи комплементарны последовательностям нуклеиновых кислот, фланкирующим целевую геномную последовательность клетки, при этом нуклеиновая кислота для вставки получена с возможностью вставки в целевую геномную последовательность клетки.

51. Способ по любому из пп. 48-50, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой клетку человека.

52. Способ по любому из пп. 48-51, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой иммунокомпетентную клетку.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что указанная иммунокомпетентная клетка представляет собой Т-клетку.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что указанная Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку.

55. Способ по любому из пп. 48-54, отличающийся тем, что введение указанной композиции, составленной для безвирусной доставки, включает в себя электропорацию.

56. Способ по любому из пп. 48-55, отличающийся тем, что количество указанной донорной матрицы составляет по меньшей мере около 80, 10-120, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 100, 110 или 120 мкг.

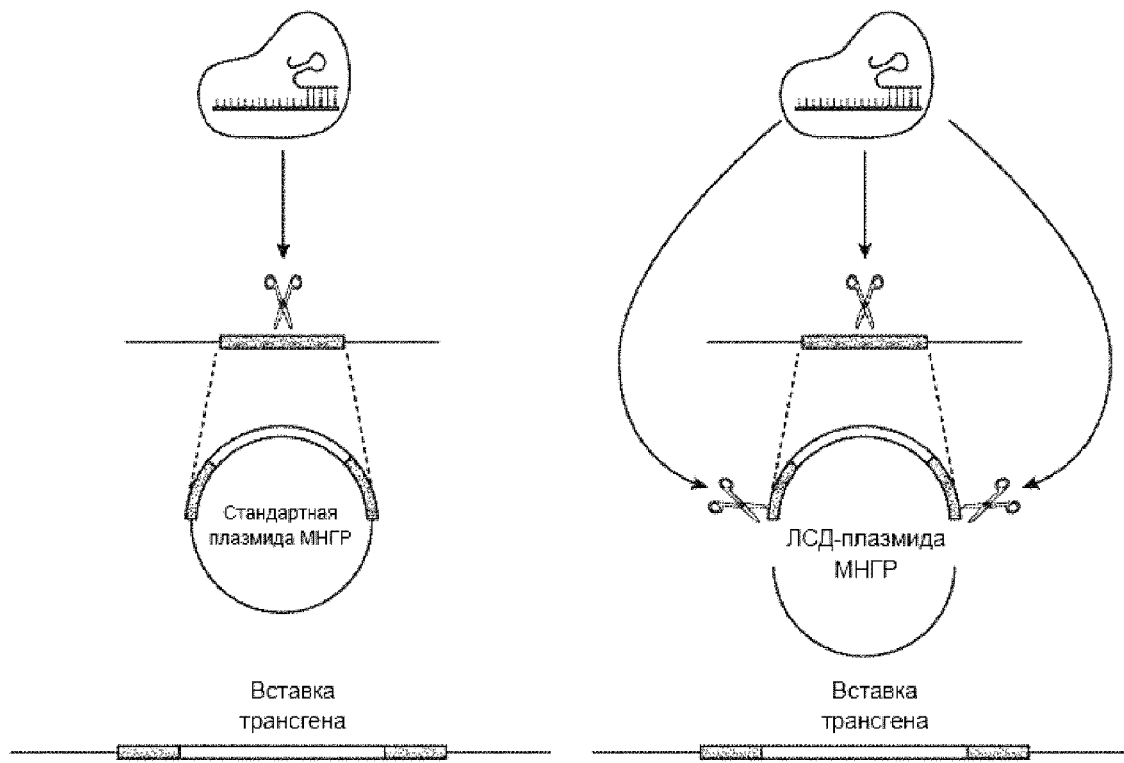
57. Способ по любому из пп. 55, отличающийся тем, что число указанных клеток для отдельной реакции электропорации составляет по меньшей мере около 5, 1-10, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 или 10×10^7 .

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что общее число указанных предоставляемых клеток составляет по меньшей мере больше чем 10×10^7 , и выполняется больше чем одна реакция электропорации.

