

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391822 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.11

(51) Int. Cl. C12N 5/0783 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.12.22

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НЛА-А В КЛЕТКЕ

(31) 63/130,095; 63/250,996; 63/254,970;  
63/288,492

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

(32) 2020.12.23; 2021.09.30; 2021.10.12;  
2021.12.10

(72) Изобретатель:  
Гоел Сурбхи, Чжан Юн, Лескарбо  
Рейнальд Майкл, Мюррей Брэдли  
Эндрю, Сридхар Сридхани (US)

(33) US

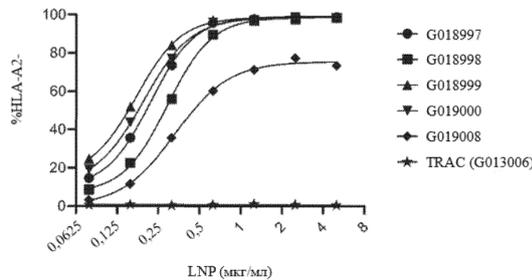
(86) PCT/US2021/064930

(87) WO 2022/140586 2022.06.30

(88) 2022.08.04

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

(57) Композиции и способы снижения экспрессии белка НЛА-А в клетке, включающие генетическую модификацию НЛА-А для применения, например, в терапии на основе адоптивного переноса клеток.



A1

202391822  
778162707

202391822

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578580EA/061

### КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ HLA-A В КЛЕТКЕ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет в соответствии с 35 U.S.C. 119(e) предварительной заявки США № 63/130 095, поданной 23 декабря 2020 года, предварительной заявки США № 63/250 996, поданной 30 сентября 2021 года, предварительной заявки США № 63/254 970, поданной 12 октября 2021 года, и предварительной заявки США № 63/288 492, поданной 10 декабря 2021 года; при этом каждая из этих заявок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0002] Настоящая заявка подается совместно с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием «2021-12-20\_01155-0036-00PCT\_Seq\_List\_ST25.txt», созданного 20 декабря 2021 г. и имеющего размер 320 511 байт. Информация в электронном формате перечня последовательностей в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

### ВВЕДЕНИЕ И КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Способность подавлять МНС класса I имеет решающее значение для многих применений *in vivo* и *ex vivo*, например, при применении аллогенных клеток (полученных от донора) для трансплантации и/или, например, для создания клеточной популяции *in vitro*, которая не активирует Т-клетки. В частности, перенос аллогенных клеток субъекту представляет большой интерес в области клеточной терапии. Применение аллогенных клеток было ограничено из-за проблемы отторжения иммунными клетками реципиента, которые распознают трансплантированные клетки как чужеродные и атакуют их. Во избежание проблемы иммунного отторжения, разработчики клеточной терапии сосредоточились на аутологичных подходах, которые используют собственные клетки субъекта в качестве источника клеток для терапии, что требует много времени и средств.

[0004] Как правило, иммунное отторжение аллогенных клеток является результатом несоответствия молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) между донором и реципиентом. В человеческой популяции молекулы МНС существуют в различных формах, включая, например, многочисленные генетические варианты любого заданного гена МНС, т. е. аллели, кодирующие различные формы белка МНС. Основные классы молекул МНС называются МНС класса I и МНС класса II. Молекулы МНС класса I (например, HLA-A, HLA-B и HLA-C у человека) экспрессируются на всех ядерных клетках и представляют антигены для активации цитотоксических Т-клеток (CD8+ Т-клеток или CTL). Молекулы МНС класса II (например, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR у человека) экспрессируются только на определенных типах клеток (например, В-клетках, дендритных клетках и макрофагах) и представляют антигены для активации хелперных Т-клеток (CD4+ Т-клеток или Th-клеток), которые, в свою очередь, передают сигналы В-клеткам для выработки антител.

[0005] Незначительные различия, *например*, несовпадение аллелей МНС между индивидуумами, могут вызвать активацию Т-клеток у реципиента. Во время развития Т-

клеток, репертуар Т-клеток индивидуума толерантен к собственным молекулам МНС, но Т-клетки, которые распознают молекулы МНС другого индивидуума, могут сохраняться в кровотоке и называются аллореактивными Т-клетками. Аллореактивные Т-клетки могут активироваться, *например*, при наличии в организме клеток другого индивидуума, экспрессирующих молекулы МНС, вызывая, *например*, болезнь «трансплантат против хозяина» и отторжение трансплантата.

[0006] Хотя полное совпадение типов HLA между донором и реципиентом теоретически возможно как средство уменьшения отторжения трансплантата, такой подход технически и практически сложен, учитывая разнообразие аллелей HLA в популяции для полного совпадения, *например*, 10 из 10 аллелей (*т. е.* 2 аллели для каждого из HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 и HLA-DQB1).

[0007] Представляют интерес способы и композиции для снижения чувствительности аллогенной клетки к отторжению, включая, *например*, снижение экспрессии белка МНС клеткой во избежание реакции Т-клеток реципиента. На практике возможность генетически модифицировать аллогенную клетку для трансплантации в организм была ограничена необходимостью проводить множество редактирований генов, чтобы снизить экспрессию всех белков МНС, и в то же время избежать других нежелательных иммунных реакций реципиента. Например, хотя стратегии деплетирования белка МНС класса I могут снизить активацию CTL, клетки, которые не имеют МНС класса I на своей поверхности, подвержены лизису клетками-натуральными киллерами (NK) иммунной системы, поскольку активация NK-клеток регулируется ингибиторными рецепторами, специфичными для МНС класса I. Таким образом, безопасное снижение или устранение экспрессии МНС класса I оказалось сложной задачей.

[0008] Стратегии редактирования генов для деплетирования молекул МНС класса II также оказались сложными, особенно в определенных типах клеток, по причинам, включающих низкую эффективность редактирования и низкую выживаемость клеток, что препятствует их практическому применению в качестве клеточной терапии.

[0009] Таким образом, существует потребность в усовершенствованных способах и композициях для модификации аллогенных клеток, чтобы преодолеть проблему иммунного отторжения реципиента и технические трудности, связанные с множественными генетическими модификациями, необходимыми для получения более безопасной клетки для трансплантации.

[0010] В настоящем изобретении предложены сконструированные человеческие клетки со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. Сконструированные человеческие клетки, описанные в настоящем документе, предлагают подход «частичного совпадения» к проблеме аллогенной клеточной передачи и совместимости МНС класса I. Использование клеток, которые являются гомозиготными по HLA-B и HLA-C, в дополнение к снижению или

устранению экспрессии HLA-A в клетках, ограничивает количество доноров, необходимых для обеспечения терапии, которая охватывает большинство реципиентов в популяции, поскольку описанный подход частичного совпадения требует только одного совпадающего аллеля HLA-B (вместо двух) и только одного аллеля HLA-C (вместо двух). Неожиданно было обнаружено, что сконструированные клетки человека, у которых снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, описанные в настоящем документе, демонстрируют персистенцию и защищают от NK-опосредованного отторжения, особенно по сравнению со сконструированными клетками со сниженной или устраненной экспрессией B2M. В настоящем изобретении предложены способы и композиции для получения таких сконструированных человеческих клеток со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены сконструированные человеческие клетки, а также способы и композиции для получения сконструированных человеческих клеток, при этом указанная клетка имеет сниженную экспрессию белка MHC класса II на своей поверхности, например, при этом указанная клетка имеет генетическую модификацию в гене СИТА. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена дальнейшая инженерия клетки, включающая снижение или устранение экспрессии эндогенных белков Т-клеточного рецептора (*например*, TRAC, TRBC), и введение экзогенной нуклеиновой кислоты, например, кодирующей полипептид, экспрессируемый на поверхности клетки, или полипептид, который секретируется клеткой. Таким образом, в настоящем изобретении предложена гибкая платформа для генной инженерии клеток человека для различных желаемых целей адоптивной клеточной терапии.

[0011] В настоящем изобретении предлагается предложена сконструированная человеческая клетка, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. Также предложена сконструированная человеческая клетка, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854-chr6:29942913 и chr6:29943518-chr6: 29943619, при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[0012] В настоящем изобретении предложена сконструированная человеческая клетка, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один

нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046.

[0013] В настоящем изобретении предложена сконструированная человеческая клетка, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация содержит индел, замену С на Т, или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046.

[0014] В настоящем изобретении предложен способ получения сконструированной человеческой клетки, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, включающий приведение в контакт клетки с композицией, содержащей: (а) РНК, направленную на HLA-A, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211; или (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или (iii) направляющую последовательность, которая на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или (iv) направляющую последовательность, которая связывает целевой сайт, содержащий геномную область из Таблиц 2-5; или (v) направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам геномной области из Таблиц 1-2 и 5, или направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам геномной области из Таблицы 4; или (vi) направляющую последовательность, которая на 95%, 90% или 85% идентична последовательности из (v); и необязательно (b) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0015] В настоящем изобретении предложен способ снижения поверхностной экспрессии белка HLA-A в клетке человека по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей: (а) РНК, направленную на HLA-A, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211; или (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или (iii) направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную

последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или (iv) направляющую последовательность, которая связывает целевой сайт, содержащий геномную область из Таблиц 2-5; или (v) направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам геномной области из Таблиц 1-2 и 5, или направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам геномной области из Таблицы 4; или (vi) направляющую последовательность, которая на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из (v); и необязательно (b) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0016] В настоящем изобретении предложен способ введения сконструированной клетки нуждающемуся в этом субъекту-реципиенту, включающий: (a) определение аллелей HLA-B и HLA-C субъекта-реципиента; (b) выбор сконструированной клетки или клеточной популяции по любому из предыдущих вариантов осуществления настоящего изобретения или сконструированной клетки или клеточной популяции, полученной способом по любому из предыдущих вариантов осуществления настоящего изобретения, при этом указанная сконструированная клетка содержит по меньшей мере один из тех же аллелей HLA-B или HLA-C, что и субъект-реципиент; (c) введение выбранной сконструированной клетки субъекту-реципиенту.

[0017] Дополнительные варианты осуществления предлагаются повсюду и описаны в формуле изобретения и на Фигурах.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0018] ФИГ. 1А и 1В демонстрируют процент активированных Т-клеток, отрицательных в отношении HLA-A2, по данным проточной цитометрии. ФИГ. 1А демонстрирует данные для направляющих (G018997, G018998, G018999, G019000, G019008, G013006). ФИГ. 1В демонстрирует данные для направляющих (G018091, G018933, G018935, G018954, G018995, G018996).

[0019] ФИГ. 2 демонстрирует устойчивость к НК-опосредованному уничтожению Т-клеток с нокаутом HLA-A (HLA-B/C совпадение) по сравнению с Т-клетками с нокаутом В2М, необязательно включая экзогенную конструкцию HLA-E, в процентах лизиса Т-клеток. Сравниваются клетки с нокаутом HLA-A, с двойным нокаутом HLA-A и СПТА, с нокаутом В2М, В2М+HLA-E и дикого типа.

[0020] ФИГ. 3А-Ф демонстрируют результаты последовательного редактирования в CD8+ Т-клетках. ФИГ. 3А демонстрирует процент HLA-A положительных клеток. ФИГ. 3В демонстрирует процент положительных клеток МНС класса II. ФИГ. 3С демонстрирует процент WT1 TCR положительных CD3+, Vb8+ клеток. ФИГ. 3D демонстрирует процент клеток, отображающих неправильно спаренные TCR. ФИГ. 3Е демонстрирует процент CD3+, vb8- клеток, отображающих только эндогенные TCR. ФИГ. 3F демонстрирует процент CD3+, Vb8+ клеток, положительных относительно TCR WT1 и отрицательных относительно HLA-A и МНС класса II.

[0021] ФИГ. 4А-Ф демонстрируют результаты последовательного редактирования в CD4+ Т-клетках. ФИГ. 4А демонстрирует процент HLA-A положительных клеток. ФИГ. 4В демонстрирует процент положительных клеток MHC класса II. ФИГ. 4С демонстрирует процент WT1 TCR положительных CD3+, Vb8+ клеток. ФИГ. 4D демонстрирует процент клеток, отображающих неправильно спаренные TCR. ФИГ. 4Е демонстрирует процент CD3+, vb8- клеток, отображающих только эндогенные TCR. ФИГ. 4F демонстрирует процент CD3+, Vb8+ клеток, положительных относительно WT1 TCR и отрицательных относительно HLA-A и MHC класса II.

[0022] ФИГ. 5А-D демонстрируют процент инделов после последовательного редактирования Т-клеток для СПТА (ФИГ. 5А), HLA-A (ФИГ. 5В), TRBC1 (ФИГ. 5С) и TRBC2 (ФИГ. 5D) в Т-клетках.

[0023] ФИГ. 6А-В демонстрируют экспрессию люциферазы из В2М, СПТА, HLA-A или Т-клеток человека с двойным (HLA-A, СПТА) нокаутом, введенных мышам, инокулированным клетками-натуральными киллерами человека. ФИГ. 6А демонстрирует излучение (фотоны/с/см<sup>2</sup>/sr) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различные моменты времени после инъекции. ФИГ. 6В демонстрирует излучение (фотоны/с/см<sup>2</sup>/sr) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различных группах мышей на 27-й день.

[0024] ФИГ. 7А-В демонстрируют экспрессию люциферазы из Т-клеток человека, нокаутированных по В2М и AlloWT1, которые вводили мышам, инокулированным клетками-натуральными киллерами человека. ФИГ. 7А демонстрирует общий поток (p/s) от Т-клеток, экспрессирующих люциферазу, присутствующих в различные моменты времени после введения. ФИГ. 7В демонстрирует общий поток (p/s) от Т-клеток, экспрессирующих люциферазу, присутствующих в различных группах мышей через 31 день.

[0025] ФИГ. 8А-В демонстрируют процент нормализованной пролиферации CD4 (ФИГ. 8А) или CD8 Т-клеток хозяина (ФИГ. 8В), запускаемой сконструированными аутологичными или аллогенными Т-клетками с двойным нокаутом HLA класса I+HLA класса II, или двойным нокаутом HLA-A и HLA класса II.

[0026] ФИГ. 9А-Ф демонстрируют панель процентного содержания CD8+ (ФИГ. 9А), эндогенного TCR+ (ФИГ. 9В), TCR+ WT1 (ФИГ. 9С), клеток с нокаутом HLA-A2 (ФИГ. 9D), нокаутом HLA-DRDPDQ (ФИГ. 9Е) и % Allo WT1 (ФИГ. 9F).

[0027] ФИГ. 10 демонстрирует общий поток (p/s) экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различные моменты времени после введения вплоть до 18 дней.

[0028] ФИГ. 11А-11В соответственно демонстрируют выделение IFN-γ и IL-2 в супернатантах из анализа уничтожения, содержащего совместную культуру сконструированных Т-клеток из групп Allo-WT1, Auto-WT1, TCR KO, и дикого типа (WT) с целевыми опухолевыми клетками.

[0029] ФИГ. 12А-12В демонстрируют показатели редактирования СПТА, HLA-A,

TRAC и TRBC и вставки WT1 TCR в CD8<sup>+</sup> Т-клетках в трех условиях. Процент клеток, экспрессирующих соответствующие белки клеточной поверхности после последовательной инженерии Т-клеток, продемонстрирован на ФИГ. 12А для CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Процент Т-клеток со всеми предполагаемыми редактированиями (вставка WT1-TCR в сочетании с нокаутом HLA-A и СИТА) продемонстрирован на ФИГ. 12В.

[0030] ФИГ. 13 демонстрирует процент лизиса Т-клеток, являющихся мишенями для NK-клеток, при различных соотношениях «эффектор:мишень (Е:Т)», обработанных sgРНК и редактором оснований, а также mРНК UGI.

[0031] ФИГ. 14 демонстрирует средний процент CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые являются отрицательными в отношении поверхностных рецепторов HLA-A после обработки sgРНК в 100-мерном или 91-мерном форматах, нацеленных на HLA-A.

[0032] ФИГ. 15А-15С соответственно демонстрируют корреляцию редактирования гена HLA-A с нокаутом белка у Доноров А-С.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0033] В настоящем изобретении предложены сконструированные человеческие клетки, а также способы и композиции для генетической модификации клеток человека с целью получения сконструированных человеческих клеток, которые можно применять, например, для терапии методом адоптивного переноса клеток (АСТ). В настоящем изобретении предложены сконструированные человеческие клетки со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. Таким образом, сконструированные человеческие клетки, описанные в настоящем документе, обеспечивают подход «частичного совпадения» для решения проблем, ассоциированных с аллогенным переносом клеток.

[0034] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены сконструированные клетки человека со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией HLA-A в результате генетической модификации гена HLA-A, при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены композиции и способы для снижения или устранения экспрессии белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, а также композиции и способы для снижения восприимчивости клетки к иммунному отторжению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки человека со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой не подвержены лизису NK-клетками, что является проблемой, наблюдаемой при применении других подходов, которые снижают или устраняют экспрессию белка MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы и композиции включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка HLA-A путем генетической модификации HLA-A с помощью системы редактирования генов и вставки экзогенной нуклеиновой

кислоты, кодирующей нацеливающий рецептор или другой полипептид (экспрессируемый на клеточной поверхности или секретлируемый), в клетку путем генетической модификации. Сконструированные клеточные композиции, полученные способами, описанными в настоящем документе, обладают желаемыми свойствами, включая, *например*, пониженную экспрессию HLA-A, пониженную иммуногенность *in vitro* и *in vivo*, повышенную выживаемость и повышенную генетическую совместимость с более крупными субъектами для трансплантации.

[0035] Термин «около» или «приблизительно» означает приемлемую ошибку для конкретного значения, определенную специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как значение измеряется или определяется, или степень вариации, которая существенно не влияет на свойства описываемого предмета или в пределах допусков, принятых в данной области техники, *например*, в пределах 10%, 5%, 2% или 1%. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в последующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными и могут варьироваться в зависимости от необходимых свойств, которые стремятся получить. Как минимум, что не стоит трактовать как попытку ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр необходимо, по меньшей мере, толковать с учетом числа приведенных значимых цифр и путем применения обычных методов округления.

#### Определения

[0036] Если не указано иное, следующие термины и фразы, применяемые в настоящем документе, имеют следующие значения:

[0037] В контексте данного документа термин «или их комбинации» относится ко всем перестановкам и комбинациям перечисленных терминов, предшествующих этому термину. Например, «А, В, С или их комбинации» включает по меньшей мере один из: А, В, С, АВ, АС, ВС или АВС, и, если порядок важен в конкретном контексте, также ВА, СА, СВ, АСВ, СВА, ВСА, ВАС или САВ. Продолжая этот пример, явно включены комбинации, которые содержат повторы одного или большего количества элементов или терминов, таких как ВВ, ААА, ААВ, ВВС, СВВА, САВА и так далее. Специалисту в данной области техники будет понятно, что обычно количество элементов или терминов в любой комбинации не ограничено, если иное не очевидно из контекста.

[0038] В контексте данного документа термин «набор» относится к упакованному набору связанных компонентов, таких как один или большее количество полинуклеотидов или композиций, и один или большее количество связанных материалов, таких как устройства для доставки (например, шприцы), растворители, растворы, буферы, инструкции, или осушители.

[0039] В контексте данного документа термин «аллогенная» клетка, относится к клетке, происходящей от субъекта-донора того же вида, что и субъект-реципиент, при этом субъект-донор и субъект-реципиент имеют генетические различия, *например*, гены в одном или большем количестве локусов, которые не идентичны. Таким образом,

*например*, клетка является аллогенной по отношению к субъекту, которому эту клетку вводят. В контексте данного документа клетка, которая извлечена или выделена от донора, которая не будет повторно введена исходному донору, считается аллогенной клеткой.

[0040] В контексте данного документа термин «аутологичная» клетка относится к клетке, полученной от того же субъекта, которому позднее будет повторно введен материал. Таким образом, *например*, клетка считается аутологичной, если ее извлекают из субъекта, а затем повторно вводят тому же субъекту.

[0041] В контексте данного документа термин «β2М» или «B2M» относится к последовательности нуклеиновой кислоты или белковой последовательности «β-2 микроглобулина»; ген человека имеет инвентарный номер NC\_000015 (диапазон 44711492..44718877), ссылка GRCh38.p13. Белок B2M связан с молекулами МНС класса I в виде гетеродимера на поверхности ядерных клеток и необходим для экспрессии белка МНС класса I.

[0042] В контексте данного документа термин «СПТА», или «СПТА», или «С2ТА» относится к последовательности нуклеиновой кислоты или белковой последовательности «трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II»; ген человека имеет инвентарный номер NC\_000016.10 (диапазон 10866208..10941562), ссылка GRCh38.p13. Белок СПТА в ядре действует как положительный регулятор транскрипции гена МНС класса II и необходим для экспрессии белка МНС класса II.

[0043] В контексте данного документа термин «МНС» или «молекула(ы) МНС», или «белок МНС», или «комплекс(ы) МНС» относится к молекуле главного комплекса гистосовместимости (или во множественном числе) и включает, *например*, молекулы МНС класса I и МНС класса II. У человека молекулы МНС называются комплексами «человеческий лейкоцитарный антиген», или «молекулами HLA», или «белком HLA». Применение терминов «МНС» и «HLA» не предназначено для ограничения; в контексте данного документа термин «МНС» может применяться для обозначения молекул МНС человека, *т.е.* молекул HLA. Таким образом, термины «МНС» и «HLA» применяются в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0044] В данном документа термин «HLA-A», в контексте белка HLA-A, относится к молекуле белка МНС класса I, которая представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи (кодируемой геном HLA-A) и легкой цепи (*например*, бета-2-микроглобулин). В данном документа термин «HLA-A» или «ген HLA-A», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-A. Ген HLA-A также называют «гистосовместимостью HLA класса I, альфа-цепью»; ген человека имеет инвентарный номер NC\_000006.12 (29942532..29945870). Известно, что ген HLA-A имеет тысячи различных генотипических версий гена HLA-A в популяции (и индивидуум может получить два разных аллеля гена HLA-A). Доступ к общедоступной базе данных аллелей HLA-A, включая информацию о последовательности, можно получить по адресу IPD-IMGT/HLA: [www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/](http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/). Все аллели HLA-A

охватываются терминами «HLA-A» и «ген HLA-A».

[0045] В данном документе термин «HLA-B», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-B. HLA-B также называют «гистосовместимостью HLA класса I, альфа-цепью»; ген человека имеет инвентарный номер NC\_000006.12 (31353875..31357179).

[0046] В данном документе термин «HLA-C», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-C. HLA-C также называют «гистосовместимостью HLA класса I, С альфа-цепью»; ген человека имеет инвентарный номер NC\_000006.12 (31268749..31272092).

[0047] В контексте данного документа термин «в пределах геномных координат» включает границы заданного диапазона геномных координат. Например, если указано chr6:29942854- chr6:29942913, охватываются координаты chr6:29942854-chr6:29942913. В настоящей заявке геномные координаты, на которые делается ссылка, основаны на геномных аннотациях в сборке генома человека GRCh38 (также называемого hg38) от Консорциума справочных материалов по геномам, доступных на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации. Инструменты и способы преобразования геномных координат между одной сборкой и другой известны в данной области техники и могут быть применены для преобразования предложенных в настоящем изобретении геномных координат в соответствующие координаты в другой сборке генома человека, включая преобразование в более раннюю сборку, сгенерированную тем же учреждением или с применением того же алгоритма (например, из GRCh38 в GRCh37), и преобразование сборки, созданной другим учреждением или алгоритмом (например, из GRCh38 в NCBI33, сгенерированный Международным консорциумом по секвенированию генома человека). Доступные способы и инструменты, известные в данной области техники, включают в себя, помимо прочего, Службу рекартирования генома NCBI, доступную на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации, UCSC LiftOver, доступную на веб-сайте UCSC Genome Browser, и Преобразователь сборки (Assembly Converter), доступную на веб-сайте Ensembl.org.

[0048] В контексте данного документа термин «гомозиготный» относится к наличию двух идентичных аллелей определенного гена.

[0049] В контексте данного документа термин «аллель» HLA может относиться к названному гену HLA-A, HLA-B или HLA-C, при этом указаны первые четыре цифры (или первые два набора цифр, разделенные двоеточием, например, HLA-A\***02:101**:01:02N, где первые два набора цифр выделены жирным шрифтом и курсивом) имени, следующего за «HLA-A», «HLA-B» или «HLA-C». Как известно в данной области техники, первые четыре цифры (или первые два набора цифр, разделенные двоеточием) определяют белок аллеля. Например, HLA-A\*02:01 и HLA-A\*01:02 являются разными аллелями HLA-A. Существуют дополнительные генотипы каждого аллеля, такие как, например, HLA-A\*02:01:02:01. Дополнительные генотипы данного аллеля считаются идентичными аллелями, например, HLA-A\*02:01:02:01 и HLA-A\*02:01 являются

идентичными аллелями. Таким образом, аллели HLA являются гомозиготными, когда аллели идентичны (т. е. когда аллели имеют одинаковые первые четыре цифры или одинаковые первые два набора цифр, разделенных двоеточием).

[0050] «Совпадение» или «совпадающие» относится к общим аллелям между донором и реципиентом, например, к идентичным аллелям.

[0051] В контексте данного документа термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» применяются для обозначения мультимерного соединения, включающего нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, которые имеют азотсодержащие гетероциклические основания или аналоги оснований, связанные друг с другом вдоль остова, включая обычные РНК, ДНК, смешанные РНК-ДНК и полимеры, которые являются их аналогами. «Остов» нуклеиновой кислоты может состоять из различных связей, включая одну или большее количество связей «сахар-фосфодиэфир», связей «пептид-нуклеиновая кислота» («пептидные нуклеиновые кислоты» или PNA; РСТ № WO 95/32305), фосфоротиоатных связей, метилфосфонатных связей или их комбинации. Фрагменты сахара нуклеиновой кислоты могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или аналогичные соединения с заменами, например, 2'-метокси- или 2'-галогенидными заменами. Азотистые основания могут представлять собой обычные основания (A, G, C, T, U), их аналоги (например, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин или N1-метилпсевдоуридин или другие); инозин; производные пуринов или пиримидинов (например, N<sup>4</sup>-метилдезоксигуанозин, деаза- или аза-пурины, деаза- или аза-пиримидины, пиримидиновые основания с замещающими группами в положении 5 или 6 (например, 5-метилцитозин), пуриновые основания с замещающими группами в положениях 2, 6 или 8, 2-амино-6-метиламинопурин, O<sup>6</sup>-метилгуанин, 4-тиопиримидины, 4-аминопиримидины, 4-диметилгидразин-пиримидины и O<sup>4</sup>-алкилпиримидины; патент США № 5 378 825 и РСТ № WO 93/13121). Для общего обсуждения см. *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., ed., 11<sup>th</sup> ed., 1992). Нуклеиновые кислоты могут включать один или большее количество «безосновных» остатков, в которых остов не включает азотистое основание для положения(ий) полимера (патент США № 5 585 481). Нуклеиновая кислота может содержать только обычные сахара РНК или ДНК, основания и связи или может включать как обычные компоненты, так и замены (например, обычные основания с 2'-метоксисвязями или полимеры, содержащие как обычные основания, так и один или большее количество аналогов оснований). Нуклеиновая кислота включает «замкнутую нуклеиновую кислоту» (LNA), аналог, содержащий один или большее количество нуклеотидных мономеров LNA с бициклической фуранозной единицей, замкнутой в конформации РНК, имитирующей сахар, что повышает аффинность к гибридизации с комплементарными последовательностями РНК и ДНК (Vester and Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). РНК и ДНК имеют разные фрагменты сахара и могут различаться наличием урацила или его аналогов в РНК и тимина или его аналогов в ДНК.

[0052] В контексте данного документа термины «направляющая РНК», «gРНК» и просто «направляющая» применяются взаимозаменяемо для обозначения, например,

направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой ДНК и может представлять собой одиночную направляющую РНК или комбинацию crРНК и trРНК (также известную как tracrRNA). Примеры gРНК включают РНК, направляющие нуклеазы Cas класса II в модифицированной или немодифицированной формах. crРНК и trРНК могут быть связаны в виде одиночной молекулы РНК (одиночная направляющая РНК, sgРНК) или в виде двух отдельных цепей РНК (двойная направляющая РНК, dgРНК). Термин «направляющая РНК» или «gРНК» относится к каждому типу. trRNA может быть природной последовательностью или последовательностью trRNA с модификациями или вариациями по сравнению с природными последовательностями.

[0053] В контексте данного документа термин «направляющая последовательность» относится к последовательности в направляющей РНК, которая является комплементарной целевой последовательности и функционирует для направления направляющей РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (например, расщепления) РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. «Направляющая последовательность» также может называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Направляющая последовательность может иметь длину 20 пар оснований, например в случае *Streptococcus pyogenes* (*m.e. Spy Cas9* (SpCas9)) и родственных гомологов/ортологов Cas9. Более короткие или более длинные последовательности также могут быть применены в качестве направляющих, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность находится в гене или на хромосоме, например, и является комплементарной направляющей последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, направляющая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несовпадений, причем направляющая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем направляющая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

[0054] Целевые последовательности для РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (*m.e.* данная последовательность и обратный комплемент целевой последовательности), при этом в качестве субстрата нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента применяется двухцепочечная нуклеиновая кислота. Соответственно, когда говорят, что направляющая последовательность является «комплементарной целевой последовательности», следует понимать, что направляющая последовательность может направлять направляющую РНК для связывания с обратным комплементом целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых направляющая последовательность связывает обратный комплемент целевой последовательности, целевая последовательность идентична некоторым нуклеотидам целевой последовательности (например, целевой последовательности, не содержащей РАМ), за исключением замены U на T в направляющей последовательности.

[0055] В контексте данного документа термин «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью связывания РНК и ДНК, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, при этом ДНК-связывающая активность является специфичной для последовательности и зависит от последовательности РНК. Типовые РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты включают Cas-клевазы/никазы и их инактивированные формы (dCas ДНК-связывающие агенты). В контексте данного документа термин «Cas нуклеаза», охватывает Cas-клевазы, Cas-никазы и dCas ДНК-связывающие агенты. Cas-клевазы/никазы и dCas ДНК-связывающие агенты включают в себя комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и Cas-нуклеазы класса 2. В контексте данного документа термин «Cas нуклеаза класса 2» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью. Cas-нуклеазы класса 2 включают Cas-клевазы/никазы класса 2 (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают РНК-направляемой клевазной или никазной активностью в отношении ДНК, и dCas ДНК-связывающие агенты класса 2, в которых активность клевазы/никазы инактивирована. Cas-нуклеазы класса 2 включают, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (например, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), является гомологичным Cas9 и содержит RuvC-подобный нуклеазный домен. Последовательности Cpf1 из Zetsche включены посредством ссылки в полном объеме. См., например, Zetsche, Таблицы S1 и S3. См., например, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015).

[0056] В контексте данного документа термин «редактор» относится к агенту,

содержащему полипептид, способный производить модификацию в последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор представляет собой кливазу, такую как Cas9 кливаза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор способен дезаминировать основание в молекуле ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор способен дезаминировать цитозин (С) в ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор представляет собой слитый белок, содержащий РНК-направляемую нуклеазу, слитую с цитидиндеаминазой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор представляет собой слитый белок, содержащий РНК-направляемую нуклеазу, слитую с деаминазой АРОВЕС3А (А3А). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор содержит Cas9 нуклеазу, слитую с деаминазой АРОВЕС3А (А3А). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор представляет собой слитый белок, содержащий РНК-направляемую нуклеазу, слитую с цитидиндеаминазой и UGI. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в редакторе отсутствует UGI.

[0057] В контексте данного документа термин «цитидиндеаминаза» означает полипептид или комплекс полипептидов, которые способны проявлять активность цитидиндеаминазы, которая катализирует гидролитическое дезаминирование цитидина или дезоксицитидина, обычно приводящее к образованию уридина или дезоксиуридина. Цитидиндеаминазы охватывают ферменты суперсемейства цитидиндеаминаз и, в частности, ферменты семейства АРОВЕС (подгруппы ферментов АРОВЕС1, АРОВЕС2, АРОВЕС4 и АРОВЕС3), индуцированную активацией цитидиндеаминазу (AID или AICDA) и деаминазы СМР (см., например, Conticello et al., Mol. Biol. Evol. 22:367-77, 2005; Conticello, Genome Biol. 9:229, 2008; Muramatsu et al., J. Biol. Chem. 274: 18470-6, 1999); Carrington et al., Cells 9:1690 (2020)).

[0058] В контексте данного документа термин «АРОВЕС3» относится к белку АРОВЕС3, такому как белок АРОВЕС3, экспрессируемый любым из семи генов (А3А-А3Н) локуса АРОВЕС3 человека. АРОВЕС3 может обладать каталитической активностью редактирования ДНК или РНК. Аминокислотная последовательность АРОВЕС3А была описана (идентификатор доступа UniPROT: p31941) и включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белок АРОВЕС3 представляет собой белок АРОВЕС3 человека и/или белок дикого типа. Варианты включают белки, имеющие последовательность, которые отличаются от белка АРОВЕС3 дикого типа одной или несколькими мутациями (т.е. заменами, делециями, вставками), такими как одна или несколько одноточечных замен. Например, можно применять укороченную последовательность АРОВЕС3, т.е. удалением нескольких N-концевых или С-концевых аминокислот, предпочтительно от одной до четырех аминокислот на С-конце последовательности. В контексте данного документа термин «вариант» относится к аллельным вариантам, вариантам сплайсинга и природным или искусственным мутантам, которые гомологичны эталонной последовательности

АРОВЕС3. Вариант является «функциональным» в том смысле, что он проявляет каталитическую активность в редактировании ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения АРОВЕС3 (такой как человеческий АРОВЕС3А) содержит аминокислоту дикого типа в положении 57 (как пронумеровано в последовательности дикого типа). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения АРОВЕС3 (такой как человеческий АРОВЕС3А) содержит аспарагин в аминокислотном положении 57 (как пронумеровано в последовательности дикого типа).

[0059] В контексте данного документа термин «никаза» представляет собой фермент, который создает одноцепочечный разрыв (также известный как «разрез») в двухцепочечной ДНК, т. е. разрезает одну цепь двойной спирали ДНК, но не другую. В контексте данного документа термин «РНК-направляемая ДНК-никаза» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью ДНК-никазы, при этом активность ДНК-никазы является специфичной для последовательности и зависит от последовательности РНК. Типовые РНК-направляемые ДНК-никазы включают Cas никазы. Cas никазы включают никазные формы комплекса Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицы Cas10, Csm1 или Cmr2, каскадный комплекс системы CRISPR I типа, ее субъединицу Cas3 и Cas нуклеазы класса 2. Cas никазы класса 2 включают варианты, в которых инактивирован только один из двух каталитических доменов, которые обладают РНК-направляемой ДНК-никазной активностью. Cas никазы класса 2 включают, например, Cas9 (например, варианты SpyCas9 H840A, D10A или N863A), Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), белки eSPCas9(1.0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (например, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит домен RuvC-подобного белка. Последовательности Cpf1 из Zetsche включены посредством ссылки в полном объеме. См., например, Zetsche, Таблицы S1 и S3. «Cas9» включает *S. pyogenes* (Spy) Cas9, варианты Cas9, перечисленные в настоящем документе, и их эквиваленты. См., например, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015).

[0060] В контексте данного документа термин «слитый белок» относится к гибриднему полипептиду, который содержит белковые домены по меньшей мере из двух разных белков. Один белок может быть расположен на аминоконцевой (N-концевой) части слитого белка или на карбоксиконцевом (C-концевом) белке, образуя таким образом «аминоконцевой слитый белок» или «карбоксиконцевой слитый белок», соответственно. Любой из предложенных в настоящем изобретении белков может быть получен любым способом, известным в данной области техники. Например, предложенные в настоящем документе белки могут быть получены посредством экспрессии и очистки рекомбинантных белков, что особенно подходит для слитых белков, содержащих пептидный линкер. Методы экспрессии и очистки рекомбинантных белков хорошо известны в данной области техники и включают методы, описанные Green и Sambrook,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)), полное содержание которых включено в настоящий документ в посредством ссылки.

[0061] В контексте данного документа термин «линкер», относится к химической группе или молекуле, связывающей две соседние молекулы или фрагменты. Как правило, линкер расположен между двумя группами, молекулами или другими фрагментами или окружен ими и соединен с каждым из них ковалентной связью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер представляет собой аминокислоту или множество аминокислот (например, пептид или белок), такой как линкер «XTEN» из 16 аминокислотных остатков или его вариант (см., например, Примеры; и публикацию Schellenberger et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. Nat. Biotechnol. 27, 1186-1190 (2009)). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер XTEN содержит последовательность SGSETPGTSESATPES (SEQ ID NO: 900), SGSETPGTSESA (SEQ ID NO: 901) или SGSETPGTSESATPEGGSGGS (SEQ ID NO: 902).

[0062] В контексте данного документа термин «ингибитор урацил-гликозилазы» или «UGI» относится к белку, который способен ингибировать фермент репарации исеченных оснований урацил-ДНК-гликозилазы (UDG).

[0063] В контексте данного документа термин «открытая рамка считывания» или «ORF» гена относится к последовательности, состоящей из серии кодонов, которые определяют аминокислотную последовательность белка, кодируемого геном. ORF начинается со стартового кодона (например, ATG в ДНК или AUG в РНК) и заканчивается стоп-кодоном, например, TAA, TAG или TGA в ДНК или UAA, UAG или UGA в РНК.

[0064] В контексте данного документа термин «рибонуклеопротеин» (RNP) или «комплекс RNP» относится к направляющей РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как Cas нуклеаза, например, Cas клеваза, Cas никаза или dCas ДНК-связывающий агент (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9, к целевой последовательности, при этом направляющая РНК гибридизуется с целевой последовательностью, и указанный агент связывается с ней; в случаях, когда указанный агент представляет собой клевазу или никазу, за связыванием может следовать расщепление или разрезание.