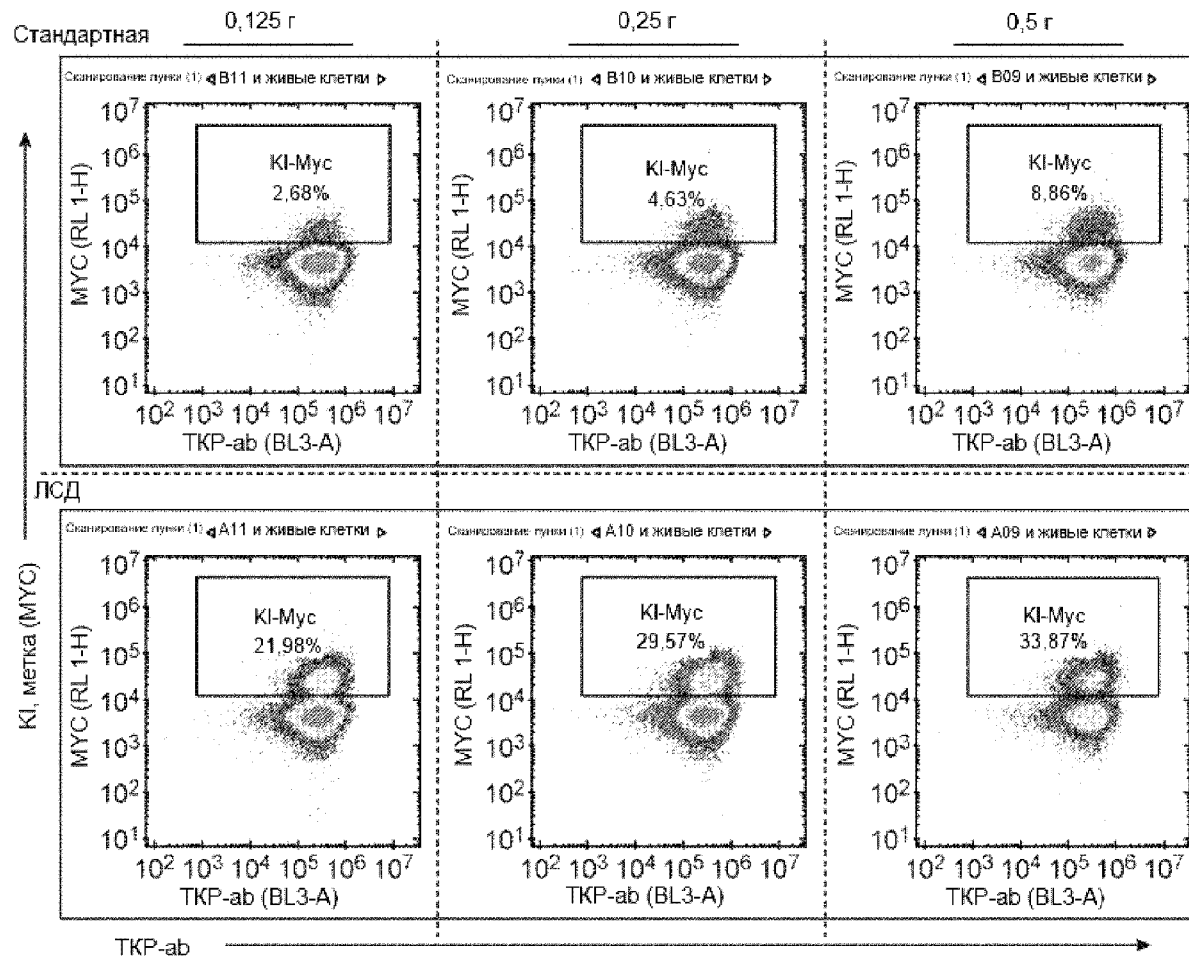
59. Способ по любому из пп. 48-58, отличающийся тем, что общий указанный объем суспензии клеток составляет около 1 мл.

60. Способ по любому из пп. 48-59, отличающийся тем, что указанный способ приводит к повышенной вставке матрицы в целевую геномную последовательность клеток по сравнению с идентичной в остальном контрольной композицией, но не содержащей целевые последовательности ЛСД, необязательно при этом вставка матрицы повышается в по меньшей мере около 1-5, 1, 2, 3, 4 или 5 раз по сравнению с контролем.