[0065] В контексте данного документа считается, что первая последовательность «содержит последовательность с по меньшей мере X% идентичности» со второй последовательностью, если выравнивание первой последовательности со второй последовательностью демонстрирует, что X% или более из положений во второй последовательности полностью совпадают с первой последовательностью. Например, последовательность AAGA содержит последовательность со 100% идентичностью с последовательностью AAG, потому что выравнивание дало бы 100% идентичность в том смысле, что имеются совпадения во всех трех положениях второй последовательности.

Различия между РНК и ДНК (обычно обмен уридина на тимидин или наоборот) и присутствие нуклеозидных аналогов, таких как модифицированные уридины, не способствуют различиям в идентичности или комплементарности среди полинуклеотидов поскольку соответствующие нуклеотиды (такие как тимидин, уридин или модифицированный уридин) имеют один и тот же комплемент (например, аденозин для всех из тимидина, уридина или модифицированного уридина; другим примером являются цитозин и 5-метилцитозин, оба из которых содержат в качестве комплементарного основания гуанозин или модифицированный гуанозин). Таким образом, например, последовательность 5'-AXG, где X представляет собой любой модифицированный уридин, такой как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин или 5-метоксиуридин, считается на 100% идентичной AUG в том смысле, что обе они полностью комплементарны одной и той же последовательности (5'-CAU). Примерами алгоритмов выравнивания являются алгоритмы Смита-Уотермана и Нидлмана-Вунша, которые хорошо известны в данной области техники. Специалисту в данной области техники будет понятно, какой алгоритм выбрать и какие настройки параметров подходят для данной пары последовательностей, которые должны быть выровнены; для последовательностей в общем одинаковой длины и ожидаемой идентичности >50% для аминокислот или >75% для нуклеотидов, как правило, подходит алгоритм Нидлмана-Вунша со стандартными настройками интерфейса алгоритма Нидлмана-Вунша, предложенного EBI на веб-сервере [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk).

[0066] В контексте данного документа термин «mРНК» относится к полинуклеотиду, и содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (*т.е.*, может служить субстратом для трансляции с помощью рибосомы и аминокислотированной tРНК). mРНК может содержать сахарофосфатный остов, включающий остатки рибозы или их аналоги, например, остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сахара сахарофосфатного остова mРНК состоят по существу из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации.

[0067] В контексте данного документа термин «инделлы» относится к вставным/делеционным мутациям, состоящим из ряда нуклеотидов, которые либо вставлены, либо удалены, например, в месте двухцепочечных разрывов (DSB) в нуклеиновой целевой кислоте.

[0068] В контексте данного документа термин «снижение или устранение» экспрессии белка в клетке относится к частичной или полной потере экспрессии белка по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения поверхностная экспрессия белка на клетке измеряется с помощью проточной цитометрии и клетка имеет «сниженную или устраненную» поверхностную экспрессию по сравнению с немодифицированной клеткой, о чем свидетельствует снижение флуоресцентного сигнала при окрашивании тем же антителом против белка. Клетка, которая имеет «сниженную или устраненную» поверхностную экспрессию белка с помощью проточной цитометрии по сравнению с

немодифицированной клеткой, может быть названа «отрицательной» в отношении экспрессии этого белка, о чем свидетельствует сигнал флуоресценции, аналогичный сигналу клетки, окрашенной антителом изотипического контроля. «Снижение или устранение» экспрессии белка можно измерить другими известными в данной области техники методиками с соответствующими контролями, известными специалистам в данной области техники.

[0069] В контексте данного документа термин «нокдаун» относится к снижению экспрессии конкретного продукта гена (например, белка, мРНК или обоих), например, по сравнению с экспрессией неотредактированной целевой последовательности. Нокдаун белка можно измерить путем определения общего клеточного количества белка в образце, таком как ткань, жидкость или клеточная популяция. Нокдаун также можно измерить путем измерения суррогата, маркера или активности белка. Способы измерения нокдауна мРНК известны и включают анализ мРНК, выделенной из представляющего интерес образца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения «нокдаун» может относиться к некоторой потере экспрессии конкретного продукта гена, например, к уменьшению количества транскрибируемой мРНК или уменьшению количества белка, экспрессируемого клеткой или популяцией клеток (включая *in vivo* популяции, такие как были обнаруженные в тканях).

[0070] В контексте данного документа термин «нокаут» относится к потере экспрессии определенного гена или определенного белка в клетке. Нокаут может привести к снижению экспрессии ниже уровня обнаружения анализа. Нокаут можно измерить либо путем определения общего клеточного количества белка в клетке, ткани или популяции клеток.

[0071] В контексте данного документа термин «целевая последовательность» или «геномная целевая последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в целевом гене, которая комплементарна направляющей последовательности gРНК. Взаимодействие целевой последовательности и направляющей последовательности направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент для связывания и, возможно, разрезания или расщепления (в зависимости от активности агента) внутри целевой последовательности.

[0072] В контексте данного документа термин «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического средства для лечения заболевания или нарушения у субъекта и включает ингибирование заболевания, остановку его развития, облегчение одного или большего количества симптомов заболевания, излечение заболевания или предотвращение одного или большего количества симптомов заболевания, включая рецидив симптома.

[0073] Далее будут подробно рассмотрены некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, примеры которых проиллюстрированы в прилагаемых графических материалах. Хотя изобретение описано в связи с проиллюстрированными вариантами осуществления, следует понимать, что они не предназначены для ограничения

изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, настоящее изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в изобретение, как определено прилагаемой формулой изобретения и включенными вариантами осуществления.

[0074] Прежде чем настоящие идеи будут описаны более подробно, следует понимать, что описание не ограничивается конкретными композициями или этапами процессов, поскольку они могут варьироваться. Следует отметить, что при применении в данном описании и прилагаемой формуле формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Таким образом, ссылка на «конъюгат» включает множество конъюгатов, а ссылка на «клетку» включает множество клеток и тому подобное.

[0075] Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Измеряемые и измеримые значения считаются приблизительными с учетом значащих цифр и ошибки, связанной с измерением. Кроме того, применение слов «содержат», «содержит», «содержащий», «состоят из», «состоит из», «состоящий из», «включают», «включает» и «включающий» не является ограничивающим. Следует понимать, что как приведенное выше общее описание, так и приведенное ниже подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают идеи.

[0076] Если специально не указано в описании, варианты осуществления в описании, которые «содержат» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие по существу из» указанных компонентов; варианты осуществления в описании, которые «состоят из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие по существу из» указанных компонентов; и варианты осуществления в описании, «состоящие по существу из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» указанные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к использованию этих терминов в формуле изобретения). Термин «или» применяется во всеобъемлющем смысле, *т. е.* эквивалентен «и/или», если контекст явно не указывает иное.

[0077] Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объект изобретения каким-либо образом. В случае, если какой-либо материал, включенный в качестве ссылки, противоречит любому термину, определенному в данном описании, или любому другому прямому содержанию в данном описании, это описание является превалирующим. Хотя настоящие идеи описаны в сочетании с различными вариантами осуществления, не предполагается, что настоящие идеи ограничиваются такими вариантами осуществления. Напротив, настоящие идеи охватывают различные альтернативы, модификации и эквиваленты, что будет понятно специалистам в данной области техники.

Генетически модифицированные клетки

1. Композиции сконструированных клеток человека

[0078] Настоящее изобретение относится к композициям сконструированных клеток человека, в которых снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащим генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная человеческая клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная человеческая клетка со сниженной экспрессией HLA-A применима для терапии методом адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная человеческая клетка содержит дополнительные генетические модификации в геноме клетки (*например*, уменьшение или устранение белков МНС класса II, и/или уменьшение или устранение белков эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR), и/или введение экзогенной нуклеиновой кислоты для экспрессии) с получением клетки, подходящей для целей аллогенной трансплантации.

[0079] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная человеческая клетка представляет собой аллогенную клеточный препарат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированную человеческую клетку переносят реципиенту, имеющему тот же аллель HLA-B, что и сконструированная человеческая клетка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированную человеческую клетку переносят реципиенту, имеющему тот же аллель HLA-C, что и сконструированная человеческая клетка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированную человеческую клетку переносят реципиенту, который имеет те же аллели HLA-B и HLA-C, что и сконструированная человеческая клетка. Таким образом, сконструированные человеческие клетки, предложенные в настоящем документе, обеспечивают частичное соответствие HLA реципиенту, тем самым снижая риск нежелательной иммунной реакции.

[0080] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная человеческая клетка со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащей генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[0081] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат выбранных из: chr6:29942854-chr6:29942913 и chr6:29943518- chr6: 29943619; при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[0082] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для каждого

заданного диапазона геномных координат диапазон может охватывать +/- 10 нуклеотидов на любом конце указанных координат. Например, если приведено chr6:29942854-chr6:29942913, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения геномная целевая последовательность или генетическая модификация могут находиться в пределах chr6:29942844-chr6:29942923. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для каждого заданного диапазона геномных координат диапазон может охватывать +/- 5 нуклеотидов на любом конце диапазона.

[0083] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения заданный диапазон геномных координат может включать целевую последовательность на обеих цепях ДНК (*m.e.* плюс (+) цепь и минус (-) цепь).

[0084] Генетические модификации в гене HLA-A описаны далее в этом документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация гена HLA-a включает любую одну или большее количество вставок, делеций, замен или дезаминирований по меньшей мере одного нуклеотида в целевой последовательности.

[0085] Сконструированные клетки человека, описанные в настоящем документе, могут содержать генетическую модификацию в любом аллеле HLA-A гена HLA-A. Ген HLA расположен в хромосоме 6 в геномной области, называемой суперлокусом HLA; о сотнях аллелей HLA-A было сообщено в данной области техники (*см., например, Shiina et al., Nature 54:15-39 (2009).* Последовательности аллелей HLA-A доступны в данной области техники (*см., например, базу данных IPD-IMGT/HLA для поиска последовательностей конкретных аллелей HLA-A* <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/allele.html>).

[0086] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в клетке снижена или устранена экспрессия по меньшей мере одного аллеля HLA-A, выбранного из: HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 и HLA-A24. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A11. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A24.

[0087] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат от chr6:29942864 до chr6: 29942903.

[0088] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена

сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат от chr6:29943528 до chr6:29943609.

[0089] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; и chr6:29942883-29942903.

[0090] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностная экспрессия HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609.

[0091] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942876-29942897.

[0092] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-chr6:29943550.

[0093] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, chr6:29942877-29942897.

[0094] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную

поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, chr6:29943530-29943550.

[0095] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046.

[0096] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942864-29942884.

[0097] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942868-29942888.

[0098] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942876-29942896.

[0099] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942877-29942897.

[00100] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или

устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942883-29942903.

[00101] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943126-29943146.

[00102] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-29943548.

[00103] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943529-29943549.

[00104] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943530-29943550.

[00105] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943537-29943557.

[00106] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943549-29943569.

[00107] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943589-29943609.

[00108] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29944026-29944046.

[00109] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит индел, замену С на Т, или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854-chr6:29942913 и chr6:29943518- chr6:29943619. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00110] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная человеческая клетка, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит индел, замену С на Т, или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00111] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной

клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит индел, замену С на Т, или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00112] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит индел, замену С на Т, или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00113] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит индел, замену С на Т, или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569;

chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046, при этом указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере 6 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере 7 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере 8 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере 9 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная генетическая модификация содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00114] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом указанная генетическая модификация содержит индел, замену С на Т, или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046, при этом указанная генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену С на Т или по меньшей мере одну замену А на G в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00115] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884;

chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897;  
 chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548;  
 chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557;  
 chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046,  
 chr6:29934330-29934350, chr6:29943115-29943135, chr6:29943135-29943155,  
 chr6:29943140-29943160, chr6:29943590-29943610, chr6:29943824-29943844,  
 chr6:29943858-29943878, chr6:29944478-29944498, и chr6:29944850-29944870. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00116] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00117] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность

HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00118] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; и chr6:29942883-29942903. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00119] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00120] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, chr6:29942877-29942897. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00121] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или

устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, chr6:29943530-29943550. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00122] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29945290-29945310, chr6:29945296-29945316, chr6:29945297-29945317, и chr6:29945300-29945320. Из-за аллельного полиморфизма в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевые последовательности могут содержать 1, 2 или 3 несовпадения с геномной последовательностью hg38. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00123] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29890117-29890137, chr6:29927058-29927078, chr6:29934330-29934350, chr6:29942541-29942561, chr6:29942542-29942562, chr6:29942543-29942563, chr6:29942543-29942563, chr6:29942550-29942570, chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, chr6:29942876-29942896, chr6:29942877-29942897, chr6:29942883-29942903, chr6:29943062-29943082, chr6:29943063-29943083, chr6:29943092-29943112, chr6:29943115-29943135, chr6:29943118-29943138, chr6:29943119-29943139, chr6:29943120-29943140, chr6:29943126-29943146, chr6:29943128-29943148, chr6:29943129-29943149, chr6:29943134-29943154, chr6:29943134-29943154, chr6:29943135-29943155, chr6:29943136-29943156, chr6:29943140-29943160, chr6:29943142-29943162, chr6:29943143-29943163, chr6:29943188-29943208, chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, chr6:29943530-29943550, chr6:29943536-29943556, chr6:29943537-29943557,

chr6:29943538-29943558, chr6:29943549-29943569, chr6:29943556-29943576,  
 chr6:29943589-29943609, chr6:29943590-29943610, chr6:29943590-29943610,  
 chr6:29943599-29943619, chr6:29943600-29943620, chr6:29943601-29943621,  
 chr6:29943602-29943622, chr6:29943603-29943623, chr6:29943774-29943794,  
 chr6:29943779-29943799, chr6:29943780-29943800, chr6:29943822-29943842,  
 chr6:29943824-29943844, chr6:29943857-29943877, chr6:29943858-29943878,  
 chr6:29943859-29943879, chr6:29943860-29943880, chr6:29944026-29944046,  
 chr6:29944077-29944097, chr6:29944078-29944098, chr6:29944458-29944478,  
 chr6:29944478-29944498, chr6:29944597-29944617, chr6:29944642-29944662,  
 chr6:29944643-29944663, chr6:29944772-29944792, chr6:29944782-29944802,  
 chr6:29944850-29944870, chr6:29944907-29944927, chr6:29945024-29945044,  
 chr6:29945097-29945117, chr6:29945104-29945124, chr6:29945105-29945125,  
 chr6:29945116-29945136, chr6:29945118-29945138, chr6:29945119-29945139,  
 chr6:29945124-29945144, chr6:29945176-29945196, chr6:29945177-29945197,  
 chr6:29945177-29945197, chr6:29945180-29945200, chr6:29945187-29945207,  
 chr6:29945188-29945208, chr6:29945228-29945248, chr6:29945230-29945250,  
 chr6:29945231-29945251, chr6:29945232-29945252, chr6:29945308-29945328,

chr6:29945361-29945381, chr6:29945362-29945382, и chr6:31382543-31382563. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как *S. pyogenes* Cas9, или редактор оснований, содержащий никазу *S. pyogenes* Cas9.

[00124] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942815-29942835, chr6:29942816-29942836, chr6:29942817-29942837, chr6:29942817-29942837, chr6:29942828-29942848, chr6:29942837-29942857, chr6:29942885-29942905, chr6:29942895-29942915, chr6:29942896-29942916, chr6:29942898-29942918, chr6:29942899-29942919, chr6:29942900-29942920, chr6:29942904-29942924, chr6:29942905-29942925, chr6:29942912-29942932, chr6:29942913-29942933, chr6:29943490-29943510, chr6:29943497-29943517, chr6:29943498-29943518, chr6:29943502-29943522, chr6:29943502-29943522, chr6:29943511-29943531, chr6:29943520-29943540, chr6:29943521-29943541, chr6:29943566-29943586, chr6:29943569-29943589, chr6:29943569-29943589, chr6:29943570-29943590,

chr6:29943573-29943593, chr6:29943578-29943598, chr6:29943585-29943605, chr6:29943589-29943609, chr6:29943568-29943588, и chr6:29942815-29942835. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как *S. pyogenes* Cas9.

[00125] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942884-29942904, chr6:29943519-29943539, chr6:29942863-29942883. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как *S. aureus* Cas9.

[00126] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943517-29943537, и chr6:29943523-29943543. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как CasX.

[00127] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных

нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942845-29942869, chr6:29942852-29942876, chr6:29942865-29942889, chr6:29942891-29942915, chr6:29942895-29942919, chr6:29942903-29942927, chr6:29942904-29942928, chr6:29943518-29943542, chr6:29943525-29943549, chr6:29943535-29943559, chr6:29943538-29943562, chr6:29943539-29943563, chr6:29943547-29943571, chr6:29943548-29943572, chr6:29943555-29943579, chr6:29943556-29943580, chr6:29943557-29943581, chr6:29943558-29943582, chr6:29943559-29943583, chr6:29943563-29943587, chr6:29943564-29943588, chr6:29943565-29943589, chr6:29943568-29943592, chr6:29943571-29943595, chr6:29943572-29943596, chr6:29943595-29943619, chr6:29943596-29943620, и chr6:29943600-29943624. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Nme2 Cas9.

[00128] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942885-29942905, chr6:29942895-29942915, chr6:29942896-29942916, chr6:29942898-29942918, chr6:29942899-29942919, chr6:29942900-29942920, chr6:29942904-29942924, chr6:29943511-29943531, chr6:29943520-29943540, chr6:29943521-29943541, chr6:29943529-29943549, chr6:29943566-29943586, chr6:29943568-29943588, chr6:29943569-29943589, chr6:29943569-29943589, chr6:29943570-29943590, chr6:29943573-29943593, chr6:29943578-29943598, chr6:29943585-29943605, и chr6:29943589-29943609. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как редактор оснований, содержащий дезаминазу и никазу *S. pyogenes* Cas9.

[00129] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной

целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942469-29942489, chr6:29943058-29943078, chr6:29943063-29943083, chr6:29943080-29943100, chr6:29943187-29943207, chr6:29943192-29943212, chr6:29943197-29943217, chr6:29943812-29943832, chr6:29944349-29944369, chr6:29944996-29945016, chr6:29945018-29945038, chr6:29945341-29945361, и chr6:29945526-29945546. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00130] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854 до chr6:29942913 и chr6:29943518 до chr6:29943619. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00131] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предоставляется сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат: chr6:29942876-29942897. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00132] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предоставляется сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат: chr6:29943528-chr6:29943550. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая



редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат: chr6:29943529-29943549. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предоставляется сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат: chr6:29943530-29943550. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предоставляется сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат: chr6:29943537-29943557. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предоставляется сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат: chr6:29943549-29943569. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предоставляется сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат: chr6:29943589-29943609. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предоставляется сконструированная клетка человека, экспрессия HLA-A которой снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат: chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00134] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 17, 19, 18 или 20 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00135] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит нуклеазу "цинковые пальцы". В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит систему CRISPR/Cas, такую как система класса 2. В некоторых вариантах

осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00136] Типовые РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты продемонстрированы в **Таблице 1А** ниже.

[00137] Таблица 1А. Типовые РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты

<b>РНК-направляемый ДНК-связывающий агент</b>	<b>PAM</b>	<b>Длина направляющей</b>
Cas9 нуклеаза из <i>S. pyogenes</i>	NGG	20bp
Cas9 нуклеаза из <i>Neisseria meningitidis</i>	NNNNG[A/C]TT	20bp
Cas9 нуклеаза из <i>Streptococcus thermophilus</i>	NNAGAAW	20bp
Cas9 нуклеаза из <i>Staphylococcus aureus</i> .	NNG(A/G)(A/G)T	20bp
Cpf1 нуклеаза из <i>Francisella novicida</i>	TTTN	23bp
Cpf1 нуклеаза из <i>Acidaminococcus</i> sp.	TTTV	23bp
Cpf1 нуклеаза из <i>Lachnospiraceae bacterium</i>	TTTV	23bp
Редактор оснований С на Т*	NGG	20bp
Редактор оснований А на G*	NGG	20bp
Cas12a	То же, что Cpf1	
CasX	TTCN	20bp
NME2	NNNNCC	24bp

\*Типовой редактор оснований на основе деаминазы-SpyCas9 никазы. Очевидно, что специфичность редактора оснований, включая PAM, зависит от его никазы.

[00138] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержат белок Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент выбран из: *S. pyogenes* Cas9, *Neisseria meningitidis* Cas9, например, Nme2Cas9, *S. thermophilus* Cas9, *S. aureus* Cas9, *Francisella novicida* Cpf1, *Acidaminococcus* sp. Cpf1, *Lachnospiraceae bacterium* Cpf1, редактора оснований С на Т, редактора оснований А на G, Cas12a, Mad7 нуклеазы, ARCUS нуклеазы и CasX. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит

полипептид, выбранный из: *S. pyogenes* Cas9, *Neisseria meningitidis* Cas9, например, Nme2Cas9, *S. thermophilus* Cas9, *S. aureus* Cas9, *Francisella novicida* Cpf1, *Acidaminococcus* sp. Cpf1, *Lachnospiraceae* bacterium Cpf1, редактора оснований С на Т, редактора оснований А на G, Cas12a, и CasX.

[00139] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, является *S. pyogenes* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *N. meningitidis* Cas9, например, Nme2Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. thermophilus* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. aureus* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cpf1 из *F. novicida*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cpf1 из *Acidaminococcus* sp.. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cpf1 из *Lachnospiraceae* bacterium ND2006.. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой редактор оснований С на Т. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой редактор оснований А на G. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор оснований содержит дезаминазу и РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу АРОВЕС3А (А3А) и РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу SpyCas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемая нуклеаза содержит нуклеазу NmeCas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cas12a. В

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой CasX.

[00140] В любом из приведенных выше вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой *S. pyogenes* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой редактор оснований. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор оснований содержит дезаминазу С на Т и РНК-направляемую никазу, такую как никаза *S. pyogenes* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор оснований содержит дезаминазу А на G и РНК-направляемую никазу, такую как никаза *S. pyogenes* Cas9.

[00141] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, когда сконструированная клетка является гомозиготной по HLA-B, аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B\*07:02; HLA-B\*08:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*35:01; HLA-B\*40:01; HLA-B\*57:01; HLA-B\*14:02; HLA-B\*15:01; HLA-B\*13:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*38:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*44:03; HLA-B\*51:01; HLA-B\*49:01; HLA-B\*15:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*27:05; HLA-B\*35:03; HLA-B\*18:01; HLA-B\*52:01; HLA-B\*51:01; HLA-B\*37:01; HLA-B\*53:01; HLA-B\*55:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*35:02; HLA-B\*15:01; и HLA-B\*40:02.

[00142] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, когда сконструированная клетка является гомозиготной по HLA-C, аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C\*07:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*03:04; HLA-C\*06:02; HLA-C\*08:02; HLA-C\*03:03; HLA-C\*06:02; HLA-C\*16:01; HLA-C\*12:03; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*15:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*03:04; HLA-C\*12:03; HLA-C\*02:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*12:02; HLA-C\*14:02; HLA-C\*06:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*03:03; HLA-C\*07:04; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*04:01; и HLA-C\*02:02.

[00143] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B\*07:02; HLA-B\*08:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*35:01; HLA-B\*40:01; HLA-B\*57:01; HLA-B\*14:02; HLA-B\*15:01; HLA-B\*13:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*38:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*44:03; HLA-B\*51:01; HLA-B\*49:01; HLA-B\*15:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*27:05; HLA-B\*35:03; HLA-B\*18:01; HLA-B\*52:01; HLA-B\*51:01; HLA-B\*37:01; HLA-B\*53:01; HLA-B\*55:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*35:02; HLA-B\*15:01; и HLA-B\*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C\*07:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*05:01; HLA-

C\*04:01 HLA-C\*03:04; HLA-C\*06:02; HLA-C\*08:02; HLA-C\*03:03; HLA-C\*06:02; HLA-C\*16:01; HLA-C\*12:03; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*15:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*03:04; HLA-C\*12:03; HLA-C\*02:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*12:02; HLA-C\*14:02; HLA-C\*06:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*03:03; HLA-C\*07:04; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*04:01; и HLA-C\*02:02.

[00144] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C сконструированной клетки человека выбраны из любой из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B\*07:02 и HLA-C\*07:02; HLA-B\*08:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*44:02 и HLA-C\*05:01; HLA-B\*35:01 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*40:01 и HLA-C\*03:04; HLA-B\*57:01 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*14:02 и HLA-C\*08:02; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*03:03; HLA-B\*13:02 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*16:01; HLA-B\*38:01 и HLA-C\*12:03; HLA-B\*18:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*51:01 и HLA-C\*15:02; HLA-B\*49:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*03:04; HLA-B\*18:01 и HLA-C\*12:03; HLA-B\*27:05 и HLA-C\*02:02; HLA-B\*35:03 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*18:01 и HLA-C\*05:01; HLA-B\*52:01 и HLA-C\*12:02; HLA-B\*51:01 и HLA-C\*14:02; HLA-B\*37:01 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*53:01 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*55:01 и HLA-C\*03:03; HLA-B\*44:02 и HLA-C\*07:04; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*35:02 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*04:01; а также HLA-B\*40:02 и HLA-C\*02:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*07:02 и HLA-C\*07:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*08:01 и HLA-C\*07:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*44:02 и HLA-C\*05:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*35:01 и HLA-C\*04:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*40:01 и HLA-C\*03:04. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*57:01 и HLA-C\*06:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*14:02 и HLA-C\*08:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*15:01 и HLA-C\*03:03. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*13:02 и HLA-C\*06:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*44:03 и HLA-C\*16:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*38:01 и HLA-C\*12:03. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*18:01 и HLA-C\*07:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели

HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*44:03 и HLA-C\*04:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*51:01 и HLA-C\*15:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*49:01 и HLA-C\*07:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*15:01 и HLA-C\*03:04. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*18:01 и HLA-C\*12:03. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*27:05 и HLA-C\*02:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*35:03 и HLA-C\*04:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*18:01 и HLA-C\*05:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*52:01 и HLA-C\*12:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*51:01 и HLA-C\*14:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*37:01 и HLA-C\*06:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*53:01 и HLA-C\*04:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*55:01 и HLA-C\*03:03. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*44:02 и HLA-C\*07:04. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*44:03 и HLA-C\*07:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*35:02 и HLA-C\*04:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*15:01 и HLA-C\*04:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*40:02 и HLA-C\*02:02.

[00145] Описанные в настоящем документе комбинации аллелей HLA-B и HLA-C в совокупности охватывают около 88% популяции. Кумулятивная частота пар аллелей HLA-B и HLA-C продемонстрирована в **Таблице 1В** ниже.

[00146] Таблица 1В. Кумулятивная частота аллелей HLA-A и HLA-C в популяции.

Кумулятивная частота	Аллели
0,194	HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02
0,33	HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01
0,413	HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01
0,483	HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01
0,534	HLA-B*40:01 и HLA-C*03:04
0,594	HLA-B*57:01 и HLA-C*06:02

Кумулятивная частота	Аллели
0,62	HLA-B*14:02 и HLA-C*08:02
0,648	HLA-B*15:01 и HLA-C*03:03
0,671	HLA-B*13:02 и HLA-C*06:02
0,696	HLA-B*44:03 и HLA-C*16:01
0,717	HLA-B*38:01 и HLA-C*12:03
0,734	HLA-B*18:01 и HLA-C*07:01
0,751	HLA-B*44:03 и HLA-C*04:01
0,766	HLA-B*51:01 и HLA-C*15:02
0,776	HLA-B*49:01 и HLA-C*07:01
0,787	HLA-B*15:01 и HLA-C*03:04
0,798	HLA-B*18:01 и HLA-C*12:03
0,809	HLA-B*27:05 и HLA-C*02:02
0,815	HLA-B*35:03 и HLA-C*04:01
0,827	HLA-B*18:01 и HLA-C*05:01
0,838	HLA-B*52:01 и HLA-C*12:02
0,845	HLA-B*51:01 и HLA-C*14:02
0,856	HLA-B*37:01 и HLA-C*06:02
0,865	HLA-B*53:01 и HLA-C*04:01
0,872	HLA-B*55:01 и HLA-C*03:03
0,876	HLA-B*44:02 и HLA-C*07:04
0,881	HLA-B*44:03 и HLA-C*07:01
0,884	HLA-B*35:02 и HLA-C*04:01
0,888	HLA-B*15:01 и HLA-C*04:01

[00147] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, которая является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а также имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию белков MHC II класса. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка человека имеет генетическую модификацию гена, которая снижает или устраняет поверхностную экспрессию MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка человека имеет генетическую модификацию гена СПТА. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка человека имеет генетическую модификацию гена HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

сконструированная клетка человека имеет генетическую модификацию гена HLA-DQ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка человека имеет генетическую модификацию гена HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка человека имеет генетическую модификацию гена RFX. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка человека имеет генетическую модификацию гена CREB. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка человека имеет генетическую модификацию в гене ядерного фактора (NF)-гамма.

[00148] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, которая является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а также имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию белка TRAC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, которая является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а также имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию белка TRBC.

[00149] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528 до chr6:29943609 и при этом сконструированная клетка дополнительно содержит генетическую модификацию гена, которая снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528 до chr6:29943609 и при этом сконструированная клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене СПТА.

[00150] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528 до chr6:29943609 и при этом сконструированная клетка дополнительно

содержит генетическую модификацию в гене TRAC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528 до chr6:29943609 и при этом сконструированная клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене TRBC.

[00151] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию гена HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528 до chr6:29943609 и при этом сконструированная клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой CAR или универсальный CAR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой WT1 TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой лиганд для рецептора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой гибрид CAR/TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор содержит домен распознавания антигена (например, домен распознавания ракового антигена) и субъединицу TCR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется сконструированной клеткой (т.е. растворимый полипептид). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения секретируемый полипептид представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения секретируемый полипептид представляет собой фермент. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело, кодирующее цитокин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует хемокин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует гибридный белок.

[00152] Сконструированная клетка человека может представлять собой любой из иллюстративных типов клеток, описанных в настоящем документе. Кроме того, поскольку молекулы МНС класса I экспрессируются на всех ядерных клетках, сконструированная клетка человека может быть любой ядерной клеткой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой стволовую клетку, такую как гемопоэтическая стволовая клетка (HSC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой нервную стволовую клетку (NSC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой лимбальную стволовую клетку (LSC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой клетку-предшественник, например, эндотелиальная клетка-предшественник или нейральная клетка-предшественник. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой тканеспецифичную первичную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка выбрана из: хондроцита, миоцита и кератиноцита. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой моноцит, макрофаг, тучную клетку, дендритную клетку или гранулоцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой моноцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой макрофаг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой тучную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой гранулоцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой CD4<sup>+</sup> Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

сконструированная клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку . В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой Т-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой В-клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой плазматическую В-клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой В-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой макрофаг.

[00153] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая любую из описанных в настоящем документе сконструированных клеток человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию любой из описанных в настоящем документе сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 65% HLA-A-отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 70% HLA-A-отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 80% HLA-A-отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 90% HLA-A-отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 91% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 92% HLA-A-отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 93% HLA-A-отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 94% HLA-A-отрицательна по данным проточной цитометрии.

[00154] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 95% отрицательна по эндогенному белку TCR по данным проточной

цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 97% отрицательна по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 98% отрицательна по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 99% отрицательна по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 99,5% отрицательна по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии.

[00155] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы введения сконструированных клеток человека или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы введения сконструированных клеток человека или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, субъекту в качестве АСТ-терапии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы введения сконструированных клеток человека или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, субъекту для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы введения сконструированных клеток человека или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, субъекту для лечения аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы введения сконструированных клеток человека или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, субъекту для лечения инфекционного заболевания.

Способы и композиции для снижения или устранения поверхностной экспрессии HLA-A

[00156] В настоящем изобретении предложены способы и композиции для снижения или устранения поверхностной экспрессии белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой путем генетической модификации гена HLA-A. Полученная генетически модифицированная клетка также может называться в настоящем документе как сконструированная клетка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения уже генетически модифицированная (или сконструированная) клетка может быть исходной клеткой для дальнейшей генетической модификации с применением способов или композиций, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой

аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка со сниженной экспрессией HLA-A применима для терапии методом адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактирование гена HLA-A сочетается с дополнительными генетическими модификациями для получения клетки, подходящей для целей аллогенной трансплантации.

[00157] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают снижение поверхностной экспрессии белка HLA-A в клетке человека по сравнению с немодифицированной клеткой, включающее приведение клетки в контакт с композицией, содержащей а) РНК, направленную на HLA-A, содержащую i. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211; или ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или iii. направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или iv. направляющую последовательность, которая связывает целевой сайт, содержащий геномную область из **Таблиц 2-5**; или v. направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам геномной области из Таблиц 1-2 и 5, или направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам геномной области из Таблицы 4; или vi. направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из (v); и необязательно (b) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, выбран из: *S. pyogenes* Cas9, *Neisseria meningitidis* Cas9, например, Nme2Cas9, *S. thermophilus* Cas9, *S. aureus* Cas9, *Francisella novicida* Cpf1, *Acidaminococcus* sp. Cpf1, *Lachnospiraceae bacterium* Cpf1, редактора оснований С на Т, редактора оснований А на G, Cas12a, и CasX. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит полипептид, выбранный из: *S. pyogenes* Cas9, *Neisseria meningitidis* Cas9, например, Nme2Cas9, *S. thermophilus* Cas9, *S. aureus* Cas9, *Francisella novicida* Cpf1, *Acidaminococcus* sp. Cpf1, *Lachnospiraceae bacterium* Cpf1, редактора оснований С на Т, редактора оснований А на G, Cas12a, и CasX. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. pyogenes* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, разработанная для направления на СПТА,

представляет собой направляющую РНК *S. pyogenes* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит домен дезаминазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу АРОВЕС3А (А3А) и РНК-направляемую никазу, . В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *N. meningitidis* Cas9, например, Nme2Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. thermophilus* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. aureus* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cpf1 из *F. novicida*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cpf1 из *Acidaminococcus* sp. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cpf1 из *Lachnospiraceae bacterium* ND2006. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой редактор оснований С на Т. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент япредставляет собой редактор оснований А на G. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор оснований содержит дезаминазу и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу АРОВЕС3А (А3А) и РНК-направляемую никазу,. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемая никаза представляет собой никазу SpyCas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемая никаза содержит никазу NmeCas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cas12a. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой CasX. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения таким образом снижается экспрессия белка HLA-A на поверхности клетки (*m.e.* сконструированной клетки).

[00158] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы обеспечивают создание сконструированной клетки человека, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, при этом описанные способы включают приведение клетки в контакт с композицией, содержащей а) РНК, направленную на HLA-A, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211; или ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID

NO: 1-211; или iii. направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или iv. направляющую последовательность, которая связывает целевой сайт, содержащий геномную область из Таблиц 2-5; или v. направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам геномной области из Таблиц 1-2 и 5, или направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам геномной области из Таблицы 4; или vi. направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из (v); и необязательно (b) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. pyogenes* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, разработанная для направления на СПТА, представляет собой направляющую РНК *S. pyogenes* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит домен дезаминазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу АРОВЕС3А (А3А) и РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения таким образом снижается экспрессия белка HLA-A на поверхности клетки (*m.e.* сконструированной клетки).

[00159] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы снижения или устранения экспрессии белка HLA-A на поверхности клетки включают приведение клетки в контакт с любой одной или большим количеством РНК, разработанных для направления на HLA-A, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, разработанная для направления на СПТА, содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211.

[00160] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены композиции, содержащие а) РНК, направленную на HLA-A, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211; или ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или iii. направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или iv. направляющую последовательность, которая связывает целевой сайт, содержащий

геномную область из **Таблиц 2-5**; или v. направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам геномной области из Таблиц 1-2 и 5, или направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам геномной области из Таблицы 4; или vi. направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из (v); и необязательно (b) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная композиция содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. pyogenes* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, разработанная для направления на СПТА, представляет собой направляющую РНК *S. pyogenes* Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит домен дезаминазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу АРОВЕСЗА (АЗА) и РНК-направляемую никазу.

[00161] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная композиция дополнительно содержит ингибитор урацилгликозилазы (UGI). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная композиция содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, при этом РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вызывает превращение цитозина (С) в тимин (Т) с геномной целевой последовательностью HLA-A. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная композиция содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который вызывает превращение аденозина (А) в гуанин (G) с геномной целевой последовательностью HLA-A.

[00162] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная клетка человека, полученная способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка человека, полученная способами и композициями, описанными в настоящем документе, представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку человека со сниженной или устраненной экспрессией HLA-A. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка человека, полученная способами, описанными в настоящем документе, вызывает сниженную реакцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с

немодифицированной клеткой, как было измерено в анализе клеточной культуры *in vitro*, содержащей CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

[00163] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена клетка, продуцируемая композициями, описанными в настоящем документе и содержащими фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены композиции, содержащие описанные в настоящем документе клетки.

#### 1. РНК, разработанные для направления на HLA-A

[00164] Способы и композиции, которые предложены в настоящем документе, описывают направляющие РНК, пригодные для снижения или устранения экспрессии белка HLA-A на поверхности клетки человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такие направляющие РНК- направляют РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к геномной целевой последовательности HLA-A и могут называться в настоящем документе как «РНК, разработанные для направления на HLA-A». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к геномной целевой последовательности HLA-A человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211.

[00165] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая РНК, направленную на HLA-A, описанную в настоящем документе, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00166] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая одиночную РНК, направленную на HLA-A (sgРНК), содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая HLA-A sgРНК, описанную в настоящем документе, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00167] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая двойную РНК, направленную на HLA-A (dgРНК), содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая HLA-dgРНК, описанную в настоящем документе, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00168] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК

HLA-A содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-211. Типовые направляющие на HLA-A последовательности продемонстрированы ниже в **Таблице 2** (SEQ ID NO: 1-95 с соответствующими последовательностями направляющих РНК- SEQ ID NO: 249-343 и 344-438), **Таблице 3** (SEQ ID NO: 96-128 с соответствующими последовательности направляющих РНК SEQ ID NO: 439-471 и 472-504), **Таблицу 4** (SEQ ID NO: 129-182) и **Таблицу 5** (SEQ ID NO: 183-211 с соответствующими последовательностями направляющих РНК SEQ ID NO: 505-532 и 533-560).

[00169] **Таблица 2. Типовые РНК, разработанные для направления на HLA-A**

ID направляющей последовательности	SEQ ID NO направляющей последовательности	Направляющая последовательность	Типовая направляющая последовательность Полная последовательность (SEQ ID NOS: 249-343)	Типовая модифицированная последовательность направляющей РНК (четыре концевых остатка U являются необязательными и могут включать 0, 1, 2, 3, 4 или большее количество остатков U) (SEQ ID NO: 344-438)	Геномные координаты (hg38)
G018983	1	UGGAGGG CCUGAUG UGUGUU	UGGAGGGCC UGAUGUGUG UUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mG*mG*AGGG CCUGAUGUGUGU UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*	chr6:29945290 -29945310 (несоответств ие hg38=2)

				mU*mU*mU	
G018984	2	GCCUGAU GUGUGUU GGGUGU	GCCUGAUGU GUGUUGGGU GUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mC*mC*UGAU GUGUGUUGGGUG UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945296 -29945316 (несоответств ие hg38=2)
G018985	3	CCUGAUG UGUGUUG GGUGUU	CCUGAUGUG UGUUGGGUG UUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mC*mU*GAUG UGUGUUGGGUGU UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945297 -29945317 (несоответств ие hg38=1)
G018986	4	CCCAACAC CCAACACA CAUC	CCCAACACC CAACACACA UCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU	mC*mC*mC*AACA CCCAACACACAUC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA	chr6:29945300 -29945320 (несоответств ие hg38=1)

			GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018965	5	UCAGGAA ACAUGAA GAAAGC	UCAGGAAAC AUGAAGAAA GCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mC*mA*GGAA ACAUGAAGAAAG CGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29890117 -29890137
G019018	6	AGGCGCC UGGGCCU CUCCCG	AGGCGCCUG GGCCUCUCC CGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mG*mG*CGCC UGGGCCUCUCCCG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29927058 -29927078
G018937	7	CGGGCUG GCCUCCCA CAAGG	CGGGCUGGC CUCCACAA GGGUUUUAG AGCUAGAAA	mC*mG*mG*GCUG GCCUCCCAAGG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA	chr6:29934330 -29934350

			<p>UAGCAAGUU  AAAAUAAGG  CUAGUCCGU  UAUCAACUU  GAAAAAGUG  GCACCGAGU  CGGUGCUUU  U</p>	<p>mUmAmGmCAAGU  UAAAAUAAGGCU  AGUCCGUUAUCA  mAmCmUmUmGmA  mAmAmAmAmGmU  mGmGmCmAmCmC  mGmAmGmUmCmG  mGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	
G018990	8	<p>ACGGCCA  UCCUCGGC  GUCUG</p>	<p>ACGGCCAUC  CUCGGCGUC  UGGUUUUAG  AGCUAGAAA  UAGCAAGUU  AAAAUAAGG  CUAGUCCGU  UAUCAACUU  GAAAAAGUG  GCACCGAGU  CGGUGCUUU  U</p>	<p>mA*mC*mG*GCCA  UCCUCGGCGUCUG  GUUUUAGAmGmC  mUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGU  UAAAAUAAGGCU  AGUCCGUUAUCA  mAmCmUmUmGmA  mAmAmAmAmGmU  mGmGmCmAmCmC  mGmAmGmUmCmG  mGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	<p>chr6:29942541  -29942561</p>
G018991	9	<p>GACGGCC  AUCCUCG  GCGUCU</p>	<p>GACGGCCAUC  CCUCGGCGU  CUGUUUUAG  AGCUAGAAA  UAGCAAGUU  AAAAUAAGG  CUAGUCCGU  UAUCAACUU  GAAAAAGUG  GCACCGAGU  CGGUGCUUU  U</p>	<p>mG*mA*mC*GGCC  AUCCUCGGCGUCU  GUUUUAGAmGmC  mUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGU  UAAAAUAAGGCU  AGUCCGUUAUCA  mAmCmUmUmGmA  mAmAmAmAmGmU  mGmGmCmAmCmC  mGmAmGmUmCmG  mGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	<p>chr6:29942542  -29942562</p>

G018992	10	GACGCCG AGGAUGG CCGUCA	GACGCCGAG GAUGGCCGU CAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mA*mC*GCCG AGGAUGGCCGUC AGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29942543 -29942563
G018993	11	UGACGGC CAUCCUCG GCGUC	UGACGGCCA UCCUCGGCG UCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mG*mA*CGGC CAUCCUCGGCGUC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29942543 -29942563
G018994	12	GGCGCCA UGACGGC CAUCCU	GGCGCCAUG ACGGCCAUC CUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG	mG*mG*mC*GCCA UGACGGCCAUCCU GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU	chr6:29942550 -29942570

			GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018995	13	ACAGCGA CGCCGCGA GCCAG	ACAGCGACG CCGCGAGCC AGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mC*mA*GCGA CGCCGCGAGCCAG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAm mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29942864 -29942884
G018996	14	CGACGCCG CGAGCCA GAGGA	CGACGCCGC GAGCCAGAG GAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mG*mA*CGCC GCGAGCCAGAGG AGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29942868 -29942888
G018997	15	CGAGCCA GAGGAUG GAGCCG	CGAGCCAGA GGAUGGAGC CGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU	mC*mG*mA*GCCA GAGGAUGGAGCC GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG	chr6:29942876 -29942896

			AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018998	16	CGGCUCCA UCCUCUG GCUCG	CGGCUCCA CCUCUGGCU CGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mG*mG*CUCC AUCCUCUGGCUCG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29942876 -29942896
G018999	17	GAGCCAG AGGAUGG AGCCGC	GAGCCAGAG GAUGGAGCC GCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mA*mG*CCAG AGGAUGGAGCCG CGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29942877 -29942897
G019000	18	GCGCCCGC	GCGCCCGCG	mG*mC*mG*CCCG	chr6:29942883

		GGCUCCA UCCUC	GCUCCAUCC UCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	CGGCUCCAUCCUC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	-29942903
G019001	19	GCCCGUCC GUGGGGG AUGAG	GCCCGUCCG UGGGGGAUG AGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mC*mC*CGUC CGUGGGGGAUGA GGUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943062 -29943082
G019002	20	UCAUCCCC CACGGAC GGGCC	UCAUCCCC ACGGACGGG CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU	mU*mC*mA*UCCC CCACGGACGGGCC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC	chr6:29943063 -29943083

			CGGUGCUUU U	mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019003	21	AUCUCGG ACCCGGA GACUGU	AUCUCGGAC CCGGAGACU GUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mU*mC*UCGG ACCCGGAGACUG UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943092 -29943112
G019004	22	GGGGUCC CGCGGCU UCGGGG	GGGGUCCCG CGGCUUCGG GGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mG*mG*GUCC CGCGGCUUCGGG GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943115 -29943135
G019005	23	CUCGGGG UCCCGCGG CUUCG	CUCGGGGUC CCGCGGCUU CGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG	mC*mU*mC*GGGG UCCCGCGGCUUCG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU	chr6:29943118 -29943138

			CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019006	24	UCUCGGG GUCCCGCG GCUUC	UCUCGGGGU CCCGCGGCU UCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mC*mU*CGGG GUCCCGCGGCUUC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943119 -29943139
G019007	25	GUCUCGG GGUCCCGC GGCUU	GUCUCGGGG UCCCGCGGC UUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mU*mC*UCGG GGUCCCGCGGCUU GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943120 -29943140
G019008	26	GCAAGGG UCUCGGG	GCAAGGGUC UCGGGGUCC	mG*mC*mA*AGGG UCUCGGGGUCCCG	chr6:29943126 -29943146

		GUCCCG	CGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019009	27	GGACCCCG AGACCCU UGCCC	GGACCCCGA GACCCUUGC CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mG*mA*CCCC GAGACCCUUGCCC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943128 -29943148
G019010	28	GACCCCGA GACCCU GCCCC	GACCCCGAG ACCCUUGCC CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU	mG*mA*mC*CCCG AGACCCUUGCCCC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG	chr6:29943129 -29943149

			U	mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019011	29	CGAGACCC UUGCCCCG GGAG	CGAGACCCU UGCCCCGGG AGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mG*mA*GACC CUUGCCCCGGGAG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943134 -29943154
G019012	30	CUCCCCGGG GCAAGGG UCUCG	CUCCCCGGG CAAGGGUCU CGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mU*mC*CCGG GGCAAGGGUCUC GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943134 -29943154
G019013	31	UCUCCCCGG GGCAAGG GUCUC	UCUCCCCGG GCAAGGGUC UCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU	mU*mC*mU*CCCG GGGCAAGGGUCU CGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC	chr6:29943135 -29943155

			UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G019014	32	CUCUCCCG GGGCAAG GGUCU	CUCUCCCG GGCAAGGGU CUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mU*mC*UCCC GGGGCAAGGGUC UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943136 -29943156
G019015	33	CCUUGCCC CGGGAGA GGCCC	CCUUGCCCC GGGAGAGGC CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mC*mU*UGCC CCGGGAGAGGCC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943140 -29943160
G019016	34	CUGGGCC UCUCCCGG GGCAA	CUGGGCCUC UCCCGGGGC AAGUUUUAG	mC*mU*mG*GGCC UCUCCCGGGGCAA GUUUUAGAmGmC	chr6:29943142 -29943162

			AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019017	35	CCUGGGCC UCUCCCGG GGCA	CCUGGGCCU CUCCCGGGG CAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mC*mU*GGGC CUCUCCCGGGGCA GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943143 -29943163
G019019	36	UUUAGGC CAAAAAU CCCCC	UUUAGGCCA AAAAUCCCC CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mU*mU*AGGC CAAAAAUCCCCC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m	chr6:29943188 -29943208

				U*mU*mU	
G021208	37	CGCUGCA GCGCACG GGUACC	CGCUGCAGC GCACGGGUA CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mG*mC*UGCA GCGCACGGGUACC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943528 -29943548
G021209	38	GCUGCAG CGCACGG GUACCA	GCUGCAGCG CACGGGUAC CAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mC*mU*GCAG GCGCACGGGUACCA GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943529 -29943549
G021210	39	CUGCAGC GCACGGG UACCAG	CUGCAGCGC ACGGGUACC AGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU	mC*mU*mG*CAGC GCACGGGUACCA GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm	chr6:29943530 -29943550

			GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018932	40	CGCACGG GUACCAG GGGCCA	CGCACGGGU ACCAGGGGC CAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mG*mC*ACGG GUACCAGGGGCC AGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943536 -29943556
G018933	41	GCACGGG UACCAGG GGCCAC	GCACGGGUA CCAGGGGCC ACGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mC*mA*CGGG UACCAGGGGCCAC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943537 -29943557
G018934	42	CACGGGU ACCAGGG GCCACG	CACGGGUAC CAGGGGCCA CGGUUUUAG AGCUAGAAA	mC*mA*mC*GGGU ACCAGGGGCCACG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA	chr6:29943538 -29943558

			<p>UAGCAAGUU  AAAAUAAGG  CUAGUCCGU  UAUCAACUU  GAAAAAGUG  GCACCGAGU  CGGUGCUUU  U</p>	<p>mUmAmGmCAAGU  UAAAAUAAGGCU  AGUCCGUUAUCA  mAmCmUmUmGmA  mAmAmAmAmGmU  mGmGmCmAmCmC  mGmAmGmUmCmG  mGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	
G018935	43	<p>GGGAGGC  GCCCCGUG  GCCCC</p>	<p>GGGAGGCGC  CCCGUGGCC  CCGUUUUAG  AGCUAGAAA  UAGCAAGUU  AAAAUAAGG  CUAGUCCGU  UAUCAACUU  GAAAAAGUG  GCACCGAGU  CGGUGCUUU  U</p>	<p>mG*mG*mG*AGGC  GCCCCGUGGCCCC  GUUUUAGAmGmC  mUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGU  UAAAAUAAGGCU  AGUCCGUUAUCA  mAmCmUmUmGmA  mAmAmAmAmGmU  mGmGmCmAmCmC  mGmAmGmUmCmG  mGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	<p>chr6:29943549  -29943569</p>
G018936	44	<p>GCGAUCA  GGGAGGC  GCCCCG</p>	<p>GCGAUCAGG  GAGGCGCCC  CGGUUUUAG  AGCUAGAAA  UAGCAAGUU  AAAAUAAGG  CUAGUCCGU  UAUCAACUU  GAAAAAGUG  GCACCGAGU  CGGUGCUUU  U</p>	<p>mG*mC*mG*AUCA  GGGAGGCGCCCCG  GUUUUAGAmGmC  mUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGU  UAAAAUAAGGCU  AGUCCGUUAUCA  mAmCmUmUmGmA  mAmAmAmAmGmU  mGmGmCmAmCmC  mGmAmGmUmCmG  mGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	<p>chr6:29943556  -29943576</p>

G021211	45	UCCUUGU GGGAGGC CAGCCC	UCCUUGUGG GAGGCCAGC CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mC*mC*UUGU GGGAGGCCAGCCC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943589 -29943609
G018938	46	CUCCUUG UGGGAGG CCAGCC	CUCCUUGUG GGAGGCCAG CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mU*mC*CUUG UGGGAGGCCAGC CGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943590 -29943610
G018939	47	GGCUGGC CUCCCACA AGGAG	GGCUGGCCU CCCACAAGG AGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG	mG*mG*mC*UGGC CUCCCACAAGGAG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU	chr6:29943590 -29943610

			GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018940	48	UUGUCUC CCCUCCUU GUGGG	UUGUCUCCC CUCCUUGUG GGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mU*mG*UCUC CCCUCCUUGUGGG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAm mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943599 -29943619
G018941	49	CCACAAG GAGGGGA GACAAU	CCACAAGGA GGGGAGACA AUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mC*mA*CAAG GAGGGGAGACAA UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943600 -29943620
G018942	50	CACAAGG AGGGGAG ACAAUU	CACAAGGAG GGGAGACAA UUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU	mC*mA*mC*AAGG AGGGGAGACAAU UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG	chr6:29943601 -29943621

			AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018943	51	CAAUUGU CUCCCCUC CUUGU	CAAUUGUCU CCCCUCCU GUGUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mA*mA*UUGU CUCCCCUCCUUGU GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943602 -29943622
G018944	52	CCAAUUG UCUCCCCU CCUUG	CCAAUUGUC UCCCCUCCU UGGUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mC*mA*AUUG UCUCCCCUCCUUG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943603 -29943623
G018945	53	AUCCUCG	AUCCUCGA	mA*mU*mC*CCUC	chr6:29943774

		AAUACUG AUGAG	AUACUGAUG AGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	GAAUACUGAUGA GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	-29943794
G018946	54	AACCACUC AUCAGUA UUCGA	AACCACUCA UCAGUAUUC GAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mA*mC*CACU CAUCAGUAUUCG AGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943779 -29943799
G018947	55	GAACCAC UCAUCAG UAUUCG	GAACCACUC AUCAGUAUU CGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU	mG*mA*mA*CCAC UCAUCAGUAUUC GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm	chr6:29943780 -29943800

			CGGUGCUUU U	CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018948	56	GAGGAAA AGUCACG GGCCCA	GAGGAAAAG UCACGGGCC CAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mA*mG*GAAA AGUCACGGGCCCA GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943822 -29943842
G018949	57	GGCCCGU GACUUUU CCUCUC	GGCCCGUGA CUUUUCCUC UCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mG*mC*CCGU GACUUUUCUCUC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943824 -29943844
G018950	58	UGCUUCA CACUCAA UGUGUG	UGCUUCACA CUCAAUGUG UGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG	mU*mG*mC*UUCA CACUCAAUGUGU GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UAAAAUAAGGC	chr6:29943857 -29943877

			CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018951	59	GCUUCAC ACUCAAU GUGUGU	GCUUCACAC UCAAUGUGU GUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mC*mU*UCAC ACUCA AUGUGUG UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943858 -29943878
G018952	60	CUUCACAC UCAAUGU GUGUG	CUUCACACU CAAUGUGUG UGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mU*mU*CACA CUCAAUGUGUGU GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29943859 -29943879
G018953	61	UUCACAC UCAAUGU	UUCACACUC AAUGUGUGU	mU*mU*mC*ACAC UCAAUGUGUGUG	chr6:29943860 -29943880

		GUGUGG	GGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018954	62	UUGAGAA UGGACAG GACACC	UUGAGAAUG GACAGGACA CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mU*mG*AGAA UGGACAGGACAC CGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29944026 -29944046
G021205	63	AGGCAUU UUGCAUC UGUCAU	AGGCAUUUU GCAUCUGUC AUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU	mA*mG*mG*CAUU UUGCAUCUGUCA UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm	chr6:29944077 -29944097

			U	GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G021206	64	CAGGCAU UUUGCAU CUGUCA	CAGGCAUUU UGCAUCUGU CAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mA*mG*GCAU UUUGCAUCUGUC AGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29944078 -29944098
G018955	65	AGGGGCC CUGACCCU GCUAA	AGGGGCCCU GACCCUGCU AAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mG*mG*GGCC CUGACCCUGCUAA GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29944458 -29944478
G018956	66	UGGGAAA AGAGGGG AAGGUG	UGGGAAAAG AGGGGAAGG UGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU	mU*mG*mG*GAAA AGAGGGGAAGGU GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC	chr6:29944478 -29944498

			UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018957	67	UGGAGGA GGAAGAG CUCAGG	UGGAGGAGG AAGAGCUCA GGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mG*mG*AGGA GGAAGAGCUCAG GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29944597 -29944617
G018958	68	UGAGAUU UCUUGUC UCACUG	UGAGAUUUC UUGUCUCAC GGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mG*mA*GAUU UCUUGUCUCACU GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29944642 -29944662
G018959	69	GAGAUUU CUUGUCU CACUGA	GAGAUUUCU UGUCUCACU GAGUUUUAG	mG*mA*mG*AUUU CUUGUCUCACUG AGUUUUAGAmGm	chr6:29944643 -29944663

			AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018960	70	UAAAGCA CCUGUUA AAAUGA	UAAAGCACC UGUUAAAAU GAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mA*mA*AGCA CCUGUUAAAAUG AGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29944772 -29944792
G018961	71	AAUCUGU CCUUCAU UUUAAC	AAUCUGUCC UUCAUUUUA ACGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mA*mU*CUGU CCUUCAUUUUA CGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*	chr6:29944782 -29944802

				mU*mU*mU	
G018962	72	GUCACAG GGGAAGG UCCCUG	GUCACAGGG GAAGGUCCC UGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mU*mC*ACAG GGGAAGGUCCCU GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29944850 -29944870
G018964	73	AAACAUG AAGAAAG CAGGUG	AAACAUGAA GAAAGCAGG UGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mA*mA*CAUG AAGAAAGCAGGU GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29944907 -29944927
G018966	74	UGUCCUG UGAGAU CCAGAA	UGUCCUGUG AGAUACCAG AAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU	mU*mG*mU*CCUG UGAGAUACCAGA AGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm	chr6:29945024 -29945044

			GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018967	75	AUGAAGG AGGCUGA UGCCUG	AUGAAGGAG GCUGAUGCC UGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mU*mG*AAGG AGGCUGAUGCCU GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945097 -29945117
G018968	76	AGGCUGA UGCCUGA GGUCCU	AGGCUGAUG CCUGAGGUC CUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mG*mG*CUGA UGCCUGAGGUCC UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945104 -29945124
G018969	77	GGCUGAU GCCUGAG GUCCUU	GGCUGAUGC CUGAGGUCC UUGUUUUAG AGCUAGAAA	mG*mG*mC*UGAU GCCUGAGGUCCU UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm	chr6:29945105 -29945125

			<p>UAGCAAGUU  AAAAUAAGG  CUAGUCCGU  UAUCAACUU  GAAAAAGUG  GCACCGAGU  CGGUGCUUU  U</p>	<p>AmUmAmGmCAAG  UUAAAAUAAGGC  UAGUCCGUUAUC  AmAmCmUmUmGm  AmAmAmAmAmGm  UmGmGmCmAmCm  CmGmAmGmUmCm  GmGmUmGmCmU*  mU*mU*mU</p>	
G018970	78	<p>CACAAUA  UCCCAAG  GACCUC</p>	<p>CACAAUAUC  CCAAGGACC  UCGUUUUAG  AGCUAGAAA  UAGCAAGUU  AAAAUAAGG  CUAGUCCGU  UAUCAACUU  GAAAAAGUG  GCACCGAGU  CGGUGCUUU  U</p>	<p>mC*mA*mC*AAUA  UCCCAAGGACCUC  GUUUUAGAmGmC  mUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGU  UAAAAUAAGGCU  AGUCCGUUAUCA  mAmCmUmUmGmA  mAmAmAmAmGmU  mGmGmCmAmCmC  mGmAmGmUmCmG  mGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	<p>chr6:29945116  -29945136</p>
G018971	79	<p>GGUCCUU  GGGAUUAU  UGUGUU</p>	<p>GGUCCUUGG  GAUAUUGUG  UUGUUUUAG  AGCUAGAAA  UAGCAAGUU  AAAAUAAGG  CUAGUCCGU  UAUCAACUU  GAAAAAGUG  GCACCGAGU  CGGUGCUUU  U</p>	<p>mG*mG*mU*CCUU  GGGAUUAUUGUGU  UGUUUUAGAmGm  CmUmAmGmAmAm  AmUmAmGmCAAG  UUAAAAUAAGGC  UAGUCCGUUAUC  AmAmCmUmUmGm  AmAmAmAmAmGm  UmGmGmCmAmCm  CmGmAmGmUmCm  GmGmUmGmCmU*  mU*mU*mU</p>	<p>chr6:29945118  -29945138</p>

G018972	80	GUCCUUG GGAUAAU GUGUUU	GUCCUUGGG AUAUUGUGU UUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mU*mC*CUUG GGAUAAUUGUGUU UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945119 -29945139
G018973	81	CUCCCAA CACAAUA UCCCA	CUCCCAAAC ACAAUAUCC CAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mU*mC*CCAA ACACAAUAUCCCA GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29945124 -29945144
G018974	82	UCCUCUA GCCACAUC UUCUG	UCCUCUAGC CACAUCUUC UGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG	mU*mC*mC*UCUA GCCACAUCUUCUG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU	chr6:29945176 -29945196

			GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018975	83	ACAGAAG AUGUGGC UAGAGG	ACAGAAGAU GUGGCUAGA GGUUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mC*mA*GAAG AUGUGGCUAGAG GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945177 -29945197
G018976	84	CCUCUAGC CACAUUCU UCUGU	CCUCUAGCC ACAUCUUCU GUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mC*mU*CUAG CCACAUCUUCUGU GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGC AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU* U*mU*mU	chr6:29945177 -29945197
G018977	85	CCCACAGA AGAUGUG GCUAG	CCCACAGAA GAUGUGGCU AGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU	mC*mC*mC*ACAG AAGAUGUGGCUA GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG	chr6:29945180 -29945200

			AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018978	86	GUCAGAU CCCACAGA AGAUG	GUCAGAUCC CACAGAAGA UGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mU*mC*AGAU CCCACAGAAGAU GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945187 -29945207
G018979	87	AUCUUCU GUGGGAU CUGACC	AUCUUCUGU GGGAUCUGA CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mU*mC*UUCU GUGGGAUCUGAC CGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945188 -29945208
G018980	88	CCCAGGCA	CCCAGGCAG	mC*mC*mC*AGGC	chr6:29945228

		GUGACAG UGCCC	UGACAGUGC CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	AGUGACAGUGCC CGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	-29945248
G018981	89	CUGGGCA CUGUCAC UGCCUG	CUGGGCACU GUCACUGCC UGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mU*mG*GGCA CUGUCACUGCCUG GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29945230 -29945250
G018982	90	CCUGGGC ACUGUCA CUGCCU	CCUGGGCAC UGUCACUGC CUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU	mC*mC*mU*GGGC ACUGUCACUGCCU GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC	chr6:29945231 -29945251

			CGGUGCUUU U	mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G021207	91	CCCUGGGC ACUGUCA CUGCC	CCCUGGGCA CUGUCACUG CCGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mC*mC*mC*UGGG CACUGUCACUGCC GUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29945232 -29945252
G018987	92	UUGGGUG UUGGGCG GAACAG	UUGGGUGUU GGGCGGAAC AGGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mU*mU*mG*GGUG UUGGGCGGAACA GGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945308 -29945328
G018988	93	UGGAUGU AUUGAGC AUGCGA	UGGAUGUAU UGAGCAUGC GAGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG	mU*mG*mG*AUGU AUUGAGCAUGCG AGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UAAAAUAAGGC	chr6:29945361 -29945381

			CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018989	94	GGAUGUA UUGAGCA UGCGAU	GGAUGUAUU GAGCAUGCG AUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mG*mG*mA*UGUA UUGAGCAUGCGA UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:29945362 -29945382
G018963	95	AACAUGA AGAAAGC AGGUGU	AACAUGAAG AAAGCAGGU GUGUUUUAG AGCUAGAAA UAGCAAGUU AAAAUAAGG CUAGUCCGU UAUCAACUU GAAAAAGUG GCACCGAGU CGGUGCUUU U	mA*mA*mC*AUGA AGAAAGCAGGUG UGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAG UUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:31382543 -31382563

[00170] Таблица 3. Дополнительные типовые S. Pyogenes PHK, разработанные для направления на HLA-A

ID направляющей последовательности	SEQ ID NO направляющей последовательности	Направляющая последовательность	Типовая полная последовательность направляющей РНК с РАМ (SEQ ID NOS: 439-471)	Типовая модифицированная последовательность направляющей РНК (четыре концевых остатка U являются необязательными и могут включать 0, 1, 2, 3, 4 или большее количество остатков U) (SEQ ID NOS: 472-504)	Геномные координаты
G021885	96	UAGSSCA CGGCGAU GAAAGCG	UAGSSCASGSSG AUGAAGCGGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAADAUDAAGCU AGUSSGUAUUA AAUAGCAAGUU AAADAUDAAGCU AGUSSGUAUUA	mU*mA*mG*SS SASGCGGAUG AAGCGGUUUU AGAmGmSmUm AmGmAmAmAm UmAmGmSAAG UUAADAUAAG GCUAGUSSGU UAUUCAmAmSm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmSmAmSm SmGmAmGmUm SmGmSmUmGm SmU*mU*mU*m U	chr6:2994281 5-29942835
G021886	97	GUAGSSC ACGGCGA UGAAGC	GUAGSSCASGGS GAUGAAGCGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAADAUDAAGCU AGUSSGUAUUA	mG*mU*mA*GC CCAAGCGGAUG AAGCGUUUUA GAmGmSmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU	chr6:2994281 6-29942836

			ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G021887	98	CGUAGCC CACGGCG AUGAAG	CGUAGCCCACGG CGAUGAAGGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mC*mG*mU*AG CCCACGGCGAU GAAGGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:2994281 7-29942837
G021888	99	CUUCAUC GCCGUGG GCUACG	CUUCAUCGCCGU GGGCUACGGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mC*mU*mU*CA UCGCCGUGGGC UACGGUUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG	chr6:2994281 7-29942837

				mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G021889	100	CGUGUCG UCCACGU AGCCCA	CGUGUCGUCCAC GUAGCCCAGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUUUU	mC*mG*mU*GU CGUCCACGUAG CCCAGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:2994282 8-29942848
G021890	101	UGGACGA CACGCAG UUCGUG	UGGACGACACGC AGUUCGUGGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mU*mG*mG*AC GACACGCAGU UCGUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994283 7-29942857

G021891	102	GGAUGG AGCCGCG GGCGCCG	GGAUGGAGCCGC GGGCGCCGGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUUUU	mG*mG*mA*UG GAGCCGCGGGC GCCGGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:2994288 5-29942905
G021892	103	GCGGGCG CCGUGGA UAGAGC	GCGGGCGCCGUG GAUAGAGCGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mG*mC*mG*GG CGCCGUGGAU AGAGCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994289 5-29942915
G021893	104	UGCUCUA UCCACGG CGCCCG	UGCUCUAUCCAC GGCGCCCGGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA	mU*mG*mC*UC UAUCCACGGCG CCCGGUUUUA GAmGmCmUmA	chr6:2994289 6-29942916

			AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUUUU	mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G021894	105	GGCGCCG UGGAUA GAGCAGG	GGCGCCGUGGAU AGAGCAGGGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mG*mG*mC*GC CGUGGAUAGA GCAGGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994289 8-29942918
G021895	106	GCGCCGU GGAUAG AGCAGGA	GCGCCGUGGAUA GAGCAGGAGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC	mG*mC*mG*CC GUGGAUAGAG CAGGAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU	chr6:2994289 9-29942919

			GGUGCUUUU	UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	
G021896	107	CGCCGUG GAUAGA GCAGGAG	CGCCGUGGAUAG AGCAGGAGGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mC*mG*mC*CG UGGAUAGAGC AGGAGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994290 0-29942920
G021897	108	GUGGAU AGAGCAG GAGGGGC	GUGGAUAGAGC AGGAGGGGCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AACUUGAAAAA GUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mU*mG*GA UAGAGCAGGA GGGGCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm	chr6:2994290 4-29942924

				GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	
G021898	109	GGCCCCU CCUGCUC UAUCCA	GGCCCCUCCUGC UCUAUCCAGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUIUUU	mG*mG*mC*CC CUCCUGCUCUA UCCAGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:2994290 5-29942925
G021899	110	AGCAGGA GGGGCCG GAGUAU	AGCAGGAGGGG CCGGAGUAUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AACUUGAAAAA GUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mA*mG*mC*AG GAGGGGCCGG AGUAUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m	chr6:2994291 2-29942932

				U	
G021900	111	GCAGGAG GGGCCGG AGUAUU	GCAGGAGGGGCC GGAGUAUUGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mG*mC*mA*GG AGGGGCCGGA GUAUUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994291 3-29942933
G021901	112	GGAGUG GCUCCGC AGAUACC	GGAGUGGCUCCG CAGAUACCGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA AAAUAAAGGCUA GUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUUUU	mG*mG*mA*GU GGCUCCGCAGA UACCGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:2994349 0-29943510
G021902	113	CUCCGCA GAUACCU GGAGAA	CUCCGCAGAUAC CUGGAGAAGUU UUAGAGCUAGA	mC*mU*mC*CG CAGAUACCU GAGAAGUUUU	chr6:2994349 7-29943517

			AAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	
G021903	114	UCCGCAG AUACCUG GAGAAC	UCCGCAGAUACC UGGAGAACGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mU*mC*mC*GC AGAUACCUGG AGAACGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994349 8-29943518
G021904	115	CAGAUAC CUGGAGA ACGGGA	CAGAUACCUGGA GAACGGGAGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA	mC*mA*mG*AU ACCUGGAGAA CGGGAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG	chr6:2994350 2-29943522

			ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	
G021905	116	UCCCGUU CUCCAGG UAUCUG	UCCCGUUCUCCA GGUAUCUGGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mU*mC*mC*CG UUCUCCAGGU AUCUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994350 2-29943522
G021906	117	GCGUCUC CUUCCCG UUCUCC	GCGUCUCCUCC CGUUCUCCGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUUUU	mG*mC*mG*UC UCCUCCCCGUU CUCCGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU	chr6:2994351 1-29943531

				mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G021907	118	GAAGGA GACGCUG CAGCGCA	GAAGGAGACGC UGCAGCGCAGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mG*mA*mA*GG AGACGCUGCA GCGCAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994352 0-29943540
G021908	119	AAGGAG ACGCUGC AGCGCAC	AAGGAGACGCU GCAGCGCACGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mA*mA*mG*GA GACGCUGCAGC GCACGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC	chr6:2994352 1-29943541

				mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G021909	120	AGAUCUA CAGGCGA UCAGGG	AGAUCUACAGGC GAUCAGGGGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mA*mG*mA*UC UACAGGCGAU CAGGGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994356 6-29943586
G021910	121	UGAUCGC CUGUAGA UCUCCC	UGAUCGCCUGUA GAUCUCCCGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA AAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUUUU	mU*mG*mA*UC GCCUGUAGAU CUCCCGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:2994356 9-29943589
G021911	122	GGGAGA UCUACAG	GGGAGAUCUAC AGGCGAUCAGU	mG*mG*mG*AG AUCUACAGGC	chr6:2994356 9-29943589

		GCGAUCA	UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUC AACUUGAAAAA GUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	GAUCAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	
G021912	123	CGGGAGA UCUACAG GCGAUC	CGGGAGAUCUAC AGGCGAUCGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mC*mG*mG*GA GAUCUACAGG CGAUCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994357 0-29943590
G021913	124	CGCCUGU AGAUCUC CCGGGC	CGCCUGUAGAUC UCCCGGGCGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUA	mC*mG*mC*CU GUAGAUCUCCC GGGCGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU	chr6:2994357 3-29943593

			GUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUIUUU	mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G021914	125	GGCCAGC CCGGGAG AUCUAC	GGCCAGCCCGGG AGAUCUACGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mG*mG*mC*CA GCCC GGGAGA UCUACGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm CmU*mU*mU*m U	chr6:2994357 8-29943598
G021915	126	UCCCGGG CUGGCCU CCCACA	UCCCGGGCUGGC CUCCACAGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUIUUU	mU*mC*mC*CG GGCUGGCCUCC CACAGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU	chr6:2994358 5-29943605

				mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G021916	127	GGGCUGG CCUCCCA CAAGGA	GGGCUGGCCUCC CACAAGGAGUU UUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUU AAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	mG*mG*mG*CU GGCCUCCCACA AGGAGUUUUA GAmGmCmUmA mGmAmAmAmU mAmGmCAAGU UAAAAUAAGG CUAGUCCGUU AUCAmAmCmU mUmGmAmAmA mAmAmGmUmG mGmCmAmCmC mGmAmGmUmC mGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:2994358 9-29943609
G021917	128	CUGAUCG CCUGUAG AUCUCC	CUGAUCGCCUGU AGAUCUCCGUUU UAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCUUUU	mC*mU*mG*AU CGCCUGUAGA UCUCCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmAm UmAmGmCAAG UUAAAAUAAG GCUAGUCCGU UAUCAmAmCm UmUmGmAmAm AmAmAmGmUm GmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGm	chr6:2994356 8-29943588

				CmU*mU*mU*m U	
--	--	--	--	------------------	--

\* Направляющая последовательность, описанная в этой Таблице, может быть немодифицированной, модифицированной по типовому профилю модификации, продемонстрированному в Таблице, или модифицированной по другому профилю модификации, описанному в настоящем документе или доступному в данной области техники.