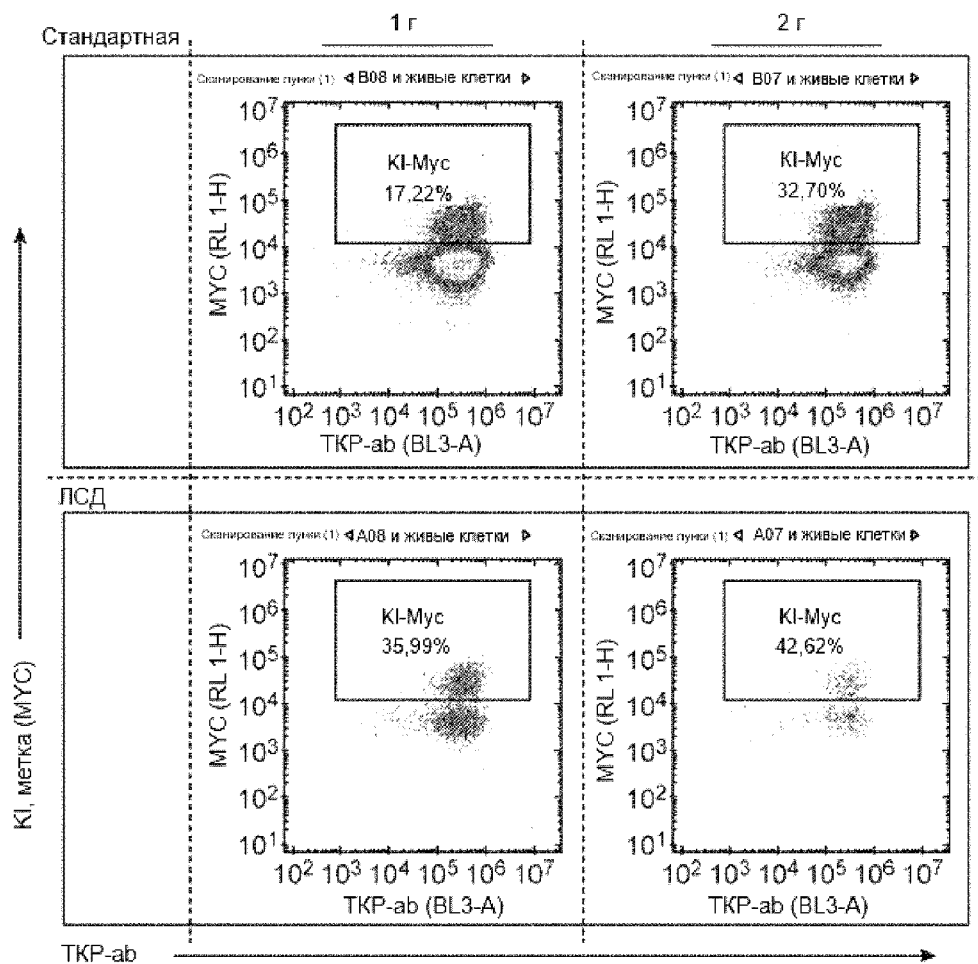
По доверенности



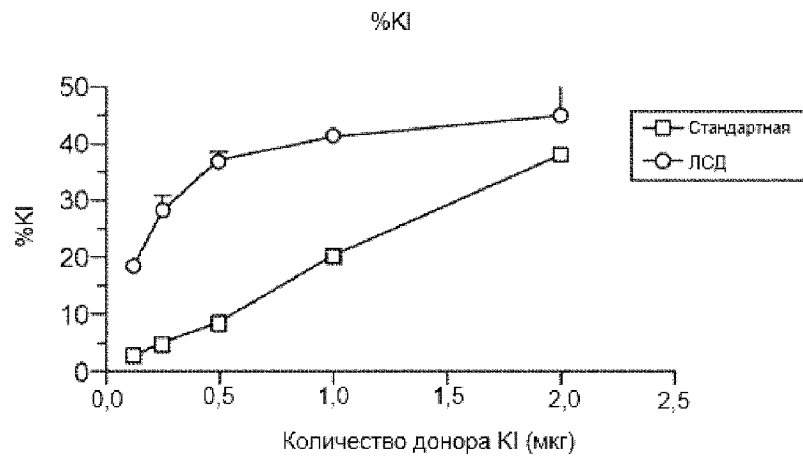
Фиг. 1



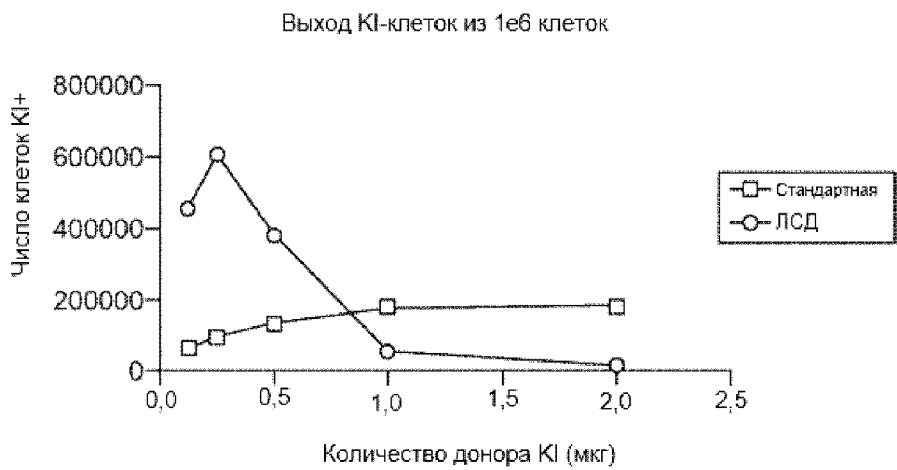