[00171] Таблица 4. Типовые направляющие последовательности на HLA-A

SEQ ID NO	Направляющая последовательность	PAM	РНК-направляемый ДНК-связывающий агент	Геномные координаты (hg38)
129	AGGAUGGAGCCGCGG GCGCC	GTGGAT	S. aureus Cas9	chr6:29942884- 29942904
130	GGAAGGAGACGCUGC AGCGC	ACGGGT	S. aureus Cas9	chr6:29943519- 29943539
131	GACAGCGACCCGCGA GCCA	GAGGAT	S. aureus Cas9	chr6:29942863- 29942883
132	CGGGAAGGAGACGCU GCAGC	TTCT	CasX	chr6:29943517- 29943537
133	CCGUGCGCUGCAGCGU CUCC	TTCC	CasX	chr6:29943523- 29943543
134	ACGCAGUUCGUGCGG UUCGACAGC	NNNNCC	NME2	chr6:29942845- 29942869
135	UCGUGCGGUUCGACA GCGACGCCG	NNNNCC	NME2	chr6:29942852- 29942876
136	CAGCGACCCGCGAGC CAGAGGAU	NNNNCC	NME2	chr6:29942865- 29942889
137	GCUCUAUCCACGGCGC CCGCGGCU	NNNNCC	NME2	chr6:29942891- 29942915
138	UCCUGCUCUAUCCACG GCGCCCCG	NNNNCC	NME2	chr6:29942895- 29942919
139	CCGGCCCCUCCUGCUC UAUCCACG	NNNNCC	NME2	chr6:29942903- 29942927
140	UCCGGCCCCUCCUGCUC	NNNNCC	NME2	chr6:29942904-

	CUAUCCAC			29942928
141	GGGAAGGAGACGCUG CAGCGCACG	NNNNCC	NME2	chr6:29943518- 29943542
142	AGACGCUGCAGCGCAC GGGUACCA	NNNNCC	NME2	chr6:29943525- 29943549
143	GCGCACGGGUACCAGG GGCCACGG	NNNNCC	NME2	chr6:29943535- 29943559
144	CACGGGUACCAGGGGC CACGGGGC	NNNNCC	NME2	chr6:29943538- 29943562
145	ACGGGUACCAGGGGCC ACGGGGCG	NNNNCC	NME2	chr6:29943539- 29943563
146	CAGGGGCCACGGGGCG CCUCCCUG	NNNNCC	NME2	chr6:29943547- 29943571
147	CAGGGAGGCGCCCCGU GGCCCCUG	NNNNCC	NME2	chr6:29943547- 29943571
148	UCAGGGAGGCGCCCCG UGGCCCCU	NNNNCC	NME2	chr6:29943548- 29943572
149	CAGGCGAUCAGGGAG GCGCCCCGU	NNNNCC	NME2	chr6:29943555- 29943579
150	ACAGGCGAUCAGGGA GGCGCCCCG	NNNNCC	NME2	chr6:29943556- 29943580
151	UACAGGCGAUCAGGG AGGCGCCCC	NNNNCC	NME2	chr6:29943557- 29943581
152	GGGCGCCUCCUGAUC GCCUGUAG	NNNNCC	NME2	chr6:29943558- 29943582
153	GGGCGCCUCCUGAUCG CCUGUAGA	NNNNCC	NME2	chr6:29943559- 29943583
154	GAGAUCUACAGGCGA UCAGGGAGG	NNNNCC	NME2	chr6:29943563- 29943587
155	GGAGAUCUACAGGCG AUCAGGGAG	NNNNCC	NME2	chr6:29943564- 29943588
156	GGGAGAUCUACAGGC GAUCAGGGA	NNNNCC	NME2	chr6:29943565- 29943589
157	CUGAUCGCCUGUAGA	NNNNCC	NME2	chr6:29943568-

	UCUCCCCGGG			29943592
158	AUCGCCUGUAGAUCUC CCGGGCUG	NNNNCC	NME2	chr6:29943571- 29943595
159	UCGCCUGUAGAUCUCC CGGGCUGG	NNNNCC	NME2	chr6:29943572- 29943596
160	UUGUCUCCCCUCCUUG UGGGAGGC	NNNNCC	NME2	chr6:29943595- 29943619
161	AUUGUCUCCCCUCCU GUGGGAGG	NNNNCC	NME2	chr6:29943596- 29943620
162	CCCAUUGUCUCCCCU CCUUGUGG	NNNNCC	NME2	chr6:29943600- 29943624
163	GGAUGGAGCCGCGGG CGCCG	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29942885- 29942905
164	GCGGGCGCCGUGGAU AGAGC	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29942895- 29942915
165	UGCUCUAUCCACGGCG CCCG	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29942896- 29942916
166	GGCGCCGUGGAUAGA GCAGG	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29942898- 29942918
167	GCGCCGUGGAUAGAG CAGGA	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29942899- 29942919
168	CGCCGUGGAUAGAGC AGGAG	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29942900- 29942920
169	GUGGAUAGAGCAGGA GGGGC	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29942904- 29942924
170	GCGUCUCCUCCCCGUU CUCC	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943511- 29943531
171	GAAGGAGACGCUGCA GCGCA	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943520- 29943540
172	AAGGAGACGCUGCAG CGCAC	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943521- 29943541
173	GCUGCAGCGCACGGGU ACCA	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943529- 29943549
174	AGAUCUACAGGCGAU	NGG	Spy+Редактор_основ	chr6:29943566-

	CAGGG		аний	29943586
175	CUGAUCGCCUGUAGA UCUCC	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943568- 29943588
176	UGAUCGCCUGUAGAU CUCCC	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943569- 29943589
177	GGGAGAUCUACAGGC GAUCA	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943569- 29943589
178	CGGGAGAUCUACAGG CGAUC	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943570- 29943590
179	CGCCUGUAGAUCUCCC GGGC	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943573- 29943593
180	GGCCAGCCC GGGAGAU CUAC	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943578- 29943598
181	UCCCGGGCUGGCCUCC CACA	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943585- 29943605
182	GGGCUGGCCUCCCACA AGGA	NGG	Spy+Редактор_основ аний	chr6:29943589- 29943609

\*Направляющая последовательность, описанная в этой Таблице, может быть немодифицированной, или модифицированной по профилю модификации, описанному в настоящем документе или доступному в данной области техники.

[00172] **Таблица 5. Дополнительные типовые направляющие последовательности на HLA-A**

<b>ID направляющей последовательности</b>	<b>SEQ ID NO направляющей последовательности</b>	<b>Направляющая последовательность</b>	<b>Типовая полная последовательность направляющей РНК с РАМ (SEQ ID NOS: 505-532)</b>	<b>Типовая модифицированная последовательность направляющей РНК (четыре концевых остатка U являются необязательными и могут включать 0, 1, 2, 3, 4 или большее количество остатков U) (SEQ ID NOS: 533-560)</b>	<b>Геномные координаты (hg38)</b>
G0218	183	ACGACAC	ACGACACUGA	mA*mC*mG*ACACUG	chr6:29942

57		UGAUUGG CUUCUC	UUGGCUUCUC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	AUUGGCUUCUCGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmUmAmGm CAAGUUA AAAU AAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	469- 29942489
G0218 58	184	ACCCUCA UCCCCAC GGAC	ACCCUCAUC CCCCACGGAC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mA*mC*mC*CCUCAU CCCCACGGACGUUU UAGAmGmCmUmAmG mAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAU AAGG CUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29943 058- 29943078
G0218 59	185	GGCCCGUC CGUGGGG GAUGA	GGCCCGUCCG UGGGGGAUGA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mG*mC*CCGUCC GUGGGGGAUGAGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmUmAmGm CAAGUUA AAAU AAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29943 063- 29943083
G0218 60	186	GCCAGGU CGCCACA GUCUC	GCCAGGUCGC CCACAGUCUC GUUUUAGAGC	mG*mC*mC*AGGUCG CCCACAGUCUCGUUU UUAGAmGmCmUmAmG	chr6:29943 080- 29943100

			UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G0218 61	187	GUUUAGG CCAAAA UCCCC	GUUUAGGCCA AAAAUCCCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mU*mU*UAGGCC AAAAUCCCCCGUUU UAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29943 187- 29943207
G0218 62	188	GGCCAAA AAUCCCC CGGGU	GGCCAAAAAU CCCCCGGGU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mG*mC*CAAAAA UCCCCCGGGUGUUU UAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29943 192- 29943212
G0218 63	189	GACCAACC CGGGGG AUUUU	GACCAACCCG GGGGGAUUUU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU	mG*mA*mC*CAACCC GGGGGAUUUUGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG	chr6:29943 197- 29943217

			AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G0218 64	190	CACGGGCC CAAGGCU GCUGC	CACGGGCCCA AGGCUGCUGC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mC*mA*mC*GGGCCC AAGGCUGCUGC UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUA AAAU GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29943 812- 29943832
G0218 65	191	ACCCUCAU GCUGCAC AUGGC	ACCCUCAUGC UGCACAUGGC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mA*mC*mC*CUCAUG CUGCACAUGGCGUUU UAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAU CUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29944 349- 29944369
G0218 66	192	CCUCUAG GACCUUA AGGCC	CCUCUAGGAC CUUAAGGCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC	mC*mC*mU*CUAGGA CCUUAAGGCCCGUUU UAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmC AAGUUA AAAU CUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA	chr6:29944 996- 29945016

			UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G0218 67	193	GCUCCUU UCUGGUA UCUCAC	GCUCCUUUCU GGUAUCUCAC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mC*mU*CCUUUC UGGUAUCUCACGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29945 018- 29945038
G0218 68	194	GCUAUGG GGUUUCU UUGCAU	GCUAUGGGGU UUCUUUGCAU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mC*mU*AUGGGG UUUCUUUGCAUGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29945 341- 29945361
G0218 69	195	GCCUUUG CAGAAAC AAAGUC	GCCUUUGCAG AAACAAAGUC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU	mG*mC*mC*UUUGCA GAAACAAAGUCGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG	chr6:29945 526- 29945546

			CGGUGCUUUU	mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G0218 70	196	UGGACCA ACCGCCCU CCUGA	UGGACCAACC GCCCUCCUGA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mU*mG*mG*ACCAAC CGCCCUCCUGAGUUU UAGAmGmCmUmAmG mAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29944 880- 29944900 (несоответ ствие hg38=2)
G0218 71	197	AGCCUCUC UGACCUU UAGCA	AGCCUCUCUG ACCUUAGCA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mA*mG*mC*CUCUCU GACCUUAGCAGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	н/д
G0218 72	198	CGCCCUCC UGAAGGU CCUCA	CGCCCUCCUG AAGGUCCUCA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mC*mG*mC*CCUCCU GAAGGUCCUCAGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	н/д

G0218 73	200	CCGCCCUC CUGAAGG UCCUC	CCGCCCUC GAAGGUCCUC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mC*mC*mG*CCCUC UGAAGGUCCUCGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	н/д
G0218 74	201	UGGUUCC CUUUGAC ACACAC	UGGUUCCCUU UGACACACAC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mU*mG*mG*UUCCCU UUGACACACACGUUU UAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29943 794- 29943814 (несоответ ствие hg38=3)
G0218 75	202	GACCCUGC UAAAGGU CAGAG	GACCCUGCUA AAGGUCAGAG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUA AAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mA*mC*CCUGCU AAAGGUCAGAGGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	н/д
G0218 76	203	AGGACCU UCAGGAG	AGGACCUUCA GGAGGGCGGU	mA*mG*mG*ACCUUC AGGAGGGCGGUGUU	н/д

		GGCGGU	GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G0218 77	204	GCACACU UCUACCU GGGUCU	GCACACUUCU ACCUGGGUCU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mC*mA*CACUUC UACCUGGGUCUGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29944 671- 29944691 (несоответ ствие hg38=3)
G0218 78	205	GAGCCUC UCUGACC UUUAGC	GAGCCUCUCU GACCUUUAGC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mA*mG*CCUCUC UGACCUUUAGCGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	н/д
G0218 79	206	ACACUCCU CCAGCACA CAUG	ACACUCCUCC AGCACACAUG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC	mA*mC*mA*CUCCUC CAGCACACAUGGUUU UAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmC	chr6:29944 054- 29944074 (несоответ

			AAGUAAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	AAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	стбие hg38=2)
G0218 80	207	CUCUGACC UUUAGCA GGGUC	CUCUGACCUU UAGCAGGGUC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUAAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mC*mU*mC*UGACCU UUAGCAGGGUCGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	н/д
G0218 81	208	CAAGAU GCCACAU GUGUGC	CAAGAUAGCC ACAUGUGUGC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUAAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mC*mA*mA*GAUAGC CACAUUGUGCGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29944 043- 29944063 (несоответ ствие hg38=2)
G0218 82	209	UCUGACC UUUAGCA GGGUCA	UCUGACCUUU AGCAGGGUCA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUAAAAAU AAGGCUAGUC	mU*mC*mU*GACCUU UAGCAGGGUCAGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA	chr6:29944 450- 29944470 (несоответ ствие hg38=3)

			CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mAmCmUmUmGmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G0218 83	210	UGUAAAG GUGAGAG CCUGGA	UGUAAAGGUG AGAGCCUGGA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mU*mG*mU*AAAGGU GAGAGCCUGGAGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29945 274- 29945294 (несоответ ствие hg38=1)
G0218 84	211	GAAGGUC CCUGAGG ACCUUC	GAAGGUCCCU GAGGACCUUC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	mG*mA*mA*GGUCCC UGAGGACCUUCGUU UUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmA mAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	chr6:29944 859- 29944879 (несоответ ствие hg38=3)

\* Направляющая последовательность, описанная в этой Таблице, может быть немодифицированной, модифицированной по типовому профилю модификации, продемонстрированному в Таблице, или модифицированной по другому профилю модификации, описанному в настоящем документе или доступному в данной области техники.

[00173] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPHK HLA-A содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-95. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPHK HLA-A содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 7, 13-

18, 22, 26, 31, 33, 37-41, 43, 45, 47, 57, 59, 62, 66, 87. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPHK HLA-A содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 13-18, 26, 37-39, 41, 43, 45, 62. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPHK HLA-A содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 13-18. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPHK HLA-A содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 13-17. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPHK HLA-A содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 37-39, 41, 43 и 45. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPHK HLA-A содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 37-39.

[00174] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPHK содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-211. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит направляющую последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211.

[00175] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов  $\pm$  10 нуклеотидов в пределах геномных координат, из **Таблиц 2-5**. В контексте данного документа термин «по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов  $\pm$  10 нуклеотидов в пределах геномных координат» означает, например, по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, при этом геномные координаты включают 10 нуклеотидов в 5'-направлении и 10 нуклеотидов в 3'-направлении из диапазонов, приведенных в **Таблицах 2-5**. Например, РНК, направленная на HLA-A, может содержать 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат от chr6:29942864 до chr6: 29942903 или от chr6:29943528 до chr6:29943609, включая граничные нуклеотиды этих диапазонов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит направляющую последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, содержащей 10 смежных нуклеотидов  $\pm$  10 нуклеотидов в пределах геномных координат, из **Таблиц 1-2 и 5**, или направляющую последовательность, комплементарную по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам последовательности, содержащей 10 смежных нуклеотидов  $\pm$  10 нуклеотидов в пределах геномных координат, из **Таблицы 4**. В

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности выбранной из последовательности, состоящей из 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, содержащей 10 смежных нуклеотидов  $\pm$  10 нуклеотидов в пределах геномных координат, из **Таблиц 1-2 и 5**, или направляющую последовательность, комплементарную по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам последовательности, содержащей 10 смежных нуклеотидов  $\pm$  10 нуклеотидов в пределах геномных координат, из **Таблиц 4**.

[00176] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК из **Таблиц 2-5** содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов  $\pm$  10 нуклеотидов в пределах геномных координат, из **Таблиц 2-5**. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов  $\pm$  10 нуклеотидов в пределах геномных координат, из **Таблиц 2-5**.

[00177] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления настоящего















вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 209. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 210. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 211.

[00178] В настоящем документе предложены дополнительные варианты осуществления РНК, направленной на HLA-A, включая, *например*, типовые модификации направляющих РНК.

## 2. Генетические модификации HLA-A

[00179] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции, описанные в настоящем документе, генетически модифицируют по меньшей мере один нуклеотид в гене HLA-A в клетке. Генетические модификации охватывают популяцию модификаций, возникающих в результате контакта клетки с системой редактирования генов (*например*, популяцию редакций, возникающих в результате действия Cas9 и РНК, направленной на HLA-A, или охватывают совокупность модификаций, возникающих в результате действия BC22 и РНК, направленной на HLA-A).

[00180] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854- chr6:29942913 и chr6:29943518- chr6:29943619.

[00181] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942864-chr6: 29942903.

[00182] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-chr6:29943609.

[00183] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; и chr6:29942883-29942903.

[00184] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609.

[00185] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942876-29942897.

[00186] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах

геномных координат chr6:29943528-chr6:29943550.

[00187] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, и chr6:29942877-29942897.

[00188] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, и chr6:29943530-29943550.

[00189] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046.

[00190] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046.

[00191] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046, chr6:29934330-29934350, chr6:29943115-29943135, chr6:29943135-29943155, chr6:29943140-29943160, chr6:29943590-29943610, chr6:29943824-29943844, chr6:29943858-29943878, chr6:29944478-29944498, и chr6:29944850-29944870.

[00192] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046.

[00193] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609.

[00194] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; и chr6:29942883-29942903.

[00195] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609.

[00196] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29890117-29890137, chr6:29927058-29927078, chr6:29934330-29934350, chr6:29942541-29942561, chr6:29942542-29942562, chr6:29942543-29942563, chr6:29942543-29942563, chr6:29942550-29942570, chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, chr6:29942876-29942896, chr6:29942877-29942897, chr6:29942883-29942903, chr6:29943062-29943082, chr6:29943063-29943083, chr6:29943092-29943112, chr6:29943115-29943135, chr6:29943118-29943138, chr6:29943119-29943139, chr6:29943120-29943140, chr6:29943126-29943146, chr6:29943128-29943148, chr6:29943129-29943149, chr6:29943134-29943154, chr6:29943134-29943154, chr6:29943135-29943155, chr6:29943136-29943156, chr6:29943140-29943160, chr6:29943142-29943162, chr6:29943143-29943163, chr6:29943188-29943208, chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, chr6:29943530-29943550, chr6:29943536-29943556, chr6:29943537-29943557, chr6:29943538-29943558, chr6:29943549-29943569, chr6:29943556-29943576, chr6:29943589-29943609, chr6:29943590-29943610, chr6:29943590-29943610, chr6:29943599-29943619, chr6:29943600-29943620, chr6:29943601-29943621, chr6:29943602-29943622, chr6:29943603-29943623, chr6:29943774-29943794, chr6:29943779-29943799, chr6:29943780-29943800, chr6:29943822-29943842, chr6:29943824-29943844, chr6:29943857-29943877, chr6:29943858-29943878, chr6:29943859-29943879, chr6:29943860-29943880, chr6:29944026-29944046, chr6:29944077-29944097, chr6:29944078-29944098, chr6:29944458-29944478, chr6:29944478-29944498, chr6:29944597-29944617, chr6:29944642-29944662, chr6:29944643-29944663, chr6:29944772-29944792, chr6:29944782-29944802, chr6:29944850-29944870,

chr6:29944907-29944927, chr6:29945024-29945044, chr6:29945097-29945117,  
 chr6:29945104-29945124, chr6:29945105-29945125, chr6:29945116-29945136,  
 chr6:29945118-29945138, chr6:29945119-29945139, chr6:29945124-29945144,  
 chr6:29945176-29945196, chr6:29945177-29945197, chr6:29945177-29945197,  
 chr6:29945180-29945200, chr6:29945187-29945207, chr6:29945188-29945208,  
 chr6:29945228-29945248, chr6:29945230-29945250, chr6:29945231-29945251,  
 chr6:29945232-29945252, chr6:29945308-29945328, chr6:29945361-29945381,  
 chr6:29945362-29945382, и chr6:31382543-31382563.

[00197] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942815-29942835, chr6:29942816-29942836, chr6:29942817-29942837, chr6:29942817-29942837, chr6:29942828-29942848, chr6:29942837-29942857, chr6:29942885-29942905, chr6:29942895-29942915, chr6:29942896-29942916, chr6:29942898-29942918, chr6:29942899-29942919, chr6:29942900-29942920, chr6:29942904-29942924, chr6:29942905-29942925, chr6:29942912-29942932, chr6:29942913-29942933, chr6:29943490-29943510, chr6:29943497-29943517, chr6:29943498-29943518, chr6:29943502-29943522, chr6:29943502-29943522, chr6:29943511-29943531, chr6:29943520-29943540, chr6:29943521-29943541, chr6:29943566-29943586, chr6:29943569-29943589, chr6:29943569-29943589, chr6:29943570-29943590, chr6:29943573-29943593, chr6:29943578-29943598, chr6:29943585-29943605, chr6:29943589-29943609, chr6:29943568-29943588, и chr6:29942815-29942835.

[00198] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942884-29942904, chr6:29943519-29943539, chr6:29942863-29942883.

[00199] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация включает индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943517-29943537, и chr6:29943523-29943543.

[00200] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942845-29942869, chr6:29942852-29942876, chr6:29942865-29942889, chr6:29942891-29942915, chr6:29942895-29942919, chr6:29942903-29942927, chr6:29942904-29942928, chr6:29943518-29943542, chr6:29943525-29943549, chr6:29943535-29943559, chr6:29943538-29943562, chr6:29943539-29943563, chr6:29943547-29943571, chr6:29943547-29943571, chr6:29943548-29943572, chr6:29943555-29943579, chr6:29943556-29943580, chr6:29943557-29943581, chr6:29943558-29943582, chr6:29943559-29943583, chr6:29943563-29943587, chr6:29943564-29943588, chr6:29943565-29943589, chr6:29943568-29943592, chr6:29943571-29943595, chr6:29943572-29943596,

chr6:29943595-29943619, chr6:29943596-29943620, chr6:29943600-29943624.

[00201] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942885-29942905, chr6:29942895-29942915, chr6:29942896-29942916, chr6:29942898-29942918, chr6:29942899-29942919, chr6:29942900-29942920, chr6:29942904-29942924, chr6:29943511-29943531, chr6:29943520-29943540, chr6:29943521-29943541, chr6:29943529-29943549, chr6:29943566-29943586, chr6:29943568-29943588, chr6:29943569-29943589, chr6:29943569-29943589, chr6:29943570-29943590, chr6:29943573-29943593, chr6:29943578-29943598, chr6:29943585-29943605, и chr6:29943589-29943609.

[00202] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942469-29942489, chr6:29943058-29943078, chr6:29943063-29943083, chr6:29943080-29943100, chr6:29943187-29943207, chr6:29943192-29943212, chr6:29943197-29943217, chr6:29943812-29943832, chr6:29944349-29944369, chr6:29944996-29945016, chr6:29945018-29945038, chr6:29945341-29945361, chr6:29945526-29945546.

[00203] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат: chr6:29942876-29942897.

[00204] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, и chr6:29942877-29942897.

[00205] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат: chr6:29943528-chr6:29943550.

[00206] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация содержит индел, замену С на Т или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, и chr6:29943530-29943550.

[00207] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит любую одну или большее количество вставок, делеций, замен или дезаминирований по меньшей мере одного нуклеотида в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит вставку 1, 2, 3, 4 или 5 или большего количества нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит делецию 1, 2, 3, 4 или 5 или большего количества нуклеотидов в целевой последовательности. В других вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит вставку 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или большего количества нуклеотидов в целевой последовательности. В других вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или большего количества нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит индел, которая обычно определяется в данной области техники как вставка или делеция менее чем 1000 пар оснований (bp). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит индел, которая приводит к мутации со сдвигом рамки считывания в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит замену 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или большего количества нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит одну или большее количество вставок, делеций или замен нуклеотидов в результате включения матричной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A содержит вставку донорной нуклеиновой кислоты в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация HLA-A не является временной.

### 3. Эффективность РНК, разработанных для направления на HLA-A,

[00208] Эффективность РНК, направленной на HLA-A, можно определить с помощью методов, доступных в данной области техники, которые оценивают эффективность редактирования направляющей РНК и экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения снижение или устранение белка HLA-A на поверхности клетки можно определить путем сравнения с немодифицированной клеткой (или «относительно немодифицированной клетки»). Сконструированную клетку или клеточную популяцию также можно сравнить с популяцией немодифицированных клеток.

[00209] Термин «немодифицированная клетка» (или «немодифицированные клетки») относится к контрольной клетке (или клеткам) того же типа клеток в эксперименте или тесте, в котором «немодифицированная» контрольная клетка не контактировала с РНК, направленной на HLA-A. Следовательно, немодифицированная клетка (или клетки) может быть клеткой, которая не контактировала с направляющей РНК, или клеткой, которая контактировала с направляющей РНК которая не нацелена на HLA-A.

[00210] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность РНК, направленной на HLA-A, определяют путем измерения уровней белка HLA-A на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения уровни белка HLA-A измеряют с помощью проточной цитометрии (*например*, с антителом против HLA-A2/HLA-A3). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток обогащена (*например*, с помощью FACS или MACS) и по меньшей мере на 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93% или 94% HLA-A-

отрицательна по данным проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток не обогащена (например, с помощью FACS или MACS) и по меньшей мере на 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93% или 94% HLA-A-отрицательна по данным проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 65% HLA-A-отрицательной по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 70% HLA-A-отрицательной по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 80% HLA-A-отрицательной по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 90% HLA-A-отрицательной по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 95% MHC I-отрицательной по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 100% HLA-A-отрицательной по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток.

[00211] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективная РНК, направленная на HLA-A, может быть определена путем измерения реакций иммунных клеток *in vitro* или *in vivo* (*например*, CD8+ Т-клеток) на генетически модифицированную целевую клетку. Например, сниженная реакция CD8+ Т-клеток указывает об эффективной РНК, направленной на HLA-A. Реакции CD8+ Т-клеток можно оценить с помощью анализа, который измеряет реакции активации CD8+ Т-клеток, *например*, пролиферацию CD8+ Т-клеток, экспрессию маркеров активации и/или продукцию цитокинов (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) (*например*, проточная цитометрия, ELISA). Реакцию CD8+ Т-клеток можно оценить *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения реакцию CD8+ Т-клеток можно оценить путем совместного культивирования генетически модифицированных клеток с CD8+ Т-клетками *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активность CD8+ Т-клеток можно оценить на модели *in vivo*, *например*, на модели грызунов. В модели *in vivo*, *например*, генетически модифицированные клетки можно вводить вместе с CD8+ Т-клеткой; выживаемость генетически модифицированных клеток указывает о способности избежать лизиса CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает *in vivo* в присутствии CD8+ Т-клеток в течение более 1, 2, 3, 4, 5 или 6

или большего количества недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает *in vivo* в присутствии CD8<sup>+</sup> Т-клеток в течение по меньшей мере от одной недели до шести недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает *in vivo* в присутствии CD8<sup>+</sup> Т-клеток в течение по меньшей мере от двух недель до четырех недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает *in vivo* в присутствии CD8<sup>+</sup> Т-клеток в течение по меньшей мере от четырех недель до шести недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает *in vivo* в присутствии CD8<sup>+</sup> Т-клеток в течение более шести недель.

[00212] Эффективность РНК, направленной на HLA-A, можно также оценить по выживаемости клеток после редактирования. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере от одной недели до шести недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере двух недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере трех недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере четырех недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере пяти недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере шести недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере от одной недели до двенадцати недель. Жизнеспособность генетически модифицированной клетки можно измерить с применением стандартных методов, включая, *например*, измерение гибели клеток, окрашивание живых/мертвых клеток с помощью проточной цитометрии или пролиферации клеток.

[00213] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированную клетку оценивают по персистенции сконструированной клетки человека, в которой снижена или устранена экспрессия HLA-A и которая является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В контексте данного документа термин «персистенция» относится к способности сконструированной клетки существовать в среде *in vitro* и/или *in vivo* с присутствием реактивных или отвечающих Т-клеток и/или НК-клеток, *например*, способности существовать *in vivo* после переноса в организм реципиента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные Т-клетки человека защищают от НК-опосредованного отторжения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соотношение жизнеспособных сконструированных клеток *in vivo* в присутствии НК-клеток по

отношению к жизнеспособным сконструированным *in vivo* клеткам в отсутствие НК-клеток составляет по меньшей мере 0,3:1 или больше, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 80 дней или по меньшей мере 90 дней после переноса в организм реципиента, как продемонстрировано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере через 90 дней после переноса в организм реципиента соотношение жизнеспособных сконструированных клеток *in vivo* в присутствии НК-клеток по отношению к жизнеспособным сконструированным клеткам *in vivo* в отсутствие НК-клеток составляет по меньшей мере 0,4:1 или больше, 0,5:1 или больше, 0,6:1 или больше, 0,7:1 или больше, 0,8:1 или больше или 0,9:1 или больше, как продемонстрировано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные Т-клетки человека защищают от отторжения опосредованного CD8<sup>+</sup> Т-клетками.

[00214] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки можно оценивать с помощью реакции смешанных лимфоцитов (MLR). (См., например, DeWolf et al., *Transplantation* 100:1639-1649 (2017)). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки человека смешивают с мечеными неотредактированными (не сконструированными) отвечающими Т-клетками, а анализ MLR измеряет пролиферацию отвечающих Т-клеток, активированных путем аллораспознавания (*m. e.* посредством несовпадающих молекул HLA на поверхности сконструированной клетки человека).

Способы и композиции для снижения или устранения МНС класса II и дополнительных модификаций

[00215] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мультиплексное редактирование генов можно проводить в клетке. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы включают снижение или устранение экспрессии белка HLA-A на поверхности клетки, включающее генетическую модификацию гена HLA-A, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей РНК, направленную на HLA-A, описанную в настоящем документе; и, необязательно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, которая кодирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, при этом указанный способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с одной или большим количеством композиций, выбранных из: (а) направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к гену СИТА; (b) направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент в локус в геноме клетки, отличный от HLA-A или СИТА; и (с) донорную нуклеиновую кислоту для введения в геном клетки.

#### 1. Нокаут МНС класса II

[00216] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы снижения или устранения экспрессии белка HLA-A на поверхности

клетки путем генетической модификации HLA-A, как описано в настоящем документе, при этом описанные способы и композиции дополнительно обеспечивают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки по отношению к немодифицированной клетке. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем приведения клетки в контакт с РНК, направленной на СИТА. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00217] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы снижения поверхностной экспрессии MHC класса II на сконструированной клетке человека. На экспрессию MHC класса II влияют различные белки. (См., например, Crivello et al., Journal Immunology 202:1895-1903 (2019).) Например, белок СИТА действует как активатор транскрипции (активируя промотор MHC класса II) и необходим для экспрессии белка MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена, выбранного из: СИТА, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, RFX5, RFXB/ANK, RFXAP, CREB, NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B и NF- $\kappa$ B. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена СИТА. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена HLA-DQ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена RFX5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена RFXB/ANK. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена RFXAP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена CREB. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена NK- $\kappa$ B. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена NK- $\kappa$ B. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется путем генетической модификации гена NK- $\kappa$ B.

[00218] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы получения сконструированной клетки человека, в которой снижена или устранена экспрессия белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, дополнительно включающие снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают приведение клетки в контакт с РНК, направленной на СПТА.

[00219] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность РНК, направленной на СПТА, определяют путем измерения уровней белка СПТА в клетке. Уровни белка СПТА можно определить, *например*, с помощью клеточного лизата и вестерн-блоттинга с антителом анти-СПТА. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность РНК, направленной на СПТА, определяют путем измерения уровней белка СПТА в ядре клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность РНК, направленной на СПТА, определяют путем измерения уровней мРНК СПТА в клетке. Уровни мРНК СПТА можно определить, *например*, с помощью RT-PCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения снижение уровней белка СПТА и/или мРНК СПТА в целевой клетке по сравнению с немодифицированной клеткой указывает об эффективной РНК, направленной на СПТА.

[00220] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность РНК, направленной на СПТА, определяют путем измерения снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II целевыми клетками. Белок СПТА действует как трансактиватор, активируя промотор MHC класса II, и необходим для экспрессии белка MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия белка MHC класса II может быть обнаружена на поверхности целевых клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессию белка MHC класса II измеряют с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против белка MHC класса II (*например*, анти-HLA-DR, -DQ, -DP) можно применять для обнаружения экспрессии белка MHC класса II, *например*, с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения снижение или устранение белка MHC класса II на поверхности клетки (или популяции клеток) по сравнению с немодифицированной клеткой (или популяцией немодифицированных клеток) указывает об эффективной РНК, направленной на СПТА. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка (или популяция клеток), контактировавшая с конкретной РНК, направленной на СПТА, и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, которая является отрицательной в отношении белка MHC класса II по данным проточной цитометрии, указывает об эффективной РНК, направленной на СПТА.

[00221] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия

белка МНС класса II снижается или устраняется в популяции клеток с применением описанных в настоящем документе способов и композиций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток обогащена (например, с помощью FACS или MACS) и по меньшей мере на 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93% или 94% является отрицательной по МНС класса II по данным проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток не обогащена (например, с помощью FACS или MACS) и по меньшей мере на 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93% или 94% является отрицательной по МНС класса II по данным проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток.

[00222] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 65% МНС II отрицательной, по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 70% МНС класса II отрицательной, по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 80% МНС II отрицательной, по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 90% МНС класса II отрицательной, по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 91% МНС класса II отрицательной, по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 92% МНС II отрицательной, по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 93% МНС класса II отрицательной, по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток является по меньшей мере на 94% МНС класса II отрицательной, по данным проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток.

[00223] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток вызывает ослабленный ответ иммунных клеток *in vitro* или *in vivo* (например, CD4+ Т-клетки). Реакцию CD4+ Т-клеток можно оценить с помощью анализа, который измеряет активационную реакцию CD4+ Т-клеток, например, пролиферацию CD4+ Т-клеток, экспрессию маркеров активации и/или продукцию цитокинов (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ) (например, проточная цитометрия, ELISA). Реакцию CD4+ Т-клеток можно оценить в анализах клеточных культур *in vitro*, в которых генетически модифицированную клетку

культивируют совместно с клетками, содержащими CD4<sup>+</sup> Т-клетки. Например, сконструированную клетку можно культивировать совместно, *например*, с РВМС, очищенными CD3<sup>+</sup> Т-клетками, содержащими CD4<sup>+</sup> Т-клетки, очищенными CD4<sup>+</sup> Т-клетками или линией CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Реакцию CD4<sup>+</sup> Т-клеток, вызванную сконструированной клеткой, можно сравнить с реакцией, вызванной немодифицированной клеткой.

[00224] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена сконструированная человеческая клетка, в которой снижена или устранена экспрессия HLA-A и белка МНС класса II на клеточной поверхности, при этом клетка содержит генетическую модификацию гена HLA-A, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, и при этом клетка содержит модификацию гена СРТА. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка вызывает сниженную реакцию CD4<sup>+</sup> Т-клеток и вызывает сниженную реакцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

## 2. Внедряются экзогенные нуклеиновые кислоты

[00225] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы и композиции для снижения или устранения экспрессии белка HLA-A на поверхности клетки путем генетической модификации HLA-A, как описано в настоящем документе, при этом способы и композиции дополнительно обеспечивают экспрессию белка, кодируемого экзогенной нуклеиновой кислотой (*например*, антителом, химерным антигенным рецептором (CAR), Т-клеточным рецептором (TCR), цитокином или цитокиновым рецептором, хемокином или хемокиновым рецептором, ферментом, слитым белком или другим типом клеточно-поверхностно-связанного или растворимого полипептида). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует белок, который экспрессируется на поверхности клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности клетки (описанный далее в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированная клетка может функционировать как «клеточная фабрика» для экспрессии секретируемого полипептида, который кодируется экзогенной нуклеиновой кислотой, включая, *например*, источник для непрерывного производства полипептида *in vivo* (как описано далее в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00226] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы обеспечивают снижение экспрессии белка HLA-A на поверхности клетки путем генетической модификации гена HLA-A и включают приведение клетки в контакт с композицией, содержащей РНК, направленную на HLA-A, описанную в настоящем

документе, при этом указанный способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с экзогенной нуклеиновой кислотой.

[00227] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы обеспечивают снижение или устранение экспрессии белка HLA-A на поверхности клетки, путем генетической модификации клетки с помощью одной или большего количества композиций, содержащих РНК, направленную на HLA-A, как описано в настоящем документе, экзогенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид (*например*, нацеливающий рецептор) и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, которая кодирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00228] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы обеспечивают снижение или устранение экспрессии белка HLA-A и белка МНС класса II на поверхности клетки путем генетической модификации клетки с помощью одной или большего количества композиций, содержащих РНК, направленную на HLA-A, как описано в настоящем документе, РНК, разработанную для направления на СИТА, экзогенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид (*например*, нацеливающий рецептор) и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, которая кодирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00229] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует растворимый полипептид. В контексте настоящего документа термин «растворимый» полипептид относится к полипептиду, секретлируемому клеткой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой фермент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой хемокин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой слитый белок.

[00230] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует фрагмент антитела (*например*, Fab, Fab2). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует одноцепочечное антитело (*например*, scFv). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой IgG, IgM, IgD, IgA

или IgE. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой антитело IgG4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи содержит мутации, которые, как известно, снижают эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи содержит мутации, которые, как известно, усиливают эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой однодоменное антитело (*например*, антитело, содержащее только домен VH).

[00231] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нейтрализующее антитело. Нейтрализующее антитело нейтрализует активность целевого антигена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой нейтрализующее антитело против антигена вируса. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело нейтрализует целевой вирусный антиген, блокируя способность вируса инфицировать клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для измерения нейтрализующей активности антитела можно применять клеточный анализ нейтрализации. Конкретные клетки и показания будут зависеть от целевого антигена нейтрализующего антитела. Полумаксимальная эффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) антитела может быть измерена в анализе нейтрализации на основе клеток, в которых более низкая  $EC_{50}$  указывает на более активное нейтрализующее антитело.

[00232] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело, которое связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или нарушением (*см.*, *например*, заболевания и нарушения, описанные в Разделе IV).

[00233] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который экспрессируется на поверхности клетки (*т.е.* белок, связанный с поверхностью клетки). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор. «Нацеливающий рецептор» представляет собой рецептор, присутствующий на поверхности клетки, например, T-клетки, для обеспечения связывания клетки с целевым сайтом, например, конкретной клеткой или тканью в организме. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой CAR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой лиганд, индуцирующий пролиферацию

(APRIL). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой TRuC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR) (например, экспрессированный на В-клетке). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор.

[00234] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающие рецепторы включают химерный антигенный рецептор (CAR), Т-клеточный рецептор (TCR) и рецептор для молекулы клеточной поверхности, функционально связанные по меньшей мере через трансмембранный домен во внутреннем сигнальном домене, способный активировать Т-клетку после связывания части внеклеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения CAR относится к внеклеточному домену распознавания антигена, например, scFv, VHH, нанотелу; функционально связан с внутриклеточным сигнальным доменом, который активирует Т-клетку при связывании антигена. CAR состоят из четырех областей: домен распознавания антигена, внеклеточная шарнирная область, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен Т-клеток. Такие рецепторы хорошо известны в данной области техники (см., например, WO2020092057, WO2019191114, WO2019147805, WO2018208837). Также рассматриваются универсальный CAR (UniCAR) для распознавания различных антигенов (см., например, EP 2 990 416 A1) и обратный универсальный CAR (RevCAR), который способствует связыванию иммунной клетки с целевой клеткой через адаптерную молекулу (см., например, WO 2019238722). CAR могут быть нацелены на любой антиген, к которому может быть разработано антитело, и, как правило, направлены на молекулы, расположенные на поверхности клетки или ткани, на которые должны быть нацелены. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор содержит домен распознавания антигена (например, домен распознавания ракового антигена и субъединицу TCR (например, TRuC) (см. Baeuerle et al. Nature Communications 2087 (2019).)

[00235] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует генетически модифицированный TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует генетически модифицированный TCR со специфичностью в отношении полипептида, который экспрессируется раковыми клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, специфичный к антигену гена опухоли Вильмса (WT1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует TCR, специфичный для WT1 (см., например,

WO2020/081613A1).

[00236] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота вставлена в геном целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки путем гомологичной рекомбинации (HR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки путем вставки тупым концом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки путем негомологичного соединения концов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в безопасный локус в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в один из следующих локусов: локус TRAC, локус B2M, локус AAVS1 и/или локус СИТА. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота вводится в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления составная композиция липида и нуклеиновой кислоты представляет собой липидную наночастицу (LNP).

[00237] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией HLA-A и содержащую экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией HLA-A, которая секретирует и/или экспрессирует полипептид, который кодируется экзогенной нуклеиновой кислотой, интегрированной в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией HLA-A и/или сниженными или устраненными уровнями HLA-A в ядре клетки, а также со сниженной экспрессией белка MHC класса II, а также которая секретирует и/или экспрессирует полипептид, который кодируется экзогенной нуклеиновой кислотой, интегрированной в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка вызывает сниженную реакцию CD4<sup>+</sup> Т-клеток и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

[00238] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена аллогенная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия MHC класса II и белка HLA-A на поверхности клетки, при этом указанная клетка содержит модификацию гена HLA-A, как описано в настоящем документе, при этом указанная клетка содержит модификацию гена СИТА, и при этом указанная клетка дополнительно

содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид (например, нацеливающий рецептор).

[00239] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы снижения или устранения экспрессии белка HLA-A на поверхности клетки путем генетической модификации HLA-A, как описано в настоящем документе, при этом указанные способы дополнительно обеспечивают снижение экспрессии одного или большего количества дополнительных целевых генов (*например*, TRAC, TRBC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительные генетические модификации обеспечивают дополнительные преимущества применения генетически модифицированных клеток для адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00240] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы обеспечивают снижение или устранение экспрессии белка HLA-A на поверхности клетки, при этом указанные способы включают генетическую модификацию клетки с помощью одной или большего количества композиций, содержащих РНК, направленную на HLA-A, как описано в настоящем документе, РНК, разработанную для направления на СРТА, экзогенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид (например, нацеливающий рецептор), направляющую РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, тем самым снижая или устраняя экспрессию другого гена, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительный целевой ген представляет собой TRAC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительный целевой ген представляет собой TRBC.

#### Типовые типы клеток

[00241] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции, описанные в настоящем документе, генетически модифицируют клетку человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированная клетка называется сконструированной клеткой. Сконструированная клетка относится к клетке (или потомству клетки), содержащей сконструированную генетическую модификацию, *например*, которая контактировала с системой редактирования генов и генетически модифицирована системой редактирования генов. Термины «сконструированная клетка» и «генетически модифицированная клетка» применяются взаимозаменяемо. Сконструированная клетка человека может представлять собой любой из иллюстративных типов клеток, описанных в настоящем документе. Кроме того, поскольку молекулы МНС

класса I экспрессируются на всех ядерных клетках, сконструированная клетка человека может быть любой ядерной клеткой.

[00242] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, когда клетка является гомозиготной по HLA-B, аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B\*07:02; HLA-B\*08:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*35:01; HLA-B\*40:01; HLA-B\*57:01; HLA-B\*14:02; HLA-B\*15:01; HLA-B\*13:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*38:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*44:03; HLA-B\*51:01; HLA-B\*49:01; HLA-B\*15:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*27:05; HLA-B\*35:03; HLA-B\*18:01; HLA-B\*52:01; HLA-B\*51:01; HLA-B\*37:01; HLA-B\*53:01; HLA-B\*55:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*35:02; HLA-B\*15:01; и HLA-B\*40:02.

[00243] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, когда клетка является гомозиготной по HLA-C, аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C\*07:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*04:01 HLA-C\*03:04; HLA-C\*06:02; HLA-C\*08:02; HLA-C\*03:03; HLA-C\*06:02; HLA-C\*16:01; HLA-C\*12:03; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*15:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*03:04; HLA-C\*12:03; HLA-C\*02:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*12:02; HLA-C\*14:02; HLA-C\*06:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*03:03; HLA-C\*07:04; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*04:01; и HLA-C\*02:02.

[00244] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, и аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B\*07:02; HLA-B\*08:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*35:01; HLA-B\*40:01; HLA-B\*57:01; HLA-B\*14:02; HLA-B\*15:01; HLA-B\*13:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*38:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*44:03; HLA-B\*51:01; HLA-B\*49:01; HLA-B\*15:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*27:05; HLA-B\*35:03; HLA-B\*18:01; HLA-B\*52:01; HLA-B\*51:01; HLA-B\*37:01; HLA-B\*53:01; HLA-B\*55:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*35:02; HLA-B\*15:01 и HLA-B\*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C\*07:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*04:01 HLA-C\*03:04; HLA-C\*06:02; HLA-C\*08:02; HLA-C\*03:03; HLA-C\*06:02; HLA-C\*16:01; HLA-C\*12:03; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*15:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*03:04; HLA-C\*12:03; HLA-C\*02:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*12:02; HLA-C\*14:02; HLA-C\*06:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*03:03; HLA-C\*07:04; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*04:01; и HLA-C\*02:02.

[00245] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C сконструированной клетки человека выбраны из любой из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B\*07:02 и HLA-C\*07:02; HLA-B\*08:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*44:02 и HLA-C\*05:01; HLA-B\*35:01 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*40:01 и HLA-C\*03:04; HLA-B\*57:01 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*14:02 и HLA-C\*08:02; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*03:03; HLA-B\*13:02 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*16:01; HLA-B\*38:01 и HLA-C\*12:03; HLA-B\*18:01 и



собой HLA-B\*52:01 и HLA-C\*12:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*51:01 и HLA-C\*14:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*37:01 и HLA-C\*06:02. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*53:01 и HLA-C\*04:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*55:01 и HLA-C\*03:03. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*44:02 и HLA-C\*07:04. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*44:03 и HLA-C\*07:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*35:02 и HLA-C\*04:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*15:01 и HLA-C\*04:01. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*40:02 и HLA-C\*02:02.

[00246] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой иммунную клетку. В контексте настоящего документа термин «иммунная клетка» относится к клетке иммунной системы, включая, *например*, лимфоцит (*например*, Т-клетку, В-клетку, клетку-натуральный киллер («НК-клетку» и НКТ-клетку или iNKТ-клетку)), моноциты, макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки или гранулоциты (*например*, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой первичную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка иммунной системы может быть выбрана из CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, регуляторных Т-клеток (Treg), В-клеток, НК-клеток и дендритных клеток (DC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммунная клетка является аллогенной.

[00247] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой адаптивную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой В-клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой макрофаг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лимфоцит является аллогенным.

[00248] В контексте настоящего документа Т-клетка может быть определена как клетка, которая экспрессирует Т-клеточный рецептор («TCR» или « $\alpha\beta$  TCR» или « $\gamma\delta$  TCR»), однако в некоторых вариантах осуществления настоящего документа TCR Т-клетки может быть генетически модифицирован для снижения его экспрессии (*например*, путем генетической модификации генов TRAC или TRBC), поэтому уровень экспрессии

белка CD3 можно применять в качестве маркера для идентификации Т-клетки согласно стандартным методам проточной цитометрии. CD3 представляет собой многосубъединичный сигнальный комплекс, связанный с TCR. Таким образом, Т-клетка может быть названа как CD3+. В некоторых вариантах осуществления настоящего документа Т-клетка представляет собой клетку, которая экспрессирует маркер CD3+ и либо маркер CD4+, либо маркер CD8+. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка является аллогенной.

[00249] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD8 и, таким образом, CD8+ согласно стандартным методам проточной цитометрии может называться «цитотоксичной» Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD4 и, таким образом, является CD4+ согласно стандартным методам проточной цитометрии и может называться «хелперной» Т-клеткой. CD4+ Т-клетки могут дифференцироваться в подмножества и могут называться Th1 клетками, Th2 клетками, Th9 клетками, Th17 клетками, Th22 клетками, Т регуляторными («Treg») клетками или Т-фолликулярными хелперными клетками («Tfh»). Каждое подмножество CD4+ выделяет специфические цитокины, которые могут иметь либо провоспалительные, либо противовоспалительные функции, функции выживания или защитные функции. Т-клетка может быть выделена из субъекта методами селекции CD4+ или CD8+.

[00250] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка представляет собой Т-клетку памяти. В организме Т-клетка памяти встречает антиген. Т-клетки памяти могут располагаться во вторичных лимфоидных органах (центральные Т-клетки памяти) или в недавно инфицированной ткани (эффektorные Т-клетки памяти). Т-клеткой памяти может быть CD8+ Т-клетка. Т-клеткой памяти может быть CD4+ Т-клетка.

[00251] В контексте настоящего документа термин «центральная Т-клетка памяти» может называться как Т-клетка, контактирующая с антигеном, и, например, может экспрессировать CD62L и CD45RO. Центральная Т-клетка памяти может быть обнаружена как CD62L+ и CD45RO+ центральными Т-клетками памяти, которые также экспрессируют CCR7, поэтому может быть обнаружена как CCR7+ согласно стандартным методам проточной цитометрии.

[00252] В контексте настоящего документа термин «ранняя стволовая Т-клетка памяти» (или «Tscm») может быть определена как Т-клетка, которая экспрессирует CD27 и CD45RA и, следовательно, представляет собой CD27+ и CD45RA+ согласно стандартным методам проточной цитометрии. Tscm не экспрессирует CD45 изоформу CD45RO, поэтому при окрашивании на эту изоформу стандартными методами проточной цитометрии Tscm в дальнейшем будет CD45RO-. Следовательно, клетка CD45RO-CD27+ также представляет собой раннюю стволовую Т-клетку памяти. Tscm клетки дополнительно экспрессируют CD62L и CCR7, поэтому могут быть обнаружены как CD62L+ и CCR7+ согласно стандартным методам проточной цитометрии. Было

продемонстрировано, что ранние стволовые Т-клетки памяти коррелируют с повышенной персистенцией и терапевтической эффективностью продуктов клеточной терапии.

[00253] В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой В-клетку. В контексте настоящего документа термин «В-клетка» может быть определен как клетка, которая экспрессирует CD19 и/или CD20, и/или зрелый антиген В-клетки («ВСМА»), и, следовательно, В-клетка представляет собой CD19+ и/или CD20+, и /или ВСМА+ согласно стандартным методам проточной цитометрии. Кроме того, В-клетка является отрицательной в отношении CD3 и CD56 согласно стандартным методам проточной цитометрии. В-клетка может быть плазматической клеткой. В-клетка может быть В-клеткой памяти. В-клетка может быть "наивной" В-клеткой. В-клетка может быть IgM+ или иметь В-клеточный рецептор с переключением класса (*например*, IgG+ или IgA+). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетка является аллогенной.

[00254] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой мононуклеарную клетку, например, из костного мозга или периферической крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой мононуклеарную клетку периферической крови («РВМС»). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой РВМС, *например* лимфоцит или моноцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой лимфоцит периферической крови («PBL»). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мононуклеарная клетка является аллогенной.

[00255] Включены клетки, применяемые в АСТ и/или регенеративной терапии тканей, такие как стволовые клетки, клетки-предшественники и первичные клетки. Стволовые клетки, например, включают плюрипотентные стволовые клетки (PSC); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC); эмбриональные стволовые клетки (ESC); мезенхимальные стволовые клетки (MSC, *например*, выделенные из костного мозга (BM), периферической крови (PB), плаценты, пуповины (UC) или жировой ткани); гемопоэтические стволовые клетки (HSC; *например*, выделенные из BM или UC); нейральные стволовые клетки (NSC); тканеспецифические стволовые клетки-предшественники (TSPSC); и лимбальные стволовые клетки (LSC). Прогениторные и первичные клетки включают мононуклеарные клетки (MNC, *например*, выделенные из BM или PB); эндотелиальные клетки-предшественники (EPC, *например*, выделенные из BM, PB и UC); нейральные клетки-предшественники (NPC); и тканеспецифические первичные клетки или полученные из них клетки (TSC), включая хондроциты, миоциты и кератиноциты. Также включены клетки для трансплантации органов или тканей, такие как островковые клетки, кардиомиоциты, клетки щитовидной железы, тимоциты, нейрональные клетки, клетки кожи и клетки сетчатки.

[00256] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку человека выделяют из организма человека. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения клетки выделяют из РВМС или лейкопаков донора человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка получена от субъекта с патологическим состоянием, нарушением или заболеванием. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка получена от донора-человека с вирусом Эпштейна-Барр («EBV»).

[00257] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы осуществляются *ex vivo*. В контексте настоящего документа термин «*ex vivo*» относится к способу *in vitro*, при котором клетка может быть перенесена субъекту, *например*, в качестве АСТ-терапии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ *ex vivo* представляет собой способ *in vitro*, включающий клетки или клеточную популяцию для АСТ-терапии.

[00258] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка происходит из клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная линия получена от человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная линия представляет собой лимфобластоидную клеточную линию («LCL»). Клетка может быть криоконсервирована и разморожена. Клетка, возможно, ранее не подвергалась криоконсервации.

[00259] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка происходит из банка клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку генетически модифицируют, а затем переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку извлекают из организма субъекта, генетически модифицируют *ex vivo* и переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически в банк клеток переносят модифицированную популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в банк клеток переносят генетически модифицированную популяцию иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в банк клеток переносят генетически модифицированную популяцию иммунных клеток, включающую первую и вторую субпопуляции, при этом первая и вторая субпопуляции имеют по меньшей мере одну общую генетическую модификацию и по меньшей мере одну отличающуюся генетическую модификацию.

#### Типовые системы редактирования генов

[00260] Для создания описанных в данном документе сконструированных клеток можно применять различные подходящие системы редактирования генов, включая, помимо прочего, систему CRISPR/Cas; систему нуклеаз "цинковые пальцы" (ZFN); а также систему эффекторных нуклеаз, подобную активатору транскрипции (TALEN). Как правило, системы редактирования генов включают применение сконструированных систем расщепления для индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB) или разреза (например, одноцепочечного разрыва или SSB) в целевой последовательности ДНК. Расщепление или разрезание может происходить с помощью специфических нуклеаз, таких как сконструированные ZFN, TALEN, или с применением системы CRISPR/Cas со

сконструированной направляющей РНК- для управления специфическим расщеплением или разрезанием целевой последовательности ДНК. Кроме того, на основе системы Argonaute разрабатываются нацеленные нуклеазы (например, из *T. thermophilus*, известного как «TtAgo», см. Swarts et al (2014) Nature 507(7491): 258-261), которые также могут иметь потенциал для применения в редактировании генов и генной терапии.

[00261] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов представляет собой систему TALEN. Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), представляют собой рестрикционные ферменты, которые можно сконструировать для разрезания определенных последовательностей ДНК. Их получают путем слияния эффекторного ДНК-связывающего домена TAL с доменом расщепления ДНК (нуклеаза, которая разрезает нити ДНК). Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), могут быть сконструированы для связывания с желаемой последовательностью ДНК, чтобы способствовать расщеплению ДНК в определенных местах (см., например, Boch, 2011, Nature Biotech). Рестрикционные ферменты могут быть введены в клетки для применения при редактировании генов или для редактирования генов *in situ*, метод, известный как редактирование генов с помощью сконструированных нуклеаз. Такие способы и композиции для их применения известны в данной области техники. См., например, WO 2019147805, WO 2014040370, WO 2018073393, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00262] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов представляет собой систему "цинковые пальцы". Нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN) представляют собой искусственные рестрикционные ферменты, генерируемые путем слияния ДНК-связывающего домена "цинковые пальцы" с доменом расщепления ДНК. Домены "цинковые пальцы" могут быть сконструированы для нацеливания на определенные желаемые последовательности ДНК, чтобы позволить нуклеазам "цинковые пальцы" нацеливаться на уникальные последовательности в комплексных геномах. Домен неспецифического расщепления из рестрикционной эндонуклеазы *Ис* типа FokI обычно применяется в качестве домена расщепления в ZFN. Расщепление восстанавливается с помощью эндогенного механизма репарации ДНК, что позволяет ZFN точно изменять геномы высших организмов. Такие способы и композиции для их применения известны в данной области техники. См., например, WO 2011091324, содержание которой включено настоящий документ посредством ссылки.

[00263] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов представляет собой систему CRISPR/Cas, включающую, например, РНК, разработанную для направления на CRISPR, содержащую направляющую последовательность и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и дополнительно описана в настоящем документе.

РНК для направления на CRISPR

[00264] В настоящем документе предложены направляющие последовательности,

пригодные для модификации целевой последовательности, *например*, с помощью направляющей РНК, содержащей описанную направляющую последовательность, с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (*например*, системой CRISPR/Cas).

[00265] Каждая из описанных в данном документе направляющих последовательностей может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды для образования сгРНК, например, со следующей типовой последовательностью нуклеотидов, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 213) в ориентации от 5' к 3'. В случае сгРНК указанные выше направляющие последовательности могут дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды (каркасная последовательность) для образования сгРНК, например, со следующей типовой последовательностью нуклеотидов, следующей за 3'-концом направляющей последовательности: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 214) или GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 215, которая представляет собой SEQ ID NO: 214 без четырех концевых U) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения четыре концевых U из SEQ ID NO: 214 отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения присутствуют только 1, 2 или 3 из четырех концевых U последовательности SEQ ID NO: 214.

[00266] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сгРНК содержит любую из направляющих последовательностей SEQ ID No: 1-211 и дополнительные нуклеотиды для образования сгРНК, например, со следующей типовой каркасной последовательностью нуклеотидов, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGG CACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 216) в ориентации от 5' до 3'. SEQ ID NO: 216 отсутствуют 8 нуклеотидов по отношению к консервативной последовательности направляющей РНК дикого типа: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 215). Другие типовые каркасные нуклеотидные последовательности предложены в Таблице 6. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сгРНК содержит любую из указанных направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1-211 и дополнительные направляющие каркасные последовательности в ориентации от 5' до 3' в Таблице 6, включая модифицированные версии последовательностей каркаса, как продемонстрировано.

[00267] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК представляет собой сгРНК, содержащую любую из последовательностей, продемонстрированных в Таблице 2 (SEQ ID NO: 249-343 и 344-

438), **Таблице 3** (SEQ ID NO: 439-471 и 472-504), и **Таблице 5** (SEQ ID NO: 505-532 и 533-560). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК представляет собой химически модифицированную направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК представляет собой химически модифицированную одиночную направляющую РНК. Химически модифицированные направляющие РНК могут содержать одну или большее количество модификаций, как продемонстрировано в **Таблицах 2, 3, 5 и 6**. Химически модифицированные направляющие РНК могут содержать один или большее количество модифицированных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 1003, 1007-1009 и 1011-1014.

[00268] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую любую из SEQ ID NO: 249-343, 439-471 и 505-532 по меньшей мере с одной химической модификацией, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой одной из SEQ ID NO: 249-343, 439-471 и 505-532, по меньшей мере с одной химической модификацией, описанной в настоящем документе.

[00269] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую паттерн модификации, продемонстрированные в SEQ ID NO: 1013 или 1014. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 344-438, 472-504 и 533-560.

[00270] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК содержит sgРНК, содержащую профиль модификации, продемонстрированный в SEQ ID NO: 1003. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК содержит sgРНК, содержащую модифицированные нуклеотиды SEQ ID NO: 1003, включая направляющую последовательность, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1016 или последовательность, которая по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92% 91% или 90% идентична SEQ ID NO: 1016.

[00271] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения с содержит одиночную направляющую РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 344-438, 472-504 и 533-560 и 1016, или последовательность, которая по меньшей мере 99%, 98% , 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 344-438, 472-504 и 533-560, и 1016.

[00272] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

направляющую РНК содержит направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 13-18, 26, 37-39, 41, 43, 45 и 62. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющую РНК содержит одиночную направляющую РНК, содержащий любую из указанных последовательностей SEQ ID NO: 356-361, 369, 380-382, 384, 386, 388 и 405, или последовательность, которая по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 356-361, 369, 380-382, 384, 386, 388 и 405.

[00273] Направляющую РНК может дополнительно содержать trРНК. В каждом из вариантов осуществления композиции и способа, описанных в настоящем документе, crРНК и trРНК могут быть ассоциированы как одиночная РНК (sgРНК) или могут находиться на отдельных РНК (dgРНК). В контексте sgРНК, компоненты crРНК и trРНК могут быть ковалентно связаны, например, посредством фосфодиэфирной связи или другой ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность crРНК и/или trРНК может называться «каркасной» или «консервативной частью» направляющую РНК.

[00274] В каждом из вариантов осуществления настоящего изобретения композиции, применения и способа, описанных в настоящем документе, направляющая РНК может содержать две молекулы РНК в качестве «двойной направляющей РНК» или «dgРНК». dgРНК содержит первую молекулу РНК, содержащую crРНК, содержащую, *например*, направляющую последовательность, продемонстрированную в **Таблицах 2-5**, и вторую молекулу РНК, содержащую trРНК. Молекулы первой и второй РНК могут не быть ковалентно связаны, но могут образовывать дуплекс РНК за счет спаривания оснований между частями crРНК и trРНК.

[00275] В каждом из вариантов осуществления композиции, применений и способа, описанных в настоящем документе, направляющая РНК может содержать одиночную молекулу РНК в качестве «одиночной направляющей РНК» или «sgРНК». sgРНК может содержать crРНК (или ее часть), содержащую направляющую последовательность, продемонстрированную в **Таблицах 2-5**, ковалентно связанную с trРНК. sgРНК может содержать 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности, продемонстрированной в **Таблицах 2-5**. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения crРНК и trРНК ковалентно связаны через линкер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения sgРНК образует структуру "стебель-петля" за счет спаривания оснований между частями crРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения crРНК и trРНК ковалентно связаны посредством одной или большего количества связей, которые не являются фосфодиэфирной связью.

[00276] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК может содержать всю или часть последовательности trРНК, полученной из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК содержит укороченную или модифицированную trРНК

дикого типа. Длина trРНК зависит от применяемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК содержит или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК может содержать определенные вторичные структуры, такие как, например, одну или большее количество шпилечных структур или структур "стебель-петля", или одну или большее количество структур выпуклости.

[00277] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая одну или большее количество направляющих РНК, содержащих любую направляющую последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблицах 2-5**. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая одну или большее количество направляющих РНК, содержащих любую направляющую последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблицах 2-5**, при этом нуклеотиды SEQ ID NO: 213-216 следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или большее количество направляющих РНК, содержащих любую направляющую последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблицах 2-5**, при этом нуклеотиды SEQ ID NO: 213-216 следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, являются модифицированными в соответствии с профилем модификации любой из последовательностей SEQ ID NO: 1003, 1007-1009 и 1011-1014.

[00278] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая одну или большее количество направляющих РНК, содержащих любую направляющую последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблицах 2-5**. В одном аспекте предложена композиция, содержащая одну или большее количество gРНК, содержащая направляющую последовательность, которая по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или на 90% идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 1-211.

[00279] В других вариантах осуществления настоящего изобретения предложена композиция, которая содержит по меньшей мере одну, например, по меньшей мере две gРНК, содержащие направляющие последовательности, выбранные из любых двух или большего количества направляющих последовательностей, продемонстрированных в **Таблицах 2-5**. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная композиция содержит по меньшей мере две gРНК, каждая из которых содержит направляющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% любой из направляющих последовательностей, продемонстрированных в **Таблицах 2-5**.

[00280] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

композиции направляющей РНК по настоящему изобретению предназначены для распознавания (*например*, гибридизации) целевой последовательности в HLA-A. Например, целевая последовательность HLA-A может распознаваться и расщепляться предложенной Cas клевазой, содержащей направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas клеваза, может направляться направляющей РНК к целевой последовательности в HLA-A, при этом направляющая последовательность направляющей РНК гибридизуется с целевой последовательностью и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как Cas клеваза, который расщепляет целевую последовательность.

[00281] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выбор одной или большего количества направляющих РНК определяется на основе целевых последовательностей в пределах HLA-A. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции, содержащие одну или большее количество направляющих последовательностей, содержат направляющую последовательность, комплементарную соответствующей геномной области, продемонстрированной в **Таблицах 2-5**, в соответствии с координатами из эталонного генома человека hg38. Направляющие последовательности дополнительных вариантов осуществления могут быть комплементарны последовательностям в непосредственной близости геномных координат, указанных в любой из **Таблиц 2-5** в пределах HLA-A. Например, направляющие последовательности дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения могут быть комплементарны последовательностям, которые содержат 10 смежных нуклеотидов  $\pm$  10 нуклеотидов геномных координат, указанных в **Таблицах 2-5**.

[00282] Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, модификации (*например*, мутации со сдвигом рамки считывания, возникающие в результате инделов, возникающих в результате опосредованного нуклеазой DSB) в определенных областях целевого гена могут быть менее переносимыми, чем мутации в других областях, таким образом, расположение DSB является важным фактором в количестве или типе нокдауна белка, который может возникнуть. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, комплементарная или имеющая комплементарность с целевой последовательностью в целевом гене, применяется для направления РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в конкретное место в целевом гене.

[00283] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85% или 80% идентична целевой последовательности, присутствующей в целевом гене. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85% или 80% идентична целевой последовательности, присутствующей в гене HLA-A человека.

[00284] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность может быть комплементарной направляющей последовательности направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью направляющей РНК и соответствующей целевой последовательностью может составлять по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность и направляющая последовательность gРНК могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность и направляющая последовательность gРНК могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, целевая последовательность и направляющая последовательность gРНК могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, при этом общая длина направляющей последовательности составляет 20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность и направляющая последовательность gРНК могут содержать 1-4 несовпадения, при этом направляющая последовательность составляет 20 нуклеотидов.

[00285] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция или состав, описанные в настоящем документе, содержат mРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas нуклеаза, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается, применяется или вводится mРНК, содержащая OРС, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas нуклеаза.

#### Модифицированные gРНК и mРНК

[00286] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК (например, sgRNA, короткая sgRNA, dgRNA или crRNA) является модифицированной. Термин «модифицированный» или «модификация» в контексте gРНК, описанной в настоящем документе, включает модификации, описанные выше, включая, например, (a) концевые модификации, например, 5'-концевые модификации или 3'-концевые модификации, включая 5' или 3' -концевые защитные модификации, (b) модификации нуклеоснований (или «оснований»), включая замену или удаление оснований, (c) модификации сахаров, включая модификации в положениях 2', 3' и/или 4', (d) модификации межнуклеозидных связей и (e) модификации остова, которые могут включать модификацию или замену фосфодиэфирных связей и/или сахара рибозы. Модификация нуклеотида в данном положении включает модификацию или замену фосфодиэфирной связи непосредственно на 3'-конце сахара нуклеотида. Так, например, считается, что нуклеиновая кислота, содержащая фосфоротиоат между первым и вторым сахарами с 5'-конца, содержит модификацию в положении 1. Термин «модифицированная gРНК» обычно относится к gРНК, имеющей модификацию химической структуры одного

или большего количества из следующих элементов: основание, сахар и фосфодиэфирная связь или часть остова, включая нуклеотидфосфаты, как подробно описано и проиллюстрировано в настоящем документе.

[00287] Дальнейшее описание и примеры модификаций приведены в Таблице 1 документа WO 2019/237069, опубликованного 12 декабря 2019 г., полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00288] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК содержит модификации в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или большем количестве YA сайтов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пиримидин YA сайта содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно на 3'-конце сахара пиримидина). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аденин YA сайта содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно на 3'-конце сахара аденина). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пиримидин и аденин YA сайта содержат модификации, такие как модификации сахара, основания или межнуклеозидной связи. YA модификации могут представлять собой модификации любого из типов, приведенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA модификации включают один или большее количество из следующих элементов: фосфоротиоат, 2'-ОМе или 2'-фтор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA модификации включают модификации пиримидина, включающие один или большее количество из следующих элементов: фосфоротиоат, 2'-ОМе, 2'-Н, инозин или 2'-фтор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA модификация включает аналог бициклической рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в области дуплекса РНК, которая содержит один или большее количество YA сайтов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA модификация включает аналог бициклической рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в области дуплекса РНК, которая содержит YA сайт, при этом YA модификация расположена дистальнее YA сайта.

[00289] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность (или направляющая область) gРНК содержит 1, 2, 3, 4, 5 или большее количество YA сайтов («YA сайты направляющей области»), которые могут содержать YA модификации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один или большее количество YA сайтов, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце от 5'-конца 5'-терминальной области (где «5-конец» и т. д., относится к положению 5 к 3'-концу направляющей области, т. е. самому 3'-нуклеотиду в направляющей области) содержат YA модификации. Модифицированный YA сайт направляющей области содержит YA модификацию.

[00290] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA сайт модифицированной направляющей области находится в пределах 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14,

13, 12, 11, 10 или 9 нуклеотидов 3'-концевого нуклеотида направляющей области. Например, если YA сайт модифицированной направляющей области находится в пределах 10 нуклеотидов 3'-концевого нуклеотида направляющей области, а длина направляющей области составляет 20 нуклеотидов, то модифицированный нуклеотид YA сайта модифицированной направляющей области расположен в любом из положений 11-20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA сайт модифицированной направляющей области находится на нуклеотиде 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 от 5'-конца 5'-терминальной области или после него.

[00291] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA сайт модифицированной направляющей области отличается от модификации 5'-конца. Например, sgРНК может содержать модификацию 5'-конца, как описано в настоящем документе, и дополнительно содержать YA сайт модифицированной направляющей области. Альтернативно, sgРНК может содержать немодифицированный 5'-конец и YA сайт модифицированной направляющей области. Альтернативно, короткая sgРНК может содержать модифицированный 5'-конец и немодифицированный YA сайт модифицированной направляющей области.

[00292] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA сайт модифицированной направляющей области содержит модификацию, которую не содержит по меньшей мере один нуклеотид, расположенный на 5'-конце YA сайта направляющей области. Например, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиаты, нуклеотид 4 содержит только модификацию 2'-ОМе, а нуклеотид 5 представляет собой пиримидин YA сайта и содержит фосфоротиат, то YA сайт модифицированной направляющей области содержит модификацию (фосфотиат), которую не содержит по меньшей мере один нуклеотид, расположенный на 5'-конце YA сайта направляющей области (нуклеотид 4). В другом примере, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиаты, а нуклеотид 4 представляет собой пиримидин YA сайта и содержит 2'-ОМе, то YA сайт модифицированной направляющей области содержит модификацию (2'-ОМе), которую не содержит по меньшей мере один нуклеотид, расположенный на 5'-конце YA сайта направляющей области (любой из нуклеотидов 1-3). Это условие также всегда выполняется, если немодифицированный нуклеотид расположен на 5'-конце YA сайта модифицированной направляющей области.

[00293] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA сайт модифицированной направляющей области содержат модификации, как описано выше для YA сайтов. Направляющая область gРНК может быть модифицирована в соответствии с любым вариантом осуществления настоящего изобретения, содержащим модифицированную направляющую область, приведенную в настоящем документе. Любые варианты осуществления настоящего изобретения, приведенные в другом месте в этом описании, могут быть объединены, насколько это возможно, с любым из предыдущих вариантов осуществления.

[00294] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

модифицированы 5'- и/или 3'-концевые области gРНК.

[00295] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированы концевые (т.е. последние) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области. В дальнейшем эта модификация может называться «модификацией 3'-конца». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концевые (т.е. последние) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области содержат более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3'-конца содержит или дополнительно содержит любое одно или большее количество из следующих элементов: модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированного нуклеотида, 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор (2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного безосновного модифицированного нуклеотида или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3'-конца включает или дополнительно включает модификации 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов на 3'-конце gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3'-конца содержит или дополнительно содержит одну связь PS, при этом указанная связь находится между последним и предпоследним нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3'-конца содержит или дополнительно содержит две связи PS между последними тремя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3'-конца содержит или дополнительно содержит четыре связи PS между последними четырьмя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3'-конца содержит или дополнительно содержит связи PS между любым одним или большим количеством из последних 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, содержащая модификацию 3'-конца, содержит или дополнительно содержит 3'-хвост, при этом 3'-хвост содержит модификацию любого одного или большего количества нуклеотидов, присутствующих в 3'-хвосте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 3'-хвост полностью модифицирован. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 3'-хвост содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9 или 1-10 нуклеотидов, необязательно при этом любой один или большее количество из этих нуклеотидов модифицированы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена gРНК, содержащая защитную 3'-концевую модификацию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 3'-хвост содержит от 1 до около 20 нуклеотидов, от 1 до около 15 нуклеотидов, от 1 до около 10 нуклеотидов, от 1 до около 5 нуклеотидов, от 1 до около 4 нуклеотидов, от 1 до около 3 нуклеотидов и от 1 до около 2 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления gРНК не содержит 3'-хвост.

[00296] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

модифицирована 5'-концевая область, например, модифицированы первые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов gРНК. В дальнейшем эта модификация может называться «модификацией 5'-конца». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов 5'-концевой области содержат более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицирован по меньшей мере один из концевых (т. е. первых) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированы как 5'-, так и 3'-концевые области (например, концы) gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицирована только 5'-концевая область gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицирована только 3'-концевая область (плюс или минус 3'-хвост) консервативной части gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК содержит модификации в 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из первых 7 нуклеотидов в 5'-концевой области gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК содержит модификации в 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из 7 концевых нуклеотидов в 3'-концевой области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированы 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов в 5'-концевой области и/или 2, 3 или 4 из 4 концевых нуклеотидов в 3'-концевой области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов в 5'-концевой области связаны фосфоротиоатными (PS) связями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 5'-конца и/или 3'-конца включает 2'-О-метил (2'-О-Ме) или 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-Мое) модификацию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает 2'-фтор (2'-F) модификацию нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает инвертированный безосновной нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает защитную концевую модификацию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает более одной модификации, выбранной из защитной концевой модификации, 2'-О-Ме, 2'-О-мое, 2'-фтор (2'-F), фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами и инвертированного безосновного нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения охватывается эквивалентная модификация.

[00297] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена gРНК, содержащая модификацию 5'-конца и модификацию 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК содержит модифицированные нуклеотиды, которые не находятся на 5'- или 3'-концах.

[00298] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена sgРНК, содержащая модификацию верхнего стебля, при этом модификация верхнего стебля включает модификацию любого одного или большего количества из US1-

US12 в области верхнего стебля. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена sgРНК, содержащая модификацию верхнего стебля, при этом модификация верхнего стебля включает модификацию по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или всех 12 нуклеотидов в области верхнего стебля. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена sgРНК, содержащая модификацию верхнего стебля, при этом модификация верхнего стебля включает 1, 2, 3, 4 или 5 YA модификаций в YA сайте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация верхнего стебля содержит 2'-ОМе модифицированный нуклеотид, 2'-О-томе модифицированный нуклеотид, 2'-F модифицированный нуклеотид и/или их комбинации. Другие модификации, описанные в настоящем документе, такие как модификация 5'-конца и/или модификация 3'-конца, могут быть объединены с модификацией верхнего стебля.

[00299] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения sgРНК содержит модификацию в области шпильки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация области шпильки включает по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил (2'-ОМе) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор (2'-F) модифицированного нуклеотида и/или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация области шпильки находится в области шпильки 1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация области шпильки находится в области шпильки 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация области шпильки содержит 1, 2 или 3 YA модификации в YA сайте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация области шпильки включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 YA модификаций. Другие модификации, описанные в настоящем документе, такие как модификация верхнего стебля, модификация 5'-конца и/или модификация 3'-конца, могут быть объединены с модификацией в области шпильки.

[00300] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК содержит замещенную и необязательно укороченную область шпильки 1, при этом по меньшей мере одна из следующих пар нуклеотидов заменена в замещенной и необязательно укороченной шпильке 1 спаренными нуклеотидами по Уотсону-Крику: Н1-1 и Н1-12, Н1-2 и Н1-11, Н1-3 и Н1-10 и/или Н1-4 и Н1-9. «Спаренные нуклеотиды по Уотсону-Крику» включают любую пару, способную образовывать пару оснований по Уотсону-Крика, включая пары А-Т, А-У, Т-А, У-А, С-Г и Г-С, а также пары, включающие модифицированные версии любого из вышеуказанных нуклеотидов, которые имеют одинаковые предпочтения в паре оснований. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в области шпильки 1 отсутствуют какие-либо один или два из Н1-5 до Н1-8. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в области шпильки 1 отсутствуют одна, две или три из следующих пар нуклеотидов: Н1-1 и Н1-12, Н1-2 и Н1-11, Н1-3 и Н1-10 и/или Н1-4 и Н1-9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в области шпильки 1 отсутствуют 1-8 нуклеотидов области

шпильки 1. В любом из приведенных выше вариантов осуществления настоящего изобретения отсутствующие нуклеотиды могут быть такими, что одна или большее количество пар нуклеотидов, замененных спаренными нуклеотидами по Уотсону-Крику (Н1-1 и Н1-12, Н1-2 и Н1-11, Н1-3 и Н1-10, и/или Н1-4 и Н1-9), образуют пару оснований в gРНК.

[00301] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК дополнительно содержит область верхнего стебля, в которой отсутствует по меньшей мере 1 нуклеотид, например, любая из укороченных областей верхнего стебля, указанных в Таблице 7 заявки США № 62/946905, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме или описанные в другом месте в данном документе, которые могут быть объединены с любой из укороченных или замещенных областей шпильки 1, описанных в данном документе.

[00302] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения sgРНК, предложенная в настоящем документе, представляет собой короткую одиночную направляющую РНК- (короткие sgРНК), *например*, содержащую консервативную часть sgРНК, содержащую область шпильки, при этом в области шпильки отсутствует по меньшей мере 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов являются последовательными.

[00303] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в короткой sgРНК отсутствуют по меньшей мере нуклеотиды 54-58 (AAAAA) консервативной части sgРНК *spyCas9*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения короткая sgРНК представляет собой sgРНК, не относящуюся к *spyCas9*, в которой отсутствуют нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 54-58 (AAAAA) консервативной части *spyCas9*, как определено, например, путем парного или структурного выравнивания.