Фиг. 2А



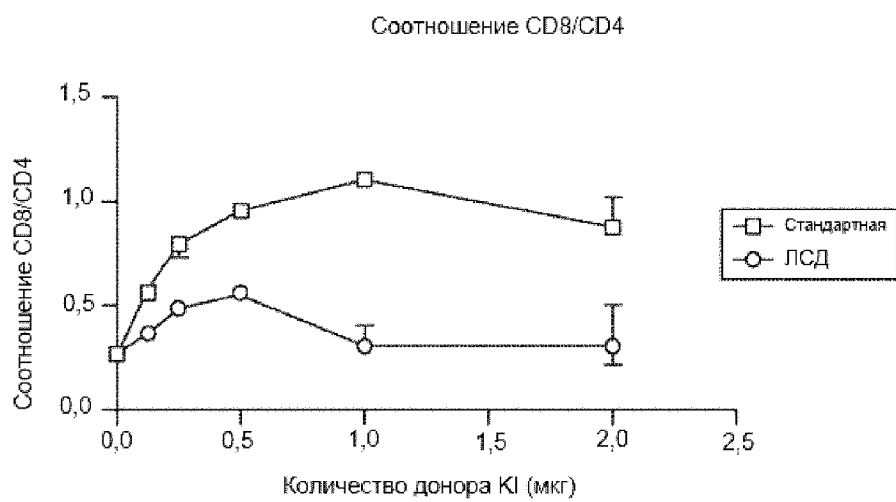
Фиг. 2А
(продолжение)



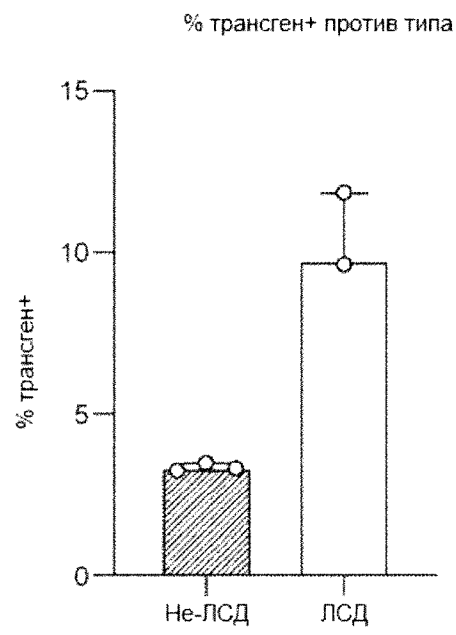
Фиг. 2В



Фиг. 2С



ФИГ. 3



Фиг. 4