[00304] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения короткая sgРНК, описанная в настоящем документе, содержит консервативную часть, содержащую область шпильки, при этом в области шпильки отсутствуют 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствующие нуклеотиды составляют 5-10 отсутствующих нуклеотидов или 6-10 отсутствующих нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствующие нуклеотиды являются последовательными. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствующие нуклеотиды охватывают по меньшей мере часть шпильки 1 и часть шпильки 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отсутствующие 5-10 нуклеотидов включают или состоят из нуклеотидов 54-58, 54-61 или 53-60 SEQ ID NO: 215.

[00305] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения короткая sgРНК, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит некусную область, при этом в некусной области отсутствует по меньшей мере один нуклеотид (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов в некусной области). В некоторых вариантах

осуществления настоящего изобретения у короткой sgPHK отсутствует каждый нуклеотид в некусной области.

[00306] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанная в настоящем документе короткая sgPHK SpyCas9 содержит последовательность NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGCU (SEQ ID NO: 1002).

[00307] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения короткая sgPHK, описанная в настоящем документе, содержит профиль модификации, продемонстрированный в SEQ ID NO: 1003: mN\*mN\*mN\*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAAAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGmUmGmC\*mU (SEQ ID NO: 1003), где A, C, G, U и N представляет собой аденин, цитозин, гуанин, урацил и любой рибонуклеотид соответственно, если не указано иное. Символ m указывает на модификацию 2'О-метила, а \* указывает на фосфоротиоатную связь между нуклеотидами.

[00308] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, применяя SEQ ID NO: 215 («Типовая sgPHK-1 SpyCas9») в качестве примера, типовая sgPHK-1 SpyCas9 дополнительно включает одно или большее количество из следующих элементов:

A. укороченная область шпильки 1 или замещенная и необязательно укороченная область шпильки 1, при этом

1. по меньшей мере одна из следующих пар нуклеотидов заменена в шпильке 1 спаренными нуклеотидами по Уотсону-Крику: Н1-1 и Н1-12, Н1-2 и Н1-11, Н1-3 и Н1-10 или Н1-4 и Н1-9, а в области шпильки 1 необязательно отсутствуют

a. любой один или два из Н1-5 до Н1-8,

b. одна, две или три из следующих пар нуклеотидов: Н1-1 и Н1-12, Н1-2 и Н1-11, Н1-3 и Н1-10, Н1-4 и Н1-9, или

c. 1-8 нуклеотидов шпильки 1 области; или

2. в укороченной области шпильки 1 отсутствует 6-8 нуклеотидов, предпочтительно 6 нуклеотидов; и

a. одно или большее количество положений Н1-1, Н1-2 или Н1-3 делетированы или заменены по сравнению с типовой sgPHK-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 215), или

b. одно или большее количество положений с Н1-6 по Н1-10 заменены по сравнению с типовой sgPHK-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 215); или

3. в укороченной области шпильки 1 отсутствуют 5-10 нуклеотидов, предпочтительно 5-6 нуклеотидов, и одно или большее количество положений N18, Н1-12 или n заменены по сравнению с типовой sgPHK-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 215); или

B. укороченная область верхнего стебля, при этом в указанной укороченной области верхнего стебля отсутствуют 1-6 нуклеотидов и при этом 6, 7, 8, 9, 10 или 11 нуклеотидов укороченной области верхнего стебля включают меньше чем 4 или 4 замены по сравнению с типовой sgPHK-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 215); или

С. замена по сравнению с типовой sgPНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 215) в любом одном или большем количестве из LS6, LS7, US3, US10, B3, N7, N15, N17, H2-2 и H2-14, при этом замещающий нуклеотид не является ни пиримидином, за которым следует аденин, ни аденином, которому предшествует пиримидин; или

D. типовая sgPНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 215) с областью верхнего стебля, при этом модификация верхнего стебля включает модификацию любого одного или большего количества из US1-US12 в области верхнего стебля, при этом

1. модифицированный нуклеотид необязательно выбирают из 2'-О-метил (2'-ОМе) модифицированного нуклеотида, 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор (2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного безосновного модифицированного нуклеотида или их комбинации; или

2. модифицированный нуклеотид необязательно включает 2'-ОМе модифицированный нуклеотид.

[00309] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения типовая sgPНК-1 SpyCas9 или sgPНК, такая как sgPНК, содержащая типовую sgPНК-1 SpyCas9, дополнительно включает 3'-хвост, например, 3'-хвост 1, 2, 3, 4 или большего количества нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения хвост включает один или большее количество модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид выбирают из 2'-О-метил (2'-ОМе) модифицированного нуклеотида, 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модифицированного нуклеотида, 2'-фторо (2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного безосновного модифицированного нуклеотида или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает 2'-ОМе модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает PS связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает 2'-ОМе модифицированный нуклеотид и PS связь между нуклеотидами.

[00310] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPНК, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит некусную область, при этом в некусной области отсутствует по меньшей мере один нуклеотид.

[00311] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPНК является химически модифицированной. gPНК, содержащая один или большее количество модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называется «модифицированной» gPНК или «химически модифицированной» gPНК для описания присутствия одного или большего количества неприродных и/или природных компонентов или конфигураций, которые применяются вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, С и U. Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут

включать один или большее количество из следующего: (i) изменение, *например*, замена одного или обоих не связывающих фосфатных оксигенов и/или одного или большего количества связывающих фосфатных оксигенов в фосфодиэфирной каркасной связи (типовая модификация каркаса); (ii) изменение, *например*, замена компонента сахара рибозы, *например*, 2'-гидроксила на сахаре рибозы (типовая модификация сахара); (iii) полная замена фосфатного фрагмента «дефосфо» линкерами (типовая модификация каркаса); (iv) модификация или замена природного нуклеинового основания, в том числе неканоническим нуклеиновым основанием (типовая модификация основания); (v) замена или модификация рибозофосфатного остова (типовая модификация остова); (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца олигонуклеотида, *например*, удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгация фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3'- или 5'-кэпа могут включать в себя модификацию сахара и/или каркаса); и (vii) модификация или замена сахара (иллюстративная модификация сахара).

[00312] Химические модификации, такие как перечисленные выше, могут быть объединены для получения модифицированных гРНК, содержащих нуклеозиды и нуклеотиды (все вместе именуемые «остатки»), которые могут иметь две, три, четыре или большее количество модификаций. Например, модифицированный остаток может иметь модифицированный сахар и модифицированное азотистое основание. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения каждое основание гРНК модифицировано, *например*, все основания имеют модифицированную фосфатную группу, такую как фосфоротиоатная группа. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения все или по существу все фосфатные группы молекулы гРНК заменены фосфоротиоатными группами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 5'-конце РНК или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 3'-конце РНК или вблизи него.

[00313] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гРНК содержит один, два, три или большее количество модифицированных остатков. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 5% (*например*, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) положений в модифицированной гРНК представляют собой модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды.

[00314] В некоторых вариантах осуществления модификации остова, фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или большего количества атомов кислорода другим заместителем. Кроме того,

модифицированный остаток, *например*, модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать полную замену немодифицированной фосфатной группы модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация фосфатного остова может включать изменения, которые приводят или к незаряженному линкеру, или к заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

[00315] Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные фосфатные эфиры борана, гидрофосфонаты, фосфоамидаты, алкильные или арильные фосфонаты и сложные фосфотриэфиры.

[00316] Также могут быть сконструированы каркасы, которые могут имитировать нуклеиновые кислоты, в которых фосфатный линкер и сахар рибозы заменены устойчивыми к нуклеазе нуклеозидами или суррогатами нуклеотидов. Такие модификации могут включать модификации остова и сахара. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения азотистые основания могут быть связаны суррогатным остовом. Примеры могут включать, без ограничения, суррогаты нуклеозидов морфолино, циклобутил, пирролидин и пептидную нуклеиновую кислоту (PNA).

[00317] Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды могут включать одну или большее количество модификаций сахарной группы, *т.е.* модификацию сахара. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована, *т.е.* заменены рядом различных «окси» или «дезокси» заместителей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификации 2'-гидроксильной группы могут повышать стабильность нуклеиновой кислоты, поскольку гидроксил больше не может депротонироваться с образованием 2'-алкоксид-иона. Примеры модификаций 2'-гидроксильной группы могут включать алкокси или арилокси (OR, где «R» может представлять собой, *например*, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (PEG),  $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ , где R может представлять собой, *например*, H или необязательно быть замещенным алкилом, а n может быть целым числом от 0 до 20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-O-Me. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой модификацию 2'-фтора, которая заменяет 2'-гидроксильную группу фторидом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать «замкнутые» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил может быть соединен, *например*, с помощью C<sub>1-6</sub> алкиленового или C<sub>1-6</sub> гетероалкиленового мостика с 4'-углеродным мостиком того же сахара рибозы, при этом типовые мостики могут включать метиленовые, пропиленовые, эфирные или аминные мостики. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать «замкнутые» нуклеиновые кислоты (UNA), в которых в кольце рибозы

отсутствует связь C2'-C3'. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (МОЕ), ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , *например*, производное PEG).

[00318] Модификации "дезокси" 2' могут включать водород (*т.е.* дезоксирибозные сахара, *например*, в выступающих частях частично dsРНК); галоген (*например*, бром, хлор, фтор или йод); amino (при этом amino может представлять собой, *например*,  $\text{NH}_2$ ; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту);  $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -амино (при этом amino может быть, *например*, таким, как описано в настоящем документе),  $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$  (при этом R может быть, *например*, алкилом, циклоалкилом, арилом, аралкилом, гетероарилом или сахаром), циано; меркапто; алкилтиоалкил; тиоалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые могут быть необязательно замещены, *например*, amino, как описано в настоящем документе.

[00319] Модификация сахара может включать сахарную группу, которая также может содержать один или большее количество атомов углерода, обладающих стереохимической конфигурацией, противоположной конфигурации соответствующего углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может включать нуклеотиды, содержащие, *например*, арабинозу в качестве сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать безосновные сахара. Эти безосновные сахара также могут быть дополнительно модифицированы по одному или большему количеству составляющих атомов сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать один или большее количество сахаров в L форме, *например* L нуклеозиды.

[00320] Описанные в настоящем документе модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут включать модифицированное основание, также называемое азотистым основанием. Примеры азотистых оснований включают, помимо прочего, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти азотистые основания могут быть модифицированы или полностью заменены для получения модифицированных остатков, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты. Азотистое основание нуклеотида может быть независимо выбрано из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения азотистое основание может включать, например, встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

[00321] В вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых применяется двойная направляющая РНК, каждая из sgРНК и tracr РНК может содержать модификации. Такие модификации могут быть на одном или обоих концах sgРНК и/или tracr РНК. В вариантах осуществления настоящего изобретения, содержащих sgРНК, один или большее количество остатков на одном или обоих концах sgРНК могут быть химически модифицированы, или вся sgРНК может быть химически модифицирована.

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения включают модификацию 5'-конца. Определенные варианты осуществления настоящего изобретения включают модификацию 3'-конца. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения один или большее количество или все нуклеотиды в выступающем одноцепочечном выступе молекулы gРНК представляют собой дезокси-нуклеотиды.

[00322] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в настоящем документе, содержат один из профилей модификации, описанных в документе WO2018/107028 A1, опубликованном 14 июня 2018 г., содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00323] Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» могут применяться для обозначения нуклеотида, модифицированного посредством 2'-O-Me. Термины «fA», «fC», «fU» или «fG» могут применяться для обозначения нуклеотида, который был заменен на 2'-F. Знак «\*» может применяться для обозначения PS модификации. Термины A\*, C\*, U\* или G\* могут применяться для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (например, 3') нуклеотидом посредством PS связи. Термины «mA\*», «mC\*», «mU\*» или «mG\*» могут применяться для обозначения нуклеотида, который был заменен на 2'-O-Me и связан со следующим (например, 3') нуклеотидом посредством PS связи.

[00324] **Типовая sgРНК-1 spyCas9 (SEQ ID NO: 215)**

										1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	
G	U	U	U	U	A	G	A	G	C	U	A	G	A	A	A	U	A	G	C	A	A	G	U	U	A	A	A	A	U	
LS1-LS6						B1- B2	US1-US12												B2-B6			LS7-LS12								
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6
1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	
A	A	G	G	C	U	A	G	U	C	C	G	U	U	A	U	C	A	A	C	U	U	G	A	A	A	A	A	A	G	U
Некрус																		от H1-1 до H1-12												
							6																							
61	62	63	64	65	66	7	68	69	70	71	72	73	74	75	76															
G	G	C	A	C	C	G	A	G	U	C	G	G	U	G	C															
N	от H2-1 до H2-15																													

**Рибонуклеопротеиновый комплекс**

[00325] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены композиции, содержащие одну или большее количество gРНК, содержащих одну или большее количество направляющих последовательностей из **Таблиц 2-5**, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, *например*, нуклеазу, такую как Cas нуклеаза, такая как Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает клезазной активностью, которая также

может упоминаться как двухцепочечная эндонуклеазная активность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas нуклеазу. Примеры Cas9 нуклеаз включают в себя системы CRISPR типа II из *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариот (см., например, перечень в следующем параграфе), а также их модифицированные (например, сконструированные или мутантные) версии. См., например, US 2016/0312198 A1; США 2016/0312199 A1. Другие примеры Cas-нуклеаз включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III или ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2; и комплекс Cascade системы CRISPR типа I или ее субъединицу Cas3. В некоторых вариантах осуществления Cas нуклеаза может происходить из системы типа IIA, типа IIB или типа IIC. Для получения информации о различных системах CRISPR и Cas нуклеаз см., например, Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas никазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемая никаза модифицирована или получена из Cas белка, такого как Cas нуклеаза класса 2 (которая может представлять собой, например, Cas нуклеазу типа II, V или VI). Cas нуклеаза класса 2 включают в себя, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 и C2c3, и их модификации.

[00326] Неограничивающие типовые виды, из которых может быть получена Cas-нуклеаза или Cas никаза, включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gammaproteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogene*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor beccsii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter sp.*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc sp.*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria sp.*, *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus sp.*,

Lachnospiraceae sp. ND2006, и *Acaryochloris marina*.

[00327] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 нуклеазу из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 нуклеазу из *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 нуклеазу из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 нуклеазу из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cpf1 нуклеазу из *Francisella novicida*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cpf1 нуклеазу из *Acidaminococcus* sp. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cpf1 нуклеазу из *Lachnospiraceae bacterium ND2006*. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cpf1 нуклеазу из *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyrromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, или *Porphyrromonas macacae*. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cpf1 нуклеазу из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

[00328] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cas9 нуклеазы из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cas9 нуклеазы из *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза представляет собой никазную форму Cas9 нуклеазы из *Neisseria meningitidis*. См., например, публикацию WO/2020081568, описывающую слитый белок "Nme2Cas9 D16A никаза". В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cas9 нуклеазы из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cpf1 нуклеазы из *Francisella novicida*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cpf1 нуклеазы из *Acidaminococcus* sp. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cpf1 нуклеазы из *Lachnospiraceae bacterium ND2006*. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cpf1 нуклеазы из *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyrromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, или *Porphyrromonas macacae*. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cpf1 нуклеазы из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*. Как обсуждалось в другом месте, никаза может быть получена из

нуклеазы путем инактивации одного из двух каталитических доменов, например, путем мутации остатка активного сайта, необходимого для нуклеолиза, такого как D10, H840, N863 в Spy Cas9. Специалист в данной области техники должен быть знаком с методами простой идентификации соответствующих остатков в других Cas белках, такими как выравнивание последовательностей и структурное выравнивание, которые подробно обсуждаются ниже.

[00329] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, называется рибонуклеопротеиновым комплексом (RNP). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPНК вместе с Cas нуклеазой называется Cas RNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения RNP содержит компоненты типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 белок из системы CRISPR/Cas типа II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gPНК вместе с Cas9 называется Cas9 RNP.

[00330] Cas9 дикого типа имеет два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нецелевую цепь ДНК, а домен HNH расщепляет целевую цепь ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белок Cas9 содержит более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белок Cas9 представляет собой Cas9 дикого типа. В каждом из вариантов осуществления композиции, применения и способа, Cas индуцирует двухцепочечный разрыв целевой ДНК.

[00331] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяются химерные Cas нуклеазы, в которых один домен или область белка заменены частью другого белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен Cas нуклеазы может быть заменен доменом из другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза может представлять собой модифицированную нуклеазу.

[00332] В других вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза может происходить из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза может представлять собой компонент комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза может представлять собой Cas3 белок. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза может происходить из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза может иметь активность расщепления РНК.

[00333] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает одноцепочечной нуклеазной активностью,

то есть может разрезать одну цепь ДНК с образованием разрыва одной цепи, также известного как «разрез». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas нуклеазу. Никаза представляет собой фермент, который создает разрез в dsДНК, то есть разрезает одну цепь, но не другую цепь двойной спирали ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой вариант Cas нуклеазы (например, Cas нуклеазы, описанной выше), в котором эндонуклеолитический активный центр инактивирован, например, одним или большим количеством изменений (*например*, точечными мутациями) в каталитическом домене. *См., например*, патент США № 8889356 для получения информации о Cas нуклеазах и типовых изменениях каталитических доменов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза, такая как Cas9 нуклеаза, имеет инактивированный домен RuvC или HNH.

[00334] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент модифицируют так, что он содержит только один функциональный домен нуклеазы. Например, белок-агент может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы мутирует, или полностью, или частично удаляется, чтобы снизить его активность по расщеплению нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяют нуклеазу, имеющую домен RuvC с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяют нуклеазу, имеющую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяют нуклеазу, имеющую домен HNH с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяют нуклеазу, имеющую неактивный домен HNH.

[00335] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения консервативную аминокислоту в домене белка Cas нуклеазы замещают для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Типовые аминокислотные замены в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). *См., например*, Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3): 759-771. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Типовые аминокислотные замены в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). *См., например*, Zetsche et al. (2015). Другие типовые аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности *Francisella novicida* U112 Cpf1 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1\_FRATN))).

[00336] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения mРНК, кодирующая нуклеазу, предложена в комбинации с парой направляющих РНК, которые

комплементарны смысловой и антисмысловой цепям целевой последовательности, соответственно. В данном варианте осуществления настоящего изобретения направляющие РНК направляют приказу на целевую последовательность и вводят DSB путем образования разрезов на противоположных цепях целевой последовательности (то есть, двойной разрез). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применение двойного разреза может улучшать специфичность и уменьшать нецелевые эффекты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения приказа применяется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного разреза в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения приказа применяется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, которые выбраны так, чтобы они находились в непосредственной близости, для создания двойного разреза в целевой ДНК.

[00337] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент не обладает клевазной и никазной активностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, при этом по существу не обладает каталитической (клеважной/никазной) активностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид dCas представляет собой полипептид dCas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, не обладающий клеважной или никажной активностью, или ДНК-связывающий полипептид dCas представляет собой вариант Cas нуклеазы (*например*, описанной выше Cas нуклеазы), в котором ее эндонуклеолитические активные центры инактивированы, например путем одного или большего количества изменений (*например*, точечных мутаций) в ее каталитических доменах. См., например, публикации US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1.

[00338] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит один или большее количество гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой или содержит слитый полипептид).

[00339] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит АРОВЕС3 дезаминазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения АРОВЕС3 деаминаза представляет собой АРОВЕС3А (АЗА). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения АЗА представляет собой АЗА человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения АЗА представляет собой АЗА дикого типа.

[00340] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу и РНК-направляемую приказу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения mРНК дополнительно содержит линкер для связывания последовательности, кодирующей АЗА, с

последовательностью, кодирующей РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер представляет собой органическую молекулу, группу, полимер или химический фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пептидный линкер представляет собой любой участок аминокислот, содержащий по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или большее количество аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пептидный линкер представляет собой линкер «XTEN» из 16 остатков или его вариант (см., например, «Примеры» и Schellenberger et al. Рекомбинантный полипептид продлевает период полураспада пептидов и белков *in vivo* в настраиваемой способ. Nat. Biotechnol. 27, 1186-1190 (2009)). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер XTEN содержит последовательность SGSETPGTSESATPES (SEQ ID NO: 900), SGSETPGTSESA (SEQ ID NO: 901) или SGSETPGTSESATPEGGSGGS (SEQ ID NO: 902).

[00341] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может облегчать транспорт РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-10 NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-5 NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с одним NLS. Если применяется один NLS, то NLS может быть слит на N-конце или C-конце последовательности РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Он также может быть вставлен в последовательность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В других вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с более чем одним NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 2, 3, 4 или 5 NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS. В определенных обстоятельствах два NLS могут быть одинаковыми (*например*, два NLS SV40) или разными. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент слит с двумя последовательностями NLS (*например*, SV40), слитыми на карбокси конце. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS, один из которых связан на N-конце, а другой на C-конце. В некоторых

вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 3 NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит не с NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения NLS может представлять собой моночастичную последовательность, такую как, *например*, SV40 NLS, PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) или PKKKRRV (SEQ ID NO: 601). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения NLS может представлять собой двухчастичную последовательность, такую как NLS нуклеоплазмина, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 602). В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения одиночный NLS PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) может быть слит на С-конце РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В сайт слияния необязательно включены один или большее количество линкеров.

[00342] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит редактор. Примером редактора является BC22n, который включает APOBEC3A *H. sapiens*, слитую с Cas9 никазой *S. pyogenes*-D10A с помощью линкера XTEN, и мРНК, кодирующую BC22n. Предложена мРНК, кодирующая BC22n (SEQ ID NO:806).

[00343] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен модифицировать внутриклеточное время полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента может быть увеличен. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента может быть уменьшен. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен повышать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен снижать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может действовать как сигнальный пептид для деградации белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения деградация белка может быть опосредована протеолитическими ферментами, такими как, *например*, протеасомы, лизосомальные протеазы или кальпаин-протеазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может содержать последовательность PEST. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть модифицирован путем добавления убиквитиновой или полиубиквитиновой цепи. В некоторых вариантах осуществления убиквитин может представлять собой убиквитин-подобный белок (UBL). Неограничивающие примеры убиквитин-подобных белков включают малый убиквитин-подобный модификатор (SUMO), убиквитиновый

перекрестно-реактивный белок (UCRP, также известный как стимулируемый интерфероном ген-15 (ISG15)), связанный с убиквитином модификатор-1 (URM1), белок-8, подавляющий экспрессию набора генов в предшественниках нервных клеток в процессе развития (NEDD8, также называемый Rub1 в *S. cerevisiae*), белок, ассоциированный с антигеном F лейкоцитов человека (FAT10), белок аутофагии-8 (ATG8) и 12 (ATG12), убиквитин-подобный белок Fau (FUB1), закрепленный на мембране UBL (MUB), убиквитин-свернутый модификатор 1 (UFM1) и убиквитин-подобный белок-5 (UBL5).

[00344] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой маркерный домен. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают в себя флуоресцентные белки, метки очистки, метки эпитопа и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения маркерный домен может представлять собой флуоресцентный белок. Неограничивающие примеры пригодных флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (*например*, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, мономерный Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (*например*, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (*например*, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), голубые флуоресцентные белки (*например*, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные белки (*например*, mKate, mKate2, mPlum, мономер DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, мономерный Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или любой другой пригодный флуоресцентный белок. В других вариантах осуществления настоящего изобретения маркерный домен может представлять собой метку очистки и/или метку эпитопа. Неограничивающие типовые метки включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP), мальтозосвязывающий белок (MBP), тиоредоксин (TRX), поли(NANP), метку для тандемной аффинной очистки (TAP), мус, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, белок носитель биотин карбоксила (BCCP), поли-His и кальмодулин. Неограничивающие типовые репортерные гены включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

[00345] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на конкретную органеллу, тип клетки, ткань или орган. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на митохондрии.

[00346] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой редакторный домен.

Если РНК-направляемый ДНК-связывающий агент направляется на его последовательность, *например*, когда Cas нуклеаза направляется на целевую последовательность с помощью gРНК, эффектор, такой как редакторный домен, может модифицировать целевую последовательность или воздействовать на нее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффекторный домен, такой как редакторный домен, может быть выбран из домена, связывающего нуклеиновые кислоты, домена нуклеазы (например, домена отличной от Cas нуклеазы), домена эпигенетической модификации, активирующего транскрипцию домена или домена транскрипционного репрессора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу, такую как нуклеаза FokI. См., например, патент США № 9023649. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой транскрипционный активатор или репрессор. См., например, Qi et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression,” Cell 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., “RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors,” Nat. Methods 10:973-6 (2013); Mali et al., “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering,” Nat. Biotechnol. 31:833-8 (2013); Gilbert et al., «CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes,» Cell 154:442-51 (2013). Как таковой, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент по существу становится фактором транскрипции, который может быть направлен на связывание желаемой целевой последовательности с помощью направляющей РНК.

#### Определение эффективности направляющих РНК

[00347] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК определяется при доставке или экспрессии вместе с другими компонентами (*например*, РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом), образующими RNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК экспрессируется вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим, таким как Cas белок, *например*, Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК доставляется или экспрессируется в клеточной линии, которая уже стабильно экспрессирует РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как Cas нуклеаза или никаза, *например*, Cas9 нуклеаза или никаза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК доставляется в клетку как часть RNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК доставляется в клетку вместе с mРНК, кодирующей РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как Cas нуклеаза или никаза, *например*, Cas9 нуклеаза или никаза.

[00348] Как описано в настоящем документе, применение РНК-направляемой ДНК-нуклеазы и направляющей РНК, описанных в настоящем документе, может привести к DSB, SSB и/или сайт-специфичному связыванию, что обуславливает модификацию

нуклеиновой кислоты в ДНК или пре-mРНК, которая вызывает ошибки в виде мутаций вставки/делеции (индел) при восстановлении посредством клеточного механизма. Многие мутации из-за инделов изменяют рамку считывания, вводят преждевременные стоп-кодоны или вызывают пропуск экзонов и, следовательно, производят нефункциональный белок.

[00349] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность конкретных направляющих РНК определяют на основе моделей *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель *in vitro* представляет собой Т-клеточную линию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель *in vitro* представляет собой Т-клетки НЕК293. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель *in vitro* представляет собой клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие Cas9 (НЕК293\_Cas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель *in vitro* представляет собой линию лимфобластоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель *in vitro* представляет собой первичные Т-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель *in vitro* представляет собой первичные В-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель *in vitro* представляет собой первичные лимфоциты периферической крови человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель *in vitro* представляет собой первичные мононуклеарные клетки периферической крови человека.

[00350] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество нецелевых сайтов, в которых происходит делеция или вставка, в модели *in vitro* определяют, например, путем анализа геномной ДНК из клеток, трансфицированных *in vitro* mРНК Cas9 и направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такое определение включает анализ геномной ДНК из клеток, трансфицированных *in vitro* mРНК Cas9, направляющей РНК и донорного олигонуклеотида. Типовые процедуры для таких определений представлены в рабочих примерах ниже.

[00351] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность конкретных gРНК определяют на множестве клеточных моделей *in vitro* для процесса отбора направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения проводят сравнение данных клеточной линии с отобранными направляющими РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выполняется перекрестный скрининг во множестве моделей клеток.

[00352] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК оценивают по эффективности расщепления мишени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК измеряется процентом редактирования в целевом месте, *например*, HLA-A или СPТА. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно

применять глубокое секвенирование для выявления наличия модификаций (*например*, вставок, делеций), внесенных в результате редактирования генов. Процент инделов может быть рассчитан по результату секвенирования следующего поколения «NGS».

[00353] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК измеряют по количеству и/или частоте инделов в нецелевых последовательностях в геноме целевого типа клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены эффективные направляющие РНК, которые продуцируют инделы в нецелевых сайтах с очень низкой частотой (*например*, <5%) в клеточной популяции и/или относительно частоты образования вставок в целевом сайте. Таким образом, настоящее изобретение относится к направляющим РНК, которые не способствуют образованию нецелевых инделов в целевых типах клеток (*например*, Т-клетках или В-клетках) или которые вызывают образование нецелевых вставок с частотой <5% в клеточной популяции и/или относительно частоты создания делеций в целевом сайте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены направляющие РНК, которые не способствуют образованию нецелевых инделов в целевых типах клеток (*например*, Т-клетках или В-клетках). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены направляющие РНК, которые продуцируют инделы менее чем в 5 нецелевых сайтах, *например*, при оценке с помощью одного или большего количества способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены направляющие РНК, которые продуцируют инделы в менее чем или в 4, 3, 2 или 1 нецелевом(ых) сайте(ах), *например*, при оценке с помощью одного или большего количества способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нецелевой(е) сайт(ы) не встречается в области, кодирующей белок, в геноме целевой клетки (*например*, Т-клетки или В-клетки).

[00354] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линейная амплификация применяется для обнаружения событий редактирования генов, таких как образование мутаций вставки/делеции («индел»), транслокаций и случаев гомологически направленной репарации (HDR) в целевой ДНК. *Например*, может быть применена линейная амплификация с уникальным праймером с меченой последовательностью и выделением меченых продуктов амплификации (далее именуемая как «UnIT» или «способ мечения уникальным идентификатором»).

[00355] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК измеряется количеством хромосомных перестроек в целевых типах клеток. Анализ хроматида dGH можно применять для обнаружения хромосомных перестроек, включая, *например*, транслокации, реципрокные транслокации, транслокации в нецелевые хромосомы, делеции (*т. е.* хромосомные перестройки, при которых фрагменты были потеряны во время цикла репликации клеток из-за явления редактирования). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевой тип клеток имеет менее 10, менее 8, менее 5, менее 4, менее 3, менее 2 или менее 1

хромосомной перестройки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения тип целевой клетки не имеет хромосомных перестроек.

#### Доставка композиций gРНК

[00356] Липидные наночастицы (композиции LNP) являются хорошо известными средствами доставки нуклеотидного и белкового груза и могут быть применены для доставки направляющих РНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP доставляют нуклеиновую кислоту, белок или нуклеиновую кислоту вместе с белком.

[00357] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ доставки любой из gРНК, описанных в настоящем документе, субъекту, при этом gРНК составлена как LNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP содержит gРНК и Cas9 или mРНК, кодирующую Cas9.

[00358] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая любую из описанных gРНК и LNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция дополнительно содержит Cas9 или mРНК, кодирующую Cas9.

[00359] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP содержат катионные липиды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP содержат (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат) или другой ионизируемый липид. См., например, липиды, описанные в документе WO/2017/173054 и ссылки, приведенные в нем. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP содержат молярные соотношения катионного липидного амина к фосфату РНК (N:P) около 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термины «катионный» и «ионизируемый» в контексте липидов LNP являются взаимозаменяемыми, например, при этом ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от pH.

[00360] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в настоящем документе, составлены в виде композиций LNP для применения при приготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения.

[00361] Электропорация является хорошо известным способом доставки груза, и любая методология электропорации может быть применена для доставки любой из gРНК, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения электропорация может быть применена для доставки любой из gРНК, описанных в настоящем документе, а также Cas9 или mРНК, кодирующей Cas9.

[00362] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение включает способ доставки любой из gРНК, описанных в настоящем

документе, в клетку *ex vivo*, при этом gРНК составлена как LNP или не составлена как LNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP содержит gРНК и Cas9 или mРНК, кодирующую Cas9.

[00363] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции направляющей РНК, описанные в настоящем документе, отдельно или закодированные на одном или большем количестве векторов, входят в состав липидных наночастиц или вводятся посредством их; см., например, WO/2017/173054 и WO 2019/067992, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00364] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены векторы ДНК или РНК, кодирующие любую из направляющих РНК, содержащих любую одну или большее количество направляющих последовательностей, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, в дополнение к последовательностям направляющих РНК, указанные векторы дополнительно содержат нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющие РНК. Нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющую РНК, включают, помимо прочего, промоторы, энхансеры, регуляторные последовательности и нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой нуклеазу, такую как Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих crРНК, trРНК или crРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих sgРНК и mРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой Cas нуклеазу, такую как Cas9 или Cpf1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих crРНК, trРНК и mРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой Cas белок, такой как Cas9. В одном варианте осуществления настоящего изобретения Cas9 получают из *Streptococcus pyogenes* (т.е. Spy Cas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая crРНК, trРНК или crРНК и trРНК (которая может представлять собой sgРНК), содержит или состоит из направляющей последовательности, фланкированной целой или частью повторяющейся последовательности из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. Нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из crРНК, trРНК или crРНК и trРНК, может дополнительно содержать векторную последовательность, при этом векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые не встречаются в природе вместе с crРНК, trРНК или crРНК и trРНК.

Терапевтические способы и способы применения

[00365] Любые из сконструированных клеток человека и композиций, описанных в

настоящем документе, можно применять в способе лечения различных заболеваний и нарушений, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированная клетка (сконструированная клетка) и/или популяция генетически модифицированных клеток (сконструированная клетка) и композиции могут быть применены в способах лечения различных заболеваний и нарушений. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения любого из заболеваний или нарушений, описанных в настоящем документе, включающий введение любой одной или большего количества композиций, описанных в настоящем документе.

[00366] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний или нарушений, требующих доставки терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ обеспечения иммунотерапии для субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества сконструированной клетки (или популяции сконструированных клеток), как описано в настоящем документе, например, клетки по любому из вышеупомянутых клеточных аспектов и вариантов осуществления.

[00367] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают введение субъекту композиции, содержащей сконструированную клетку, описанную в настоящем документе, в качестве терапии методом адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00368] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают введение субъекту композиции, содержащей сконструированную клетку, описанную в настоящем документе, при этом указанная клетка продуцирует, секретирует и/или экспрессирует полипептид (например, нацеливающий рецептор), пригодный для лечения заболевания или нарушения у субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная клетка действует как клеточная фабрика по продуцированию растворимого полипептида. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка действует как клеточная фабрика по продуцированию антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная клетка непрерывно секретирует полипептид *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная клетка непрерывно секретирует полипептид после трансплантации *in vivo* в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная клетка непрерывно секретирует полипептид после трансплантации *in vivo* в течение более 6 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид (*например*, антитело) продуцируется клеткой в концентрации по меньшей мере  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  или  $10^8$  копий в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид представляет собой антитело и

продуцируется клеткой в концентрации по меньшей мере  $10^8$  копий в день.

[00369] В некоторых вариантах осуществления способов, указанный способ включает введение лимфодеплетирующего агента или иммунодепрессанта перед введением субъекту эффективного количества сконструированной клетки (или сконструированных клеток), как описано в настоящем документе, например, клетки по любому из вышеупомянутых клеточных аспектов и вариантов осуществления. В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения сконструированных клеток (*например*, популяции сконструированных клеток).

[00370] Иммуноterapia - это лечение заболевания путем активации или подавления иммунной системы. Иммуноterapia, предназначенная для индукции или усиления иммунного ответа, классифицируется как активационная иммуноterapia. Было продемонстрировано, что клеточная иммуноterapia эффективна при лечении некоторых видов рака. Иммунные эффекторские клетки, такие как лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, клетки-натуральные киллеры (NK), цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), Т-хелперы, В-клетки или их предшественники, такие как гемопоэтические стволовые клетки (HSC) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) можно запрограммировать на действие в ответ на аномальные антигены, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток. Таким образом, иммуноterapia рака позволяет компонентам иммунной системы уничтожать опухоли или другие раковые клетки. Также было продемонстрировано, что клеточная иммуноterapia эффективна при лечении аутоиммунных заболеваний или отторжения трансплантата. Иммунные эффекторские клетки, такие как регуляторные Т-клетки (Treg) или мезенхимальные стволовые клетки, могут быть запрограммированы на действие в ответ на аутоантигены или антигены трансплантата, экспрессируемые на поверхности нормальных тканей.

[00371] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ получения сконструированных клеток (*например*, популяции сконструированных клеток). Популяция сконструированных клеток может быть применена для иммунотерапии.

[00372] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение сконструированных клеток, полученных с помощью описанного в настоящем документе способа получения клеток, например, с помощью способа по любому из вышеупомянутых аспектов и вариантов осуществления способов получения клеток.

[00373] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки можно применять для лечения рака, инфекционных заболеваний, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических заболеваний, офтальмологических заболеваний, заболеваний почек, заболеваний печени, заболеваний опорно-двигательного аппарата, заболеваний эритроцитов или отторжения трансплантата. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки можно

применять для трансплантации клеток, например, в сердце, печень, легкое, почку, поджелудочную железу, кожу или головной мозг. (См., *например*, Deuse et al., Nature Biotechnology 37:252-258 (2019).)

[00374] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки можно применять в качестве клеточной терапии, включающей терапию аллогенными стволовыми клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия включает индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs). iPSCs можно индуцировать для дифференцировки в другие типы клеток, включая, *например*, бета-островковые клетки, нейроны и клетки крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия включает гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают мезенхимальные стволовые клетки, которые могут развиваться в костные, хрящевые, мышечные и жировые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают глазные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллогенная трансплантация стволовых клеток включает аллогенную трансплантацию костного мозга. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают плюрипотентные стволовые клетки (PSCs). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают индуцированные эмбриональные стволовые клетки (ESC).

[00375] Описанные в настоящем документе сконструированные клетки человека пригодны для дальнейшего конструирования, *например*, путем введения дополнительно отредактированных или модифицированных генов или аллелей. Клетки по изобретению также могут быть пригодны для дальнейшего конструирования путем введения экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей, например, нацеливающий рецептор, *например*, TCR, CAR, UniCAR. CAR также известны как химерные иммунорецепторы, химерные рецепторы Т-клеток или искусственные рецепторы Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения TCR представляет собой TCR дикого типа или вариант TCR.

[00376] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия представляет собой терапию трансгенными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия включает трансгенную Т-клетку, нацеленную на белок 1 опухоли Вильмса (WT1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия включает нацеливающий рецептор или донорную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор коммерчески доступной Т-клеточной терапии, такой как CAR-Т-клеточная терапия. В настоящее время для клеточной терапии одобрен ряд нацеливающих рецепторов. Клетки и способы, предложенные в настоящем документе, можно применять с этими известными конструкциями. Коммерчески одобренные клеточные продукты, которые включают конструкции нацеливающих рецепторов для применения в качестве клеточной терапии,

включают, *например*, Kymriah® (tisagenlecleucel); Yescarta® (аксикабтаген цилолеуцель); Tecartus™ (брексукабтаген аутолеуцель); Tabelecleucel (Tab-cel®); Vivalym-M (ALVR105); и Vivalym-C.

[00377] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают введение сконструированных клеток субъекту, при этом введение представляет собой инъекцию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают введение сконструированных клеток субъекту, при этом введение представляет собой внутрисосудистую инъекцию или инфузию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают введение сконструированных клеток субъекту, при этом введение представляет собой разовую дозу.

[00378] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы обеспечивают уменьшение признака или симптома, ассоциированного с заболеванием субъекта, получающего лечение композицией, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более одной недели. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более двух недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более трех недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более одного месяца.

[00379] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы включают введение сконструированных клеток субъекту, при этом у субъекта наблюдается ответ на введенную клетку, который включает уменьшение признака или симптома, ассоциированного с заболеванием, которое лечится клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ, который длится более одной недели. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ, который длится более одного месяца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ, который длится по меньшей мере 1-6 недель.

[00380] **Таблица 6. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

<b>Описание</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Последовательность</b>
Типовая направляющая последовательность для гена EMX1	230	GAGUCCGAGCAGAAGAAGAA

Типовая направляющая последовательность для гена VEGFA	231	GACCCCCUCCACCCCGCCUC
Типовая направляющая последовательность для гена RAG1B	232	GACUUGUUUUCAUUGUUCUC
Типовая направляющая последовательность для гена TRAC	233	CUCUCAGCUGGUACACGGCA
Типовая направляющая последовательность для гена СИТА	234	UGUGCAGACUCAGAGGUGAG
Типовая направляющая последовательность для гена В2М	235	GGCCACGGAGCGAGACAUCU
Типовая направляющая для гена СИТА	236	CCCCCGGACGGUUCAAGCAA
	237-239	Не применяется
РНК, нацеленная на EMX1, разработанная для направления на G000644, с направляющей последовательностью SEQ ID NO: 230	240	mG*mA*mG*UCCGAGCAGAAGAAGAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G000645 Направляющая РНК, нацеленная на VEGFA, с направляющей последовательностью SEQ ID NO: 231	241	mG*mA*mC*CCCCUCCACCCCGCCUCGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
РНК, нацеленная на RAG1B, разработанная	242	mG*mA*mC*UUGUUUUCAUUGUUCUCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA

для направления на G000646, направляющей последовательностью SEQ ID NO: 232		AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
PHK, нацеленная на TRAC, разработанная для направления на G013006, направляющей последовательностью SEQ ID NO: 233	243	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
PHK, нацеленная на СПТА, разработанная для направления на G018091, направляющей последовательностью SEQ ID NO:234	244	mU*mG*mU*GCAGACUCAGAGGUGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
PHK, нацеленная на B2M, разработанная для направления на G000529, направляющей последовательностью SEQ ID NO:235	245	mG*mG*mC*CACGGAGCGAGACAUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
PHK, нацеленная на СПТА, разработанная для направления на G013675, направляющей последовательностью SEQ ID NO:236	246	mC*mC*mC*CCGGACGGUUCAAGCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G016239	247	mG*mG*mC*CUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA

		AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G013676	248	mU*mG*mG*UCAGGGCAAGAGCUAUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
Аминокислотная последовательность рекомбинантного Cas9- NLS	800	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVL GNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRR YTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLV EEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSAR LSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPN FKSNFDLAEDAQLQSKD TYDDDLDNLLAQIGDQY ADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMT RKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN LPNEKVLPKHSLLEYEYFTVYNELTKVKYVTEGMR KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFL DNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLF DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGK TILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDDELV KVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMK RIEEDIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQL LNAKLITQRKFDNLTKAERGGELSELDKAGFIKRQL

		<p>VETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT  LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA  VVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSE  QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI  ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKK  TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYG  GFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITI  MERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLF  ELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYL  ASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQIS  EFSKR VILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENII  HLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT  LIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV</p>
<p>ORF, кодирующая Sp. Cas9</p>	<p>801</p>	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATC  GGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACA  GACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAG  GTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAG  AAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGC  GGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAG  AACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGA  ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAA  CGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCA  CAGACTGGAAGAAAGCTTCTGCTCGAAGAAGA  CAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAA  CATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTA  CCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGT  CGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGAT  CTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGA  GGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCG  GACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAG  CTGGTCCAGACATAACAACCAGCTGTTCGAAGAA  AACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAG  GCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGA  AGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGA  GAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATC</p>

GCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAG  
AGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTG  
CAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTG  
GACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTAC  
GCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGC  
GACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTC  
AACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCA  
AGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAG  
GACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAG  
CAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCG  
ACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCG  
ACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGT  
TCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA  
CAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAG  
ACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACG  
GAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAAC  
TGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCT  
ACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCG  
AAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGT  
CGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGC  
ATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCAC  
ACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG  
AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC  
AAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT  
CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTC  
ACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTAC  
GTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTG  
AGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTG  
CTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAAG  
CAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAA  
TGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAA  
GACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAC  
GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTC  
CTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAA  
GACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACA

GAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACG  
CACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGC  
TGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGAC  
TGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACA  
AGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGA  
AGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCATGC  
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGG  
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGG  
GAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGG  
CAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGC  
AGACAGTCAAGGTCGTTCGACGAACTGGTCAAGG  
TCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCA  
TCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGA  
AGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAG  
AGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGC  
CAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACA  
CAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTAC  
CTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTTCGACCAG  
GAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGAC  
GTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGG  
ACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAA  
GCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCC  
CGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACT  
ACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCA  
CACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG  
AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAG  
GATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGAC  
AGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACA  
GCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACA  
AGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGA  
AGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACT  
TCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAATA  
CCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGT  
CGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAA  
GCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAA

		GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAG CGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTA CTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAG ACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGA AAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTC GCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAG GTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACA GGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAG AGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAG GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGAC AGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCG CAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTG AAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATC ATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATC GACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTC AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTAC AGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGA ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAGTGCAGAAGGGA AACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAAC TTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGA AGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAG CTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACG AAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGA GAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGG TCCTGAGCGCATAACAAGCACAGAGACAAGC CGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC TGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAG CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAA AGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACG CAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGT ACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAG GAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA AAGGTCTAG
ORF, кодирующая Sp.	802	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATC

Cas9	GGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACC GACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAG GTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAG AAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACTCCG GCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA CCGCCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGA GATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGG CTGGAGGAGTCCTTCTTGGTGGAGGAGGACAAG AAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATC GTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGAC TCCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACC TGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGCCA CTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAC TCCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGC AGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCA TCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCT GTCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCC GGCGGCTGGAG AACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAG AACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCC TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGTCCA ACTTCGA CCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAA GGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT GGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTC CTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC TGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCAC CAAGGCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGG TACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTG AAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAG TACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACG GCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCA GGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTG GAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTG AAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAG
------	--

CGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCACCAGA  
TCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCG  
GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAAC  
CGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGG  
ATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGGCA  
ACTCCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGTCCGA  
GGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGT  
GGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCAGTCCTTCATC  
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCC  
AACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGT  
ACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCA  
AGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGC  
CCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCA  
TCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT  
GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAA  
GAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCC  
GGCGTGGAGGACCGGTTC AACGCCTCCCTGGGC  
ACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGAC  
AAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGAC  
ATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGT  
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGA  
AGACCTACGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGAT  
GAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTG  
GGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCAT  
CCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGA  
CTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC  
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCT  
TCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCG  
GCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCA  
ACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCA  
TCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGG  
TGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACA  
TCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCA  
CCCAGAAGGGCCAGAAGA ACTCCCGGGAGCGGA  
TGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGG

GCTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGA  
ACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGT  
ACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGG  
ACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACT  
ACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCT  
GAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGAC  
CCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAA  
CGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA  
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCT  
GATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAA  
GGCCGAGCGGGGCGCCTGTCCGAGCTGGACAA  
GGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGAC  
CCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCT  
GGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAA  
CGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCAC  
CCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAG  
GACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACA  
ACTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGC  
CGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCC  
CAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTAC  
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAG  
TCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAG  
TACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACTTCTTCAA  
GACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCG  
GAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGAC  
CGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT  
CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAG  
GTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACC  
GGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCAAGC  
GGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCCGAAGAAGG  
ACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACT  
CCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGC  
CAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAA  
GTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATG  
GAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAACCCCATCGACT

		<p>TCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGA  AGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCT  GTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCT  GGCCTCCGCCGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGA  GCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCCTG  TACCTGGCCTCCCCTACGAGAAGCTGAAGGGCT  CCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCG  TGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCA  TCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGAT  CCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCC  GCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGG  GAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCC  TGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTA  CTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACAC  CTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATC  CACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGG  ATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGC  GGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA</p>
<p>Открытая рамка считывания для Cas9 с меткой Hibt</p>	<p>803</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAU  CGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCAC  CGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCA  AGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCA  AGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUUGCUGUUCGACU  CCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGC  GGACCGCCCGGGCGGGUACACCCGGCGGAAGA  ACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCA  ACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUCC  ACCGGCUGGAGGAGUCCUUCUGGUGGAGGAG  GACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGC  AACAUUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAA  GUACCCACCAUCUACCACCUUGCAGGAAGAAGCU  GGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUUGCAGGCU  GAUCUACCUGGCCCUUGGCCACAUGAUCAGUU  CCGGGGCCACUUCUGAUCGAGGGCGACCUGAA  CCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAU</p>

CCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGA  
GGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGC  
CAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUC  
CCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCC  
CGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACC  
UGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACU  
UCAAGUCCAACUUCGACCUGGGCCGAGGACGCCA  
AGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACG  
ACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGAUCCGGCGACC  
AGUACGCCGACCUGUUCUGGGCCGCCAAGAACC  
UGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUC CUGC  
GGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGU  
CCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACC  
ACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCUGGUGC  
GGCAGCAGCUGCCCCGAGAAGUACAAGGAGAUC  
UUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGC  
UACAUCGACGGCGGCCUCCAGGAGGAGUUC  
UACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAU  
GGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGA  
ACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCU  
UCGACAACGGCUCCAUCCCCACCAGAUCCACC  
UGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGG  
AGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGG  
AGAAGAU CGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUC  
CCCUACUACGUGGGCCCCUGGCCCGGGGCAAC  
UCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAG  
GAGACCAUCACCCCUUGGAACUUCGAGGAGGUG  
GUGGACAAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUCAUC  
GAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCC  
AACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUG  
UACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACC  
AAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGC GGAA  
GCCCGCCUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGC  
CAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAA  
GGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACU

UCAAGAAGAUUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAG  
AUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCUCC  
CUGGGCACCUACCACGACCUUGCUGAAGAUCAUC  
AAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAA  
CGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCU  
GACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGG  
AGCGGCUGAAGACCUACGCCACCUGUUCGACG  
ACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGGCGG  
UACACCGGCUGGGGCGGCUGUCCCGGAAGCUG  
AUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAG  
ACCAUCCUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUUC  
GCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGAC  
GACUCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAG  
GCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCUGCAC  
GAGCACAUCGCCAACCUUGGCCGGCUCCCCGCC  
AUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGU  
GGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGC  
ACAAGCCCAGAAACAUCGUGAUCGAGAUGGCC  
GGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAG  
AACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGA  
GGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCAGAUCCUGA  
AGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGA  
ACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAAC  
GGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGA  
CAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCA  
CAUCGUGCCCCAGUCCUUCUGAAGGACGACUC  
CAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAA  
GAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCGA  
GGAGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGC  
GGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGC  
GGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGG  
GGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUC  
AUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAU  
CACCAAGCACGUGGCCAGAUCCUGGACUCCCG  
GAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGC

UGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAG  
UCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUC  
CAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUAACAACUA  
CCACCACGCCACGACGCCUACCUGAACGCCGU  
GGUGGGCACCGCCCUGAUAAGAAGUACCCCAA  
GCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACA  
AGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAG  
UCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAG  
UACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUC  
AAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUC  
CGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAG  
ACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGA  
CUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCC  
CCAGGUGAACAUUCGUGAAGAAGACCGAGGUGC  
AGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGC  
CCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGA  
AGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGC  
UUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUG  
GUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAA  
GAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCA  
UCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGA  
ACCCAUCGACUUCUCCUGGAGGCCAAGGGCUACA  
AGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUG  
CCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGC  
CGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUG  
CAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUCCUCCAAG  
UACGUGAACUUCUGUACCUGGCCUCCACUAC  
GAGAAGCUGAAGGGCUCCCCGAGGACAACGA  
GCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGC  
ACUACCUGGACGAGAUAUCGAGCAGAUCUCCG  
AGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCA  
ACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGC  
ACCGGACAAGCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGA  
ACAUCAUCCACCGUUCACCCUGACCAACCUGG  
GCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCA

		<p>CCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGG  AGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCA  UCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGU  CCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGCUGCUCSCCA  AGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCC  CCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGA  AGAUCUCCUGA</p>
<p>Открытая рамка  считывания для BC22n</p>	<p>804</p>	<p>AUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCAC  CUGAUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUC  AACAAACGGCAUCGGCCGGCACAAGACCUACCUG  UGCUCGAGGUGGAGCGGCUGGACAACGGCAC  CUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCUUCCU  GCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCUU  CUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGA  CCUGGUGCCCUCCUGCAGCUGGACCCCGCCCA  GAUCUACCGGGUGACCUGGUUCAUCUCCUGGUC  CCCCUGCUUCUCCUGGGGCUGCGCCGGCGAGGU  GCGGGCCUUCUGCAGGAGAACACCCACGUGCG  GCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUA  CGACCCCUUGUACAAGGAGGCCUGCAGAUGCU  GCGGGACGCCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGAC  CUACGACGAGUUCAAGCACUGCUGGGACACCUU  CGUGGACCACCAGGGCUGCCCUUCCAGCCCUG  GGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCCUGUC  CGGCCGGCUGCGGGCCAUCUGCAGAACCAGGG  CAACUCCGGCUCCGAGACCCCGGCACCUCCGA  GUCCGCCACCCCGAGUCCGACAAGAAGUACUC  CAUCGGCCUGGCCAUCGGCACCAACUCCGUGGG  CUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCC  CUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCG  ACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCG  CCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGG  CCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGU  ACACCCGGCGGAAGAACCGBAUCUGCUACCUGC  AGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUG</p>

GACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCC  
UUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCG  
GCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGU  
GGCCUACCACGAGAAGUACCCACCAUCUACCA  
CCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAA  
GGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCUUGGC  
CCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUCCUGAU  
CGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGU  
GGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCU  
ACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACG  
CCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCG  
CCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACC  
UGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACG  
GCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCUUGUCCUUGG  
GCCUGACCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACC  
UGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGG  
ACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGG  
CCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCC  
UGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGC  
UGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUCA  
CCAAGGCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGC  
GGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGC  
UGAAGGCCUUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGA  
AGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAG  
AACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCC  
UCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCC  
AUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCU  
GCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGC  
GGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCC  
CCCACCAGAUCACCUGGGCGAGCUGCACGCCA  
UCCUGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCC  
UGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUC  
CUGACCUUCCGGAUCCCUACUACGUGGGCCCC  
CUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUG  
ACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCUUGG

AACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUC  
CGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUU  
CGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCC  
CAAGCACUCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGU  
GUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGA  
CCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCG  
GCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUG  
UUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCA  
GCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGU  
GCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAG  
GACCGGUUCAACGCCUCCUGGGCACCUACCAC  
GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUU  
CCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGG  
AGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGG  
ACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACC  
UACGCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAA  
GCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGG  
GCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCAACGGCAUCC  
GGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACU  
UCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACU  
UCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCUGACCU  
UCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUGUCC  
GGCCAGGGCGACUCCUGCAGGACACAUCGCC  
AACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGC  
AUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCU  
GGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGA  
ACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAG  
ACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAG  
CGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGA  
GCUGGGCUCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGU  
GGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGU  
ACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGU  
ACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUG  
UCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAG  
UCCUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAG

GUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAG  
UCCGACAACGUGCCCUCGAGGAGGUGGUGAA  
GAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGA  
ACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACA  
ACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCG  
AGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGC  
UGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUG  
GCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAG  
UACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGU  
GAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGU  
CCGACUUCCGGAAGGACUUCAGUUCUACAAGG  
UGC GGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCACG  
ACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCC  
UGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAG  
UUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGU  
GCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGA  
UCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACU  
CCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCA  
CCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCC  
UGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUC  
GUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGU  
GCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACA  
UCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGC  
UUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAAC  
UCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUG  
GGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCC  
CACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAA  
GGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGU  
CCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUG  
GAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGAC  
UUCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAA  
GAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUC  
CCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGA  
UGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCA  
ACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACU

		<p>UCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGA  AGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGC  UGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGAC  GAGAUCAUCGAGCAGAUUCUCCGAGUUCUCCAA  GCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAA  GGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAA  GCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCA  CCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGC  CGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCG  GAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGG  ACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCC  UGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGG  GCGGGCAGCGCGGCGGCUCCCCAAGAAGAAGC  GGAAGGUGUGA</p>
<p>Открытая рамка  считывания для BC22n  с меткой Hibt</p>	805	<p>AUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCAC  CUGAUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUC  AACAAACGGCAUCGGCCGGCACAAGACCUACCUG  UGCUCGAGGUGGAGCGGCUGGACAACGGCAC  CUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCUUCCU  GCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCUU  CUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGA  CCUGGUGCCCUCCCUGCAGCUGGACCCCGCCA  GAUCUACCGGGUGACCUGGUUCAUCUCCUGGUC  CCCCUGCUUCUCCUGGGGUGCGCCGGCGAGGU  GCGGGCCUUCUGCAGGAGAACACCCACGUGCG  GCUGCGGAUCUUCGCCGCCCAGAUCAACGACUA  CGACCCCUUGUACAAGGAGGCCUGCAGAUGC  GCGGGACGCCGGCGCCAGGUGUCCAUCAUGAC  CUACGACGAGUUCAAGCACUGCUGGGACACCUU  CGUGGACCACCAGGGCUGCCCCUCCAGCCCUG  GGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCUUGUC  CGGCCGGCUGCGGGCCAUCUGCAGAACCAGGG  CAACUCCGGCUCCGAGACCCCGGCACCUCCGA  GUCCGCCACCCCGAGUCCGACAAGAAGUACUC  CAUCGGCCUGGCCAUCGGCACCAACUCCGUGGG</p>

CUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCC  
CUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCG  
ACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCG  
CCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGG  
CCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGGCGGU  
ACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGC  
AGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUG  
GACGACUCCUUCUUCACCGGCUGGAGGAGUCC  
UUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCG  
GCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGU  
GGCCUACCACGAGAAGUACCCACCAUCUACCA  
CCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAA  
GGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGC  
CCACAUGAUCAAGUUCGGGGCCACUUCUGAU  
CGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGU  
GGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCU  
ACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACG  
CCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCG  
CCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACC  
UGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACG  
GCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGG  
GCCUGACCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACC  
UGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGG  
ACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGG  
CCCAGAUCCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUC  
UGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGC  
UGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUCA  
CCAAGGCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGC  
GGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGC  
UGAAGGCCCUUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGA  
AGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAG  
AACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGGCGCC  
UCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCC  
AUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCU  
GCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGC

GGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCC  
CCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCA  
UCCUGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCC  
UGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUC  
CUGACCUUCCGGAUCCCUACUACGUGGGCCCC  
CUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUG  
ACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUACCCCCUGG  
AAUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUC  
CGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACU  
CGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCC  
CAAGCACUCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGU  
GUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGA  
CCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUCCUGUCCG  
GCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUG  
UUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCA  
GCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGU  
GCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAG  
GACCGGUUCAACGCCUCCUGGGCACCUACCAC  
GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUU  
CCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGG  
AGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGG  
ACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACC  
UACGCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAA  
GCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGG  
GCCGGCUGUCCGGAAGCUGAUCAACGGCAUCC  
GGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACU  
UCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACU  
UCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCUGACCU  
UCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUGUCC  
GGCCAGGGCGACUCCUGCACGAGCACAUCCGCC  
AACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGC  
AUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCU  
GGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGA  
ACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAG  
ACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAG

CGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGA  
GCUGGGCUCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGU  
GGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGU  
ACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGU  
ACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUG  
UCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAG  
UCCUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAG  
GUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAG  
UCCGACAACGUGCCCUCGAGGAGGUGGUGAA  
GAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGA  
ACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACA  
ACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCG  
AGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGC  
UGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUG  
GCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAG  
UACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGU  
GAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGU  
CCGACUUCCGGAAGGACUUCAGUUCUACAAGG  
UGC GGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCACG  
ACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCC  
UGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAG  
UUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGU  
GCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGA  
UCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACU  
CCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGGAGAUCA  
CCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCC  
UGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAU  
GUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGU  
GCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACA  
UCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGC  
UUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAAC  
UCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUG  
GGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCC  
CACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAA  
GGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGU

		<p>CCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUG  GAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGAC  UUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAA  GAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUC  CCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGA  UGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCA  ACGAGCUGGGCCUUGCCCUCCAAGUACGUGAACU  UCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGA  AGGGCUCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGC  UGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGAC  GAGAUCAUCGAGCAGAUUCUCCGAGUUCUCCAA  GCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAA  GGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAA  GCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCA  CCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGC  CGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCG  GAAGCGGUACACCUCACCAAGGAGGUGCUGG  ACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCC  UGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGG  GCGGCGACGGCGGCGGCUCSCCAAGAAGAAGC  GGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCG  UGUCCGGCUGGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCUC  UGA</p>
	806	Не применяется
Открытая рамка считывания для UGI	807	<p>AUGGGACCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGGAGG  AGGAAGCACAACCUGUCGGACAUCAUCGAAA  AGGAAACAGGAAAGCAGCUGGUCAUCCAGGAA  UCGAUCCUGAUGCUGCCGGAAGAAGUCGAAGA  AGUCAUCGGAAACAAGCCGGAUUCGGACAUCC  UGGUCCACACAGCAUACGACGAAUCGACAGACG  AAAACGUCAUGCUGCUGACAUCGGACGCACCGG  AAUACAAGCCGUGGGCACUGGUCAUCCAGGAC  UCGAACGGAGAAAACAAGAUCAAGAUGCUGUG  A</p>
Открытая рамка	808	AUGACCAACCUGUCCGACAUCAUCGAGAAGGA

считывания для UGI		<p>GACCGGCAAGCAGCUGGUGAUCCAGGAGUCCA  UCCUGAUGCUGCCCGAGGAGGUGGAGGAGGUG  AUCGGCAACAAGCCCGAGUCCGACAUCCUGGUG  CACACCGCCUACGACGAGUCCACCGACGAGAAC  GUGAUGCUGCUGACCUCCGACGCCCCGAGUAC  AAGCCCUGGGCCCUGGUGAUCCAGGACUCCAAC  GGCGAGAACAAGAUCAAGAUGCUGUCCGGCGG  CUCCAAGCGGACCGCCGACGGCUCCGAGUUCGA  GUCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGUGA</p>
<p>Аминокислотная  последовательность  Cas9, кодируемая SEQ  ID No. 801-802</p>	809	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVL  GNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRR  YTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLV  EEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV  DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS  DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSAR  LSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPN  FKSNFDLAEDAQLQSKDLYDDDLNLLAQIGDQY  ADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK  RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG  YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNL  REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY  PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMT  RKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN  LPNEKVLPKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMR  KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK  KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFL  DNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLF  DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGK  TILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV  SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIQTVKVVDDELV  KVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMK  RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQN  GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSID  NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQL  LNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQL</p>

		<p>VETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT  LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA  VVGOTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSE  QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI  ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKK  TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYG  GFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKLKSVKELLGITI  MERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLF  ELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYL  ASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQIS  EFSKR VILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENII  HLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT  LIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV</p>
<p>Последовательность  аминокислот Cas9 с  меткой Hibit</p>	<p>810</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVL  GNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRR  YTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDD SFFHRLEESFLV  EEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLV  DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS  DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSAR  LSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPN  FKSNFDLAEDAQLQSKD TYDDDLNLLAQIGDQY  ADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK  RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG  YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN  REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY  PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMT  RKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN  LPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMR  KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK  KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFL  DNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLF  DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGK  TILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV  SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDDELV  KVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMK</p>

		<p>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN  GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSID  NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQL  LNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQL  VETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT  LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA  VVGITALIKKYPKLESEFVYGDKVYDVRKMIKSE  QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI  ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKK  TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYG  GFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKLKS VKELLGITI  MERSSEKKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLF  ELENKRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYL  ASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQIS  EFSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENII  HLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DAT  LIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKR KVSES  ATPESVSGWRLFKKIS</p>
<p>Аминокислотная  последовательность для  BC22n</p>	<p>811</p>	<p>MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCY  EVERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGR  HAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTFISWSPCFSWG  CAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEAL  QMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQ  PWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSE  SATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKK  FKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRT  ARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSSFFHRLE  ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL  RKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL  NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK  AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASL  GLTPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLDNLLAQ  IGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS  ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP EKYKEIFFD  QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEEL</p>

		<p>LVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRR  QEDFYPPFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRF  AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTN  FDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE  GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE  DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIID  KDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKY  AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK  QSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQ  KAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV  DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR  ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY  YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLK  DDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY  WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFI  KRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE  VKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDA  YLNNAVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKM  IAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR  KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVN  IVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK  KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKEL  LGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIILPK  YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF  LYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIE  QISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAE  NIIHLFTLTNLGAPAAFYFDTTIDRKRYTSTKEVL  DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKRKY  *</p>
<p>Аминокислотная  последовательность для  BC22n с меткой Hibit</p>	<p>812</p>	<p>MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCY  EVERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGR  HAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTFISWSPCFSWG  CAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEAL  QMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQ  PWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSE</p>

SATPESDKKYSIGLAIGTNSVGVAVITDEYKVPSKK  
 FKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRT  
 ARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLE  
 ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL  
 RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL  
 NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK  
 AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASL  
 GLTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDQTYDDDLNLLAQ  
 IGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS  
 ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD  
 QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEEL  
 LVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRR  
 QEDFYFPLKDNREKIEKILFRIPYYVGPLARGNSRF  
 AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTN  
 FDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE  
 GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE  
 DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIID  
 KDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKY  
 AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK  
 QSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQ  
 KAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV  
 DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR  
 ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY  
 YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLK  
 DDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY  
 WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELKAGFI  
 KRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE  
 VKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDA  
 YLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKM  
 IAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR  
 KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVN  
 IVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK  
 KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKEL  
 LGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIJKLPK  
 YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF

		LYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIE QISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAE NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKRKV SESATPESVSGWRLFKKIS
	813	Не применяется
Аминокислотная последовательность для UGI	814	MTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKP ESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVI QDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVE
	815	Не применяется
PHK, нацеленная на B2M, разработанная для направления на G023519	816	mA*mC*mU*CACGCUGGAUAGCCUCCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCA CCGAGUCGmUmGmC*mU
Открытая рамка считывания для Cas9	817	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAU CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAU CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG AAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCU UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA UCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACC ACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAA AGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGAC CUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGG AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAA GCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCA GCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCG GAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGA CUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCCUGAU

CGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGAC  
UGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGA  
CUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUG  
GCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGA  
CACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGC  
ACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCU  
GGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU  
GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCA  
CAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG  
AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUG  
CUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGA  
AAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCA  
AGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGA  
GCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCA  
GCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAG  
AACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG  
CUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAG  
CAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCA  
CGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCC  
GUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAA  
AGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCG  
GACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCA  
UGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCAC  
ACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGG  
GAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUG  
ACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAA  
GGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUA  
CUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCA  
AGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCA  
UUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU  
CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCA  
CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAG  
AAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAG  
CGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGG  
GAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAG

GACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGA  
AGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGAC  
ACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAA  
GACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACA  
AGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUAC  
ACAGGAUAGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAU  
CAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGA  
CAAUCCUGGACUCCUGAAGAGCGACGGAUUC  
GCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGAC  
GACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA  
GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGC  
ACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGG  
CAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAG  
GUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAG  
ACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGG  
CAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAG  
AAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGA  
AGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCC  
UGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGC  
AGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG  
AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACU  
GGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCG  
ACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG  
ACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGC  
GACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCC  
GAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACU  
ACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC  
ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGC  
AGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGG  
CAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACA  
AGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG  
GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAA  
CGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCA  
CACUGAAGAGCAAGCUG  
GUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUA

CAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGC  
ACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAAC  
AGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAA  
GCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUAC  
GACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACA  
GGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCU  
UCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACA  
GAAAUACACUGGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA  
GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAG  
GAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUC  
GCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCA  
GGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGA  
CAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCG  
AAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAA  
GAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAU  
UCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGG  
UCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG  
AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAU  
CACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGA  
ACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUAC  
AAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCU  
GCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACG  
GAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAA  
CUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAG  
CAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCA  
CUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACA  
ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCAC  
AAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAU  
CAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAG  
ACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACA  
ACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAG  
GCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACA  
AACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC  
GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAG  
CACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA

		<p>CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA          UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGA          GGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG</p>
<p>Открытая рамка считывания для BC22</p>	<p>818</p>	<p>AUGGAAGCAAGCCCGGCAAGCGGACCGAGACAC          CUGAUGGACCCGCACAUCUUCACAAGCAACUUC          AACAAACGGAAUCGGAAGACACAAGACAUAACCU          GUGCUACGAAGUCGAAAGACUGGACAACGGAA          CAAGCGUCAAGAUGGACCAGCACAGAGGAUUC          CUGCACAACCAGGCAAAGAACCUGCUGUGCGGA          UUCUACGGAAGACACGCAGAACUGAGAUUCCU          GGACCUGGUCCCGAGCCUGCAGCUGGACCCGGC          ACAGAUCUACAGAGUCACAUGGUUCAUCAGCU          GGAGCCCGUGCUUCAGCUGGGGAUGCGCAGGA          GAAGUCAGAGCAUUUCUGCAGGAAAACACACA          CGUCAGACUGAGAAUCUUCGCAGCAAGAAUCU          AC          GACUACGACCCCGCUGUACAAGGAAGCACUGCAG          AUGCUGAGAGACGCAGGAGCACAGGUCAGCAU          CAUGACAUACGACGAAUUCAAGCACUGCUGGG          ACACAUUCGUCGACCACCAGGGAUGCCCGUUC          AGCCGUGGGACGGACUGGACGAACACAGCCAG          GCACUGAGCGGAAGACUGAGAGCAAUCCUGCA          GAACCAGGGAAACAGCGGAAGCGAAACACCGG          GAACAAGCGAAAGCGCAACACCGGAAAGCGAC          AAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCCAUCGGAAC          AAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACG          AAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC          CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAA          GAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCG          GAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGA          ACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAA          CAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA          ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUC          CACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGA          AGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCG</p>

GAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAA  
AAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAA  
GCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGA  
GACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA  
AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGAC  
CUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUG  
UUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUG  
UUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGU  
CGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGA  
GCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCA  
CAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUU  
CGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGAC  
ACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGA  
AGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAU  
ACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGA  
UCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAG  
CAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCG  
ACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAG  
GCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU  
CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAA  
GGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGU  
ACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC  
GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAG  
CCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGA  
UCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUG  
CUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAG  
AAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCC  
CGCACCAGAUCACCUGGGAGAACUGCACGCAA  
UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCC  
UGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC  
CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG  
CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAU  
GACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGU  
GGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCA  
AGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAA

CUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCU  
GCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC  
AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG  
UCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUG  
AGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCU  
GCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCA  
AGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUC  
GAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU  
CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAU  
ACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAG  
GACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU  
CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUU  
CGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGA  
AGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCA  
UGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGA  
UGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGG  
AAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCC  
UGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAAC  
AGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGC  
CUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACA  
GGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC  
ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCC GGCAAUCA  
AGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUC  
GACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAA  
GCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAG  
AAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAAC  
AGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGG  
AAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGG  
AACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACG  
AAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA  
AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU  
CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAU  
CGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAU  
C  
GACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAA

CAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCCGAGCGAAG  
AAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA  
CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAG  
AAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAG  
GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUC  
AUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAU  
CACAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAG  
AAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGC  
UGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAG  
AGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUU  
CCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACU  
ACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG  
UCGUCGGAACAGCACUGAUC AAGAAGUACCCG  
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA  
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA  
AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA  
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUU  
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG  
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAAC  
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG  
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA  
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA  
GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG  
CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA  
UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG  
UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUAC  
AGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGG  
AAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAAC  
UGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC  
UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGC  
AAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGA  
UCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAAC  
UGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC  
GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGC  
ACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCU

		<p>GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCC  CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC  GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUC  GAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAU  CCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAG  CGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAG  AGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUUGUUCAC  ACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA  GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAU  ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACAC  UGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAA  ACAAGAAUCGAUCUGAGCCAGCUGGGAGGAGA  CAGCGGAGGAAGCACAAACCUGAGCGACAUCA  UCGAAAAGGAAACAGGAAAGCAGCUGGUCAUC  CAGGAAAGCAUCCUGAUGCUGCCGGAAGAAGU  CGAAGAAGUCAUCGGAAACAAGCCGGAAAGCG  ACAUCCUGGUCCACACAGCAUACGACGAAAGCA  CAGACGAAAACGUCAUGCUGCUGACAAGCGAC  GCACCGGAAUACAAGCCGUGGGCACUGGUCAUC  CAGGACAGCAACGGAGAAAACAAGAUCAAGAU  GCUGAGCGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAA  AGGUCUAA</p>
Открытая рамка считывания для UGI	819	<p>AUGGGACCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGGAGG  AGGAAGCACAAACCUGUCGGACAUCAUCGAAA  AGGAAACAGGAAAGCAGCUGGUCAUCCAGGAA  UCGAUCCUGAUGCUGCCGGAAGAAGUCGAAGA  AGUCAUCGGAAACAAGCCGGAUUCGGACAUCC  UGGUCCACACAGCAUACGACGAAUCGACAGACG  AAAACGUCAUGCUGCUGACAUCGGACGCACCGG  AAUACAAGCCGUGGGCACUGGUCAUCCAGGAC  UCGAACGGAGAAAACAAGAUCAAGAUGCUGUG  A</p>
	820-899, 903-	Не применяется

	971	
mPHK, BC22n	кодирующая 972	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUGGCC GGAUCUGCCACCAUGGAGGCCUCCCCGCCUCC GGCCCCCGGCACCUGAUGGACCCCAUCAUCUUC ACCUCCAACUUCAACAACGGCAUCGGCCGGCAC AAGACCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCGGCU GGACAACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCA CCGGGGCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCU GCUGUGCGGCUUCUACGGCCGGCACGCCGAGCU GCGGUUCCUGGACCUGGUGCCCUCCUGCAGCU GGACCCCGCCAGAUCUACCGGGUGACCUGGUU CAUCUCCUGGUCCCCUGCUUCUCCUGGGGCUG CGCCGGCGAGGUGCGGGCCUCCUGCAGGAGAA CACCCACGUGCGGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCG GAUCUACGACUACGACCCCCUGUACAAGGAGGC CCUGCAGAUGCUGCGGGACGCCGGCGCCCAGGU GUCCAUCAUGACCUACGACGAGUUCAAGCACUG CUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCC CUUCCAGCCCUGGGACGGCCUGGACGAGCACUC CCAGGCCUUGUCCGGCCGGCUGCGGGCCAUCCU GCAGAACCAGGGCAACUCCGGCUCGAGACCCC CGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCGA CAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCCAUCGGCAC CAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGA GUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGC UGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGA ACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCG AGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCG CCCGGCCGGCGGUACACCCGGCUGAAGAACCUGA UCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGA UGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUCCACCGGC UGGAGGAGUCCUCCUGGUGGAGGAGGACAAG AAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUC GUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCC ACCAUCUACCACCGUGCGGAAGAAGCUGGUGGAC

UCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUAC  
CUGGCCCUUGGCCACAUGAUCAAGUUCGGGGC  
CACUUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGAC  
AACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG  
GUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAA  
CCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGC  
CAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGC  
GCUGGAGAACCUGAUCGCCAGCUGCCCGGCGA  
GAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCG  
CCCUGUCCUGGGCCUGACCCCAACUUCAAGU  
CCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGC  
AGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGG  
ACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACG  
CCGACCUGUUCUGGCCGCAAGAACCUGUCCG  
ACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGA  
ACACCGAGAUACCAAGGCCCCCUUGUCCGCCU  
CCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGG  
ACCUGACCCUGCUGAAGGCCUGGUGCGGCAGC  
AGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUC  
GACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUC  
GACGGCGGGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAG  
UUCAUCAAGCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGG  
CACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGG  
AGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACA  
ACGGCUCCAUCCCCACCAGAUCCACCUGGGCG  
AGCUGCACGCCAUCCUGCGGGCGCAGGAGGACU  
UCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGA  
UCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCUACU  
ACGUGGGCCCCUGGCCCGGGCAACUCCCGGU  
UCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCA  
UCACCCCUUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGAC  
AAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUCAUCGAGCGG  
AUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAG  
AAGGUGCUGCCAAGCACUCCUGCUGUACGAG  
UACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGU

GAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCG  
CCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCG  
UGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUG  
ACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUCAA  
GAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCU  
CCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCUCCCUGG  
GCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGG  
ACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAACGAG  
GACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACC  
CUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCG  
GCUGAAGACCUACGCCACCUGUUCGACGACAA  
GGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGGCGGGUACA  
CCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCA  
ACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCA  
UCCUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCA  
ACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACU  
CCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCC  
AGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCUGCACGAGC  
ACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCGCCAUCA  
AGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUG  
GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACA  
GCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGG  
AGAACCAGACCACCAGAAGGGCCAGAAGAACU  
CCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGC  
AUCAAGGAGCUGGGCUCACAGAUCUGAAGGA  
GCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGA  
GAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCG  
GGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCA  
ACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCG  
UGCCCCAGUCCUUCUGAAGGACGACUCCAUCG  
ACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACC  
GGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCGAGGAGG  
UGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAG  
CUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAG  
UUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGC

CUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAG  
CGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAG  
CACGUGGCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAAC  
ACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCG  
GGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGC  
UGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUC  
UACAAGGUGCGGGAGAUAACAACUACCACCAC  
GCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGC  
ACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAG  
UCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUA  
CGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGC  
AGGAGAUCCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCU  
UCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCG  
AGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGC  
GGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCG  
AGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCC  
ACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUG  
AACAU CGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGG  
CGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCG  
GAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGG  
ACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACU  
CCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGG  
CCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUG  
AAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAU  
CAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAU  
CGACUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGG  
UGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAG  
UACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAA  
GCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAA  
GGGCAACGAGCUGGCCUCCUCCUCCAAGUACGU  
GAACUCCUGUACCUGGCCUCCACUACGAGAA  
GCUGAAGGGCUCCCCGAGGACAACGAGCAGAA  
GCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAAGCACUACCU  
GGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCU  
CCAAGCGGGUGAUCUCCUGGCCGACGCCAACCUGG

		<p>ACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGG  ACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCA  UCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCC  CCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCG  ACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGC  UGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCG  GCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGC  UGGGCGGCGACGGCGGGCUCUCCCCAAGAAGA  AGCGGAAGGUGUGACUAGCACCAGCCUCAAGA  ACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUA  CCAACUUACACUUUACAAAUGUUGUCCCCCAA  AAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAA  AGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAA  AAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAA  AAAAGGUAAAAAAAAAAAAAUAAAAAAAAAAAA  ACAUAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAC  GUAAAAAAAAAAAAACUAAAAAAAAAAAAAGAU  AAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAA  AAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAACGCAAAA  AAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAA  AAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAA  AAAACGAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAA  AGACAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAG  UUAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUU  AAAAAAAAAAAAAUCUAG</p>
<p>mPHK, кодирующая  BC22n с меткой HiBit</p>	<p>973</p>	<p>GGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCC  GGAUCUGCCACCAUGGAGGCCUCCCCCGCCUCC  GGCCCCCGGCACCUGAUGGACCCCCACAUCUUC  ACCUCCAACUUCAACAACGGCAUCGGCCGGCAC  AAGACCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCGGCU  GGACAACGGCACCUCGUGAAGAUGGACCAGCA  CCGGGGCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCU  GCUGUGCGGCUUCUACGGCCGGCACGCCGAGCU  GCGGUUCCUGGACCUGGUGCCCUCUCCUGCAGCU  GGACCCCGCCAGAUCUACCGGGUGACCUGGUU</p>

CAUCUCCUGGUCCCCUGCUUCUCCUGGGGCUG  
CGCCGGCGAGGUGCGGGCCUCCUGCAGGAGAA  
CACCCACGUGCGGCUGCGGAUCUUCGCCGCCG  
GAUCUACGACUACGACCCCCUGUACAAGGAGGC  
CCUGCAGAUGCUGCGGGACGCCGGCGCCCAGGU  
GUCCAUCAUGACCUACGACGAGUUCAAGCACUG  
CUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCC  
CUUCCAGCCCUGGGACGGCCUGGACGAGCACUC  
CCAGGCCCUGUCCGGCCGGCUGCGGGCCAUCCU  
GCAGAACCAGGGCAACUCCGGCUCCGAGACCCC  
CGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGA  
CAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCCAUCCGGCAC  
CAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGA  
GUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGC  
UGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGA  
ACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCG  
AGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCG  
CCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGA  
UCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGA  
UGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUCCACCGGC  
UGGAGGAGUCCUCCUGGUGGAGGAGGACAAG  
AAGCACGAGCGGCACCCAUCUUCGGCAACAUC  
GUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCC  
ACCAUCUACCACCUCCUGCGGAAGAAGCUGGUGGAC  
UCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUAC  
CUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUCGGGGC  
CACUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGAC  
AACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG  
GUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAA  
CCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGC  
CAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCG  
GCUGGAGAACCUGAUCGCCAGCUGCCCGGCGA  
GAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCG  
CCCUGUCCUGGGCCUGACCCCAACUUCAAGU  
CCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGC

AGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGG  
ACAACCUGCUGGGCCAGAUCCGGCGACCAGUACG  
CCGACCUGUUCUGGGCCGCAAGAACCUGUCCG  
ACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGA  
ACACCGAGAUACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCU  
CCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGG  
ACCUGACCCUGCUGAAGGCCCCUGGUGCGGCAGC  
AGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUC  
GACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUC  
GACGGCGGGGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAG  
UUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGG  
CACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGG  
AGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACA  
ACGGCUCCAUCCCCACCAGAUCACCUGGGCG  
AGCUGCACGCCAUCCUGCGGGCGGCAGGAGGACU  
UCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGA  
UCGAGAAGAUCUGACCUUCCGGAUCCCUACU  
ACGUGGGCCCCUGGCCCGGGCAACUCCCGGU  
UCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCA  
UCACCCCUUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGAC  
AAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUCAUCGAGCGG  
AUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAG  
AAGGUGCUGCCCAAGCACUCCUGCUGUACGAG  
UACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGU  
GAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCG  
CCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCG  
UGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUG  
ACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUCAA  
GAAGAUCGAGUGCUCGACUCCGUGGAGAUCU  
CCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCUCCUGG  
GCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGG  
ACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAACGAG  
GACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACC  
CUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCG  
GCUGAAGACCUACGCCACCUGUUCGACGACAA

GGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGGCGGGCGGUACA  
CCGGCUGGGGCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCA  
ACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCA  
UCCUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCA  
ACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACU  
CCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCC  
AGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCUGCAGCAGC  
ACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCGCCAUCA  
AGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUG  
GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAA  
GCCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGG  
AGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACU  
CCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGC  
AUCAAGGAGCUGGGCUCCAGAUCUGAAGGA  
GCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGA  
GAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCG  
GGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCA  
ACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCG  
UGCCCCAGUCCUUCUGAAGGACGACUCCAUCG  
ACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACC  
GGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCGAGGAGG  
UGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAG  
CUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAG  
UUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGC  
CUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAG  
CGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAG  
CACGUGGCCCAGAUCUGGACUCCCGGAUGAAC  
ACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCG  
GGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGC  
UGGUGUCCGACUUCGGAAGGACUUCAGUUC  
UACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCAC  
GCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGC  
ACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAG  
UCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUA  
CGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGC

AGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCU  
UCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCG  
AGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGC  
GGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCG  
AGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCC  
ACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUG  
AACAU CGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGG  
CGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCG  
GAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCCGGAAGAAGG  
ACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACU  
CCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGG  
CCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUG  
AAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAU  
CAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAU  
CGACUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGG  
UGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAG  
UACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAA  
GCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAA  
GGGCAACGAGCUGGCCUCCUCCAAGUACGU  
GAACUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAA  
GCUGAAGGGCUCCCCGAGGACAACGAGCAGAA  
GCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAAGCACUACCU  
GGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCCCGAGUUCU  
CCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGG  
ACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGG  
ACAAGCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCA  
UCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCC  
CCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCG  
ACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGC  
UGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCG  
GCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGC  
UGGGCGGCGACGGCGGGCUCUCCCCAAGAAGA  
AGCGGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGU  
CCGUGUCCGGCUGGGCGGCUGUUCAAGAAGAUC  
UCCUGACUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAA

		<p>           UGGAGUCUCUAAGCUACAUAUACCAACUAC            ACUUUACAAAUGUUGUCCCCAAAUGUAGC            CAUUCGUAUCUGCUCUAAUAAAAAGAAAGUU            UCUUCACAUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAUG            GAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUA            AAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAA            AAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAA            AAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAA            AAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAA            AAGGGAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAA            CACAAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAAUC            GAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAA            AAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAA            AAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAA            AAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAA            AAAAUCUAG         </p>
	974	Не применяется
<p>           мРНК,            UGI         </p>	975	<p>           GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCUCCCGCAGUCGG            CGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUGU            CGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGG            GACCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGGAGGAGGA            AGCACAACCUGUCGGACAUCAUCGAAAAGGA            AACAGGAAAGCAGCUGGUCAUCCAGGAAUCGA            UCCUGAUGCUGCCGGAAGAAGUCGAAGAAGUC            AUCGGAAACAAGCCGGAUUCGGACAUCCUGGU            CCACACAGCAUACGACGAAUCGACAGACGAAAA            CGUCAUGCUGCUGACAUCGGACGCACCGGAAUA            CAAGCCGUGGGCACUGGUCAUCCAGGACUCGAA            CGGAGAAAACAAGAUCAAGAUGCUGUGAUAGU            CUAGACAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUAC            CAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAA            UAGCUUAUUCAUUCUUUUUCUUUUUCGUUGG            UGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUA            AUUUCUUUAAUCAUUUUGCCUCUUUUCUCUGU            GCUUCAAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUCG         </p>

		AGUCUAG
	976-999	Не применяется
Лентивирусный геном, кодирующий HLA-E, экспрессируемый промотором EF1a	1000	<p>gcgatcgcagtaatcaattacggggtcattagtcatagcccatafatggagtcc  gcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgaccccc  gcccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaataggactttc  cattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagtacatca  agtgtatcatatgccaagtacccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccc  gcctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatc  tacgtattagtcacgctattaccatgGTGATGCGGTTTTGGCAG  TACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAC  GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA  TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGAC  TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGA  CGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG  TCTATATAAGCAGAGCTcgtttagtgaaccgggtctctctggtta  gaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccactgcttaag  cctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgact  ctggttaactagatccctcagacccttttagtcagtgtgaaaatctctagcagt  ggcggccgaacagggacctgaaagcgaagggaaccagagctctctcgac  gcaggactcggcttgtgaagcgcgcacggcaagaggcgagggcgggcgac  tggtagtacgccccaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggt  gagagagcgtcagtaataagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaatt  cggttaaggccagggggaagaaaaatataaattaaaacatagatgggca  agcaggagctagaacgattcgcagtaatcctggcctgttagaaacatcagaa  ggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaa  gaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggata  gagataaaagacaccaaggaagcttagacaagatagaggaagagcaaaaca  aaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggag  gagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaaagtagtaaaaatt  gaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagag  aaaaagagcagtgggaataggagctttgtccttgggttcttgggagcagcag  gaagcactatgggcgacgctcaatgacgctgacggtacaggccagacaattat  tgtctggtatagtgcagcagcagaacaattgctgagggtctattgaggcgcaaca  gcatctgttgaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcct</p>

	<p> ggctgtgaaagatacctaaggatcaacagctcctggggattgggggtgctct  ggaaaactcattgcaccactgctgtgccttgggaatgctagtggagtaataaatct  ctggaacagatttggaaacacacgacctggatggagtgaggacagagaaattaac  aattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaa  agaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagttgtggaattggttta  acataacaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttgg  aggttaagaatagttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatatt  caccattatcgttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggccc  gaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgat  tagtgaacggatcgcacggatcgggtaactttaaaagaaaaggggggattgg  ggggtacagtcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaa  ctaaagaattacaaaaacaattacaaaaattcaaaattttggctcccgatcgtgc  gttacacacacaattactgctgatcagtgtagcctcccacagtccccgagaagt  tggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcgggggt  aaactgggaaagtgatgctgtactggctccgcttttcccagggtggggga  gaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgaacgggttggc  gccagaacacaggttaagtccgtgtgtggtcccgcgggctggcctctttacg  ggttatggcccttgcgtgccttgaattactccacgccctggctgcagtacgtgat  tcttgatcccagcttcgggttgaagtgggtgggagagttcagggccttgcgct  taaggagccccttcgctcgtgcttgagttgaggcctggcttgggcgctggggc  cgccgctgcgaatctggtggcaccttcgcgctgtctcgtgctttcgataagtc  tctagccattaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagct  tgtaaatcggggccaagatgtgcacactggtatttcggttttggggccgcgggc  ggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgtcggcgaggcggggcctg  cgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagctcaagctggccggcctg  ctctggtgcctggcctcgcgccgctgtatcggccgcttggcgggcaagg  ctggcccggcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccc  tgctgcaggagctcaaatggaggacgcggcgctcgggagagcggggcggg  tgagtcaccacacaaaaggaaaaggcctttccgtcctcagccgtcgttcatgt  gactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcagactttt  ggagtacgtcgttttaggttggggggaggggtttatgcgatggagttccccac  actgagtggggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattcctt  ggaatttgcctttttagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggctc  aaagttttttCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAAttagacgccacc  ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGC </p>
--	---

TACTCTCTCTTTCTGGCCTAGAGGCTGTTATGGCT  
CCGCGGACTTTAATTTTAGGTGGTGGCGGATCCG  
GTGGAGGCGGTTCTGGTGGAGGCGGCTCCATCCA  
GCGTACGCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCAT  
CCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTTCTGAATT  
GCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGA  
AGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGA  
AAAAGTGGAGCATTTCAGACTTGTCTTTCAGCAAG  
GACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATT  
CACCCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGT  
GTGAACCATGTGACTTTGTACAGCCCAAGATAG  
TTAAGTGGGATCGCGACATGGGTGGTGGCGGTTT  
TGGTGGTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGGAAGCGG  
TGGTGGCGGTTCCGGATCTCACTCCTTGAAGTAT  
TTCCACACTTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGG  
AGCCCCGCTTCATCTCTGTGGGCTACGTGGACGA  
CACCCAGTTCGTGCGCTTCGACAACGACGCCGCG  
AGTCCGAGGATGGTGCCGCGGGCGCCGTGGATG  
GAGCAGGAGGGGTCAGAGTATTGGGACCGGGAG  
ACACGGAGCGCCAGGGACACCGCACAGATTTTC  
CGAGTGAACCTGCGGACGCTGCGCGGCTACTAC  
AATCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACACCCTGCAG  
TGGATGCATGGCTGCGAGCTGGGGCCCGACAGG  
CGCTTCCTCCGCGGGTATGAACAGTTCGCCTACG  
ACGGCAAGGATTATCTCACCTGAATGAGGACCT  
GCGCTCCTGGACCGCGGTGGACACGGCGGCTCA  
GATCTCCGAGCAAAGTCAAATGATGCCTCTGAG  
GCGGAGCACCAGAGAGCCTACCTGGAAGACACA  
TGCGTGGAGTGGCTCCACAAATACCTGGAGAAG  
GGGAAGGAGACGCTGCTTCACCTGGAGCCCCCA  
AAGACACACGTGACTCACCAACCCATCTCTGACC  
ATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCTCTGGGCTT  
CTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCA  
GGATGGGGAGGGCCATACCCAGGACACGGAGCT  
CGTGGAGACCAGGCCTGCTGGGGATGGAACCTT

	<p> CCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGA  GAGGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCAT  GAGGGGCTACCCGAGCCCGTCACCCTGAGATGG  AAGCCGGCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGG  GCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGATCTGTG  GTCTCTGGAGCTGTGGTTGCTGCTGTGATATGGA  GGAAGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCT  ACTATAAGGCTGAGTGGAGCGACAGTGCCCAGG  GGTCTGAGTCTCACAGCTTGTAaagtagaagttgtctctc  ctgcactgactgactgatacaatcgatttctggatccgcaggcctctgctagaagt  tgtctctctctgcactgactgactgatacaatcgatttctggatccgcaggcctctg  ctagcttgactgactgagtcgacAATCAACCTCTGGATTACAA  AATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTAT  GTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTT  AATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGG  CTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTG  CTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCA  GGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGA  CGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACC  TGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTCCCCCT  CCCTATTGCCACGGCGGAATCATCGCCGCCTGC  CTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGG  GCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCT  GACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCC  ACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACG  TCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTC  CCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCG  CGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCT  CCCTTTGGGCcgcctccccgcctggaattcgagctcggtaaccttaaga  ccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggg  gactggaagggtcaattcactccaacgaagacaagatctgcttttctgtgact  gggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggtaactagggg  accactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtgtgtgccc  gtctgtgtgtgactctggaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgga  aaatcttagcagctctggccaacgtgagcaccgtgctgacctcaaatatcgta </p>
--	---

	<p>agctggagcctgggagccggcctggccctccgccccccacccccgcagcc caccctggtctttgaataaagtctgagtgagtgccgacagtccccgtggagtt ctcgtgacctgaggtgcagggccggcgtagggacacgtccgtgcacgtgcc gaggccccctgtgcagctgaagggacaggcctagccctgcaggcctaactcc gcccattcccgccctaactccgccagttccgccattctccgcctcatggctga ctaattttttatftatgcagaggccgaggccgctcggcctctgagctattccaga agtagtgaggacgctttttggaggccgaggctttgcaaagatcgaacaagaga caggacctgcaggtaattaataatftaatcatgtgagcaaaaggccagcaaaagg ccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcctggcgttttccataggctccgcccc ctgacgagcatcaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaccgcaca ggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgt tccgacctgccgcttaccggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtgg cgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctcca agctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgccttatccg gtaactatcgtctgagccaacccggtaagacacgacttatccactggcagc agccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtctacagagtt cttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggatctgcg ctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaa caaacaccgctggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcag aaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagt ggaacgaaaactcacgtaagggttttggatcatgagattacaaaaaggatcttc acctagatccttttaaaatfaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagta aacttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctg tctatttcgttcatccatagttgcatftaaatggccggcctggcgcgccgttfaacc tagatattgatagctgatcggtaacgtataatcagtcctagctttgcaaacatc tatcaagagacaggatcagcaggaggctttcgcatgagattcaacattccgctgt cgcccttattccctttttgcccattttgccttctctgttttctcaccagaaacgct ggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcgcgagtggttacatcga actggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgctttc caatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcgggtattatcccgtattgacg ccgggcaagagcaactcggtcgccgatacactattctcagaatgacttgggtga gtattcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaatta tgcagtctgccataacctgagtgataaacctgggccaacttacttctgacaac gattggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgta actcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgag</p>
--	--

		<p>           cgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacctgcgtaactattaactg            gcgaactacttactctagcttcccggcaacagttgatagactggatggaggcggg            taaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggttattgctg            ataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggatcattgcagcactggggc            cagatggtaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaa            ctatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagca            ttggaaccgattctaggtgcattggcgcagaaaaaatgcctgatgcgacgctg            cgcgtcttatactcccacatatgccagattcagcaacggatacggcttcccac            tgcceactccatacgtgtcctcctaccagaaattatccttaagatcccgaatcgt            ttaaac         </p>
<p>           Вставка TCR HD1,            включая ITR         </p>	<p>1001</p>	<p>           ttggccactccctctctgcgcgctcgtcgcctcactgaggccgggagccaaag            gtcgcccagcggcggccttggccggcggcctcagtgagcggcggcggcggc            gcagagaggagtgccaactccatcactaggggttctagatcttgccaacat            accataaacctcccattctgctaagcccagcctaagttggggagaccactccag            attccaagatgtacagtttcttggcggccttttcccatgctgccttactctgc            cagagttatattgctggggtttgaagaagatcctattaataaaagaataagcagt            attattaagtagccctgcattcaggttccctgagtgccaggccaggcctggccg            tgaacgttcaactgaaatcatggcctcttggccaagattgatagcttgtgcctgtccc            tgagtcccagtcacacgagcagctggttctaagatgctattcccgtataaagc            atgagaccgtgacttgcagccccacagagccccgccctgtccatcactggca            tctggactccagcctgggttggggcaaagagggaatgagatcatgtcctaacc            ctgatcctctgtcccacagatatccagaacctgacctgcggctccgggtgcc            gtcagtgggcagagcgcacatcggccacagtcggcggagaagttggggggagg            ggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgggggtaactgggaa            agtgatgtcgtgactggctccgccttttcccagggtgggggagaaccgtatat            aagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggttggccagaaca            caggtaagtgccgtgtgtggttcccggcggcctggcctctttacgggttatggcc            cttgcgtgccttgaattactccacggccctggctgcagtagctgattcttgatccc            gagcttcgggttgaagtgggtgggagagttcaggccttgcgcttaaggagcc            ccttcgctcgtgctttagttgaggcctggcttggcgctggggccgccgctg            cgaatcgttgacacctcgcgctgtctcgtcttgcgataagtctctagccattt            aaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagcttgaatgcg            ggccaagatgtgcacactggatttctgggtttggggccggggcggcgacggg            gcccgtgcgccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcggcggc            caccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgct         </p>

	<p>ggcctcgcgccgccgtglatcgcgcccgccctgggcggcaaggctggcccgt cggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcaggg agctcaaatggaggacgcggcgtcgggagagcggcggggtgagtcacc acacaaaggaaaaggccttccgtcctcagccgtcgttcatgtgactccacgg agtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcagacttttgagtagctc gtctttaggtggggggagggggtttatgcgatggagtftccccacactgagtggg tggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttgaatttgc ttttgagtttgatcttggtcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttct tccatttcaggtgctgtagcggccgccaccatgggatcttggacactgtgttgc gtgtccctgtcatcctggtggccaagcacacagatgccggcgtgatccagtctc ctagacacgaagtgaccgagatgggccaagaagtgaccctgcgctgcaagcct atcagcggccacgattacctgttctggtacagacagaccatgatgagaggcctg gaactgctgatctacttcaacaacaacgtgccatcgacgacagcggcatgcc gaggatagattcagcgccaagatgcccaacgccagcttcagcacctgaagat ccagcctagcagcccagagatagcggcgtgtacttctgcgccagcagaaaga caggcggctacagcaatcagccccagcaactttggagatggcacccggctgagc atcctggaagatctgaagaacgtgttcccacctgaggtggccgtgttcgagcctt ctgaggccgagatcagccacacagaaagccacactcgtgtgttggccacc ggcttctatcccgatcagtggaactgtcttgggtgggtcaacggcaagaggtgc acagcggcgtcagcaccgatcctcagcctctgaaagagcagcccgtctgaac gacagcagatactgcctgagcagcagactgagagtgtccgccaccttctggca gaacccagaaaccacttcagatgccaggtgcagttctacggcctgagcgaga acgatgagtggaaccaggatagagccaagcctgtgacacagatcgtgtctgcc gaagcctggggcagagccgattgtggctttaccagcagagctaccagcaggg cgtgctgtctgccacaatcctgtacgagatcctgctgggcaaagccactctgtac gccgtgctggtgtctgccctggtgctgatggccatggtcaagcgggaaggatagc agggcggcctccggtgccacaaacttctccctgctcaagcagggccggagatgt ggaagagaaccctggccctatggaaccctgctgaaggtgctgagcggcacac tgctgtggcagctgacatgggtccgatctcagcagcctgtgagctcctcagc cgtgattctgagagaaggcaggacgccgtgatcaactgcagcagctctaagg ccctgtacagcgtgactggtacagacagaagcagggcgaggccccctgtgttc ctgatgatcctgctgaaaggcggcgagcagaagggccacgagaagatcagcg ccagctcaacgagaagaagcagcagctccagcctgtacctgacagccagccag ctgagctacagcggcacctacttttggcaccgacctggatcaacgactacaagc tgtcttccggagccggcaccacagtgcagtgccggccaatattcagaaccccg</p>
--	--

		<p>atcctgccgtgtaccagctgagagacagcaagagcagcgacaagagcgtgtgc  ctgttcaccgacttcgacagccagaccaacgtgtcccagagcaaggacagcga  cgtgtacatcaccgataagactgtgctggacatcgggagcatggacttcaagag  caacagcgcctggcctggccaacaagagcgatttcgctgcgccaacgcctt  caacaacagcattatccccgaggacacattcttccaagtctgagagcagctgc  gacgtgaagctggtggaaaagagcttcgagacagacaccaacctgaactcca  gaacctgagcgtgatcggcttcagaatcctgctgctcaaggtggccggcttcaac  ctgctgatgacctgagactgtggtccagctaacctCGACTGTGCCTT  CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCC  GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA  CTGTCCTTTCTTAATAAAAATGAGGAAATTGCATC  GCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG  GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAT  TGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG  GTGGGCTCTATGGcttctgaggcggaaagaaccagctggggctcta  gggggtatccccactagtcgtgtaccagctgagagactctaatccagtgacaa  gtctgtctgctattcaccgattttgattctcaacaatgtgtcacaagtaaggat  tctgatgtgtatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaa  gagcaacagtgctgtggcctggagcaacaatctgactttcatgtgcaaacgc  ctcaacaacagcattatccagaagacaccttctccccagcccaggttaagggc  agctttggtgccttcgaggctgttctctgctcaggaatggccaggtctgccca  gagctctggtcaatgatgtctaaaactcctctgattggtggtctcggccttatccatt  gccacaaaaccctcttttactaagaaacagtgagccttgttctggcagtcagaga  gaatgacacgggaaaaaacgagatgaagagaaggtggcaggagagggcacg  tggcccagcctcagctctagatctaggaaccctagtgatggagttggcactc  cctctctgcgcctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaagcccggggcgt  cgggcgacctttggtcggccgctcagtgagcagcagcgcgcagagagg  gagtggccaa</p>
Направляющий каркас	1002	<p>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUA  GAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUU  AUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGCU</p>
Направляющий каркас	1003	<p>mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAG  AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA  AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCA  CCGAGUCGGmUmGmC*mU</p>

	1004	Не применяется
Последовательность мРНК, кодирующая UGI	1005	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCC GGAUCUGCCACCAUGACCAACCUGUCCGACAUC AUCGAGAAGGAGACCGGCAAGCAGCUGGUGAU CCAGGAGUCCAUCCUGAUGCUGCCCGAGGAGGU GGAGGAGGUGAUCGGCAACAAGCCCGAGUCCG ACAUCCUGGUGCACACCGCCUACGACGAGUCCA CCGACGAGAACGUGAUGCUGCUGACCUCCGACG CCCCGAGUACAAGCCUGGGCCCUGGUGAUCC AGGACUCCAACGGCGAGAACAAGAUCAAGAUG CUGUCCGGCGGCUCCAAGCGGACCGCCGACGGC UCCGAGUUCGAGUCCCCCAAGAAGAAGCGGAA GGUGGAGUGAUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAA CACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUACC AACUUACACUUUACAAAUGUUGUCCCCCAA AUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAA GAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAA AAAAAUGGAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAA AAAGGUAAAAAAAAAAAAAUAAAAAAAAAAAA ACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACG UAAAAAAAAAAAAACUAAAAAAAAAAAAAGUA AAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAA AAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAACGCAAAA AAAAAACACAAAAAAAAAAAAAUGCAAAAA AAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAA AAACGAAAAAAAAAAAAACCAAAAAAAAAAAAA GACAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAGU UAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAUUA AAAAAAAAAAAAAUCUAG
Направляющий каркас, 90-мерный	1006	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGU CGGUGC
Направляющий каркас, 90-мерный, с модификацией	1007	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGA AAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

Направляющий каркас, 90-мерный, с модификацией	1008	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmCm GmAmAmAmGmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmG*mU*mG*mC
Направляющий каркас, 88-мерный, с модификацией	1009	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
Направляющий каркас, 88-мерный	1010	GUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUU AAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCG GUGC
Направляющий каркас, 88-мерный, с модификацией	1011	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAA UGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
Направляющий каркас, 88-мерный, с модификацией	1012	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm AmAmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG *mU*mG*mC
Направляющий каркас	1013	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U
Направляющий каркас	1014	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
Типовая полная последовательность G023523, 91-мерная	1015	GCUGCAGCGCACGGGUACCAGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUU AAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGCU
Типовая модифицированная последовательность G023523, 91-мерная	1016	mG*mC*mU*GCAGCGCACGGGUACCAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCA CCGAGUCGGmUmGmC*mU

\* Направляющая последовательность, описанная в этой Таблице, может быть

немодифицированной, модифицированной по типовому профилю модификации, продемонстрированному в Таблице, или модифицированной по другому профилю модификации, описанному в настоящем документе или доступному в данной области техники.

#### ПРИМЕРЫ

[00381] Следующие примеры представлены для иллюстрации некоторых описанных вариантов осуществления и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем данного изобретения.

Пример 1: Общие способы

1.1. СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ («NGS»; АНГЛ.: NEXT-GENERATION SEQUENCING) И АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЦЕЛЕВОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ.

[00382] Геномную ДНК экстрагировали с применением раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen, кат. № QE09050) в соответствии с протоколом производителя.

[00383] Чтобы количественно определить эффективность редактирования в целевом месте генома, применяли глубокое секвенирование для выявления наличия вставок, делеций и замен, введенных при редактировании генов. Праймеры для PCR конструировали вокруг целевого сайта в пределах представляющего интерес гена (*например*, HLA-A) и амплифицировали представляющую интерес область генома. Схему последовательности праймера выполняли в соответствии со стандартом в данной области техники.

[00384] Дополнительную PCR проводили в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химических компонентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Данные считываний выравнивали в отношении эталонного генома человека (*например*, hg38) после исключения тех, которые имели низкие баллы качества. Считывания, которые перекрывали представляющую интерес целевую область, повторно выравнивали с локальной последовательностью генома для улучшения выравнивания. Затем рассчитывали количество считываний дикого типа по сравнению с количеством считываний, содержащих мутации С-на-Т, мутации С-на-А/Г или инделы. Вставки и делеции оценивали в области 20 bp с центром в предполагаемом сайте расщепления Cas9. Процент инделов определяли как общее количество считываний секвенирования с одним или большим количеством вставленных или удаленных оснований в оцениваемой области 20 bp, деленное на общее количество считываний секвенирования, включая дикий тип. Мутации С-на-Т или С-на-А/Г оценивали в области 40 bp, включая 10 bp выше и 10 bp ниже целевой последовательности sgРНК 20 bp. Процент редактирования С-на-Т определяли как общее количество считываний секвенирования с одной или большим количеством мутаций С-на-Т в области 40 bp, деленное на общее количество считываний секвенирования, включая дикий тип. Аналогичным образом рассчитывают процент мутаций С-на-А/Г.

## 1.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Т-КЛЕТОК.

[00385] Составы сред для культивирования Т-клеток, используемые ниже, описаны в данном документе. «Базовая среда X-VIVO» состоит из среды X-VIVO™ 15, 1% Penstrep, 50 мкМ бета-меркаптоэтанола, 10 мМ НАС. В дополнение к вышеупомянутым компонентам, другими применяемыми изменяемыми компонентами среды были: 1. Сыворотка (фетальная бычья сыворотка (FBS)); и 2. Цитокины (IL-2, IL-7, IL-15).

## 1.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ.

[00386] Липидные компоненты растворяли в 100% этаноле в различных молярных соотношениях. Нагрузку РНК (например, mРНК Cas9 и sgРНК) растворяли в 25 мМ цитратном буфере, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация нагрузки РНК составляла приблизительно 0,45 мг/мл.

[00387] Компоненты композиции липидной нуклеиновой кислоты представляли собой ионизируемый Липид А ((9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(октадека-9,12-диеноат), также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат), холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением gРНК к mРНК 1:1 или 1:2 по массе.

[00388] Липидные наночастицы (композиции LNP) готовили с помощью метода перекрестного потока с ударно-струйным смешиванием липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липиды в этаноле смешивали перекрестным смешиванием с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивали с выходным потоком перекрестного смешивания через Т-образное соединение (см. WO 2016010840, Фиг. 2). Композиции LNP выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре (RT) и дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 об/об). Композиции LNP концентрировали с помощью тангенциальной проточной фильтрации на картридже с плоским листом (Sartorius, 100 кДа MWCO) и заменяли буфер с помощью колонок для обессоливания PD-10 (GE) на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (мас/об) сахарозы, pH 7,5 (TSS). В альтернативном варианте, LNP необязательно концентрировали с помощью центрифужного фильтра Amicon 100 кДа, а буфер заменяли с помощью колонок для обессоливания PD-10 (GE) на TSS. Полученную смесь затем фильтровали с помощью 0,2 мкм стерильного фильтра. Конечную LNP хранили при 4°C или -80°C до дальнейшего применения.

## 1.4. ТРАНСКРИПЦИЯ IN VITRO («IVT») mРНК

[00389] Кэпированную и полиаденилированную mРНК, содержащую N1-метилпсевдо-U, получали путем транскрипции in vitro с применением матрицы линейризованной плазмидной ДНК и РНК-полимеразы T7. Плазмидную ДНК, содержащую промотор T7, последовательность для транскрипции и последовательность

полиаденилирования, линейаризовали путем инкубации при 37°C в течение 2 часов с XbaI при следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 Ед/мкл XbaI (NEB) и 1x реакционный буфер. XbaI инактивировали нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 мин. Линейаризованную плазмиду очищали от фермента и солей буфера. Реакцию IVT для получения модифицированной мРНК проводили путем инкубации при 37°C в течение 1,5-4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линейаризованной плазмиды; 2-5 мМ каждого из GTP, ATP, CTP и N1-метил-псевдо-UTP (Trilink); 10-25 мМ ARCA (Trilink); 5 Ед/мкл РНК-полимеразы Т7 (NEB); 1 Ед/мкл мышинового ингибитора РНКазы (NEB); 0,004 Ед/мкл неорганической пирофосфатазы E. coli (NEB); и 1x реакционный буфер. TURBO ДНКазу (ThermoFisher) добавляли до конечной концентрации 0,01 Ед/мкл и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 минут для удаления матрицы ДНК. мРНК очищали с применением набора для очистки транскрипции MegaClear (ThermoFisher) или набора RNeasy Maxi (Qiagen) в соответствии с протоколами производителей. В альтернативном варианте, мРНК очищали по протоколу преципитации, за которым в некоторых случаях следовала очистка на основе HPLC. Вкратце, после расщепления ДНКазой мРНК очищали с применением преципитации LiCl, преципитации ацетатом аммония и преципитации ацетатом натрия. В случае мРНК, очищенной посредством HPLC, после преципитации и восстановления LiCl, мРНК очищали с помощью RP-IP HPLC (см., например, Kariko, et al. Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21 e142). Фракции, выбранные для объединения, объединяли и обессоливали посредством преципитации ацетатом натрия/этанола, как описано выше. В еще одном альтернативном способе мРНК очищали методом преципитации LiCl с последующей дополнительной очисткой фильтрацией с тангенциальным потоком. Концентрации РНК определяли путем измерения поглощения света при 260 нм (Nanodrop), а транскрипты анализировали с помощью капиллярного электрофореза с помощью Bioanalyzer (Agilent).

[00390] мРНК *Cas9 Streptococcus pyogenes* ("Spy") получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 801-803 (см. последовательности в **Таблице 6**). мРНК BC22n получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 804-805. мРНК UGI получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 807-808. Когда SEQ ID NO: 801-808 упоминаются ниже в отношении РНК, подразумевается, что Т должны быть заменены на U (которые представляли собой N1-метилпсевдоуридины, как описано выше). Мессенджерные РНК, применяемые в Примерах, включают 5'-кэп и 3'-область полиаденилирования, например, до 100 нуклеотидов, и идентифицируются с помощью SEQ ID NO: 801-808 в **Таблице 6**.

Пример 2: Скрининг РНК, разработанных для направления на HLA-A, с помощью Cas9

[00391] Восемьдесят восемь sgРНК, предназначенных для разрушения гена HLA-A, были проскринированы на эффективность в Т-клетках путем оценки потери двух аллельных версий поверхностного белка МНС I, HLA-A2 и HLA-A3. Донор имел HLA-A

фенотип A\*02:01:01G и 03:01:01G. Процент Т-клеток, дважды отрицательных по HLA-A2 и A3 («% A2-/A3-»), определяли с помощью проточной цитометрии после редактирования локуса HLA-A путем электропорации с применением рибонуклеопротеина Cas9 (RNP) и каждого тест-проводника. Как правило, если в контексте не указано иное, направляющие РНК, применяемые в Примерах, обозначенные как «GXXXXXX», относятся к 100-нуклеотидному формату модифицированной sgРНК, если в контексте не указано иное, например, как продемонстрированные в приведенных в настоящем документе Таблицах.

### 2.1. RNP электропорация Т-клеток

[00392] Редактирующую активность Cas9 оценивали с помощью электропорации рибонуклеопротеина Cas9 (RNP). После оттаивания Т-клетки Pan CD3<sup>+</sup> (StemCell, HLA-A\*02.01/A\*03.01) высевали с плотностью  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл в среду RPMI для Т-клеток, состоящую из RPMI 1640 (Invitrogen, кат. № 22400-089), содержащий 5% (v/v) эмбриональной бычьей сыворотки, 1x Glutamax (Gibco, кат. № 35050-061), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ заменимых аминокислот (Invitrogen, кат. № 11140-050), 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ буфера HEPES, 1% пенициллина-стрептомицина и 100 мкМ рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec). Клетки размножали в среде Т-клеток RPMI в течение 72 часов перед трансфекцией RNP.

[00393] sgРНК, нацеленные на HLA-A, удаляли из планшетов для хранения и денатурировали в течение 2 минут при 95°C перед охлаждением при комнатной температуре в течение 10 минут. Смесь RNP готовили из 20 мкМ sgRNA и 10 мкМ белка Cas9-NLS (SEQ ID NO: 800) и инкубировали при 25°C в течение 10 минут. Пять мкл смеси RNP объединяли со 100 000 клеток в 20 мкл буфера для электропорации P3 (Lonza). 22 мкл смеси RNP/клеток переносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета для электропорации Lonza Shuttle. Клетки подвергали электропорации в двух экземплярах с импульсным кодом производителя. Среду Т-клеток RPMI добавляли к клеткам сразу после электропорации. Затем электропорированные Т-клетки культивировали и собирали для секвенирования NGS, как описано в Примере 1, через 2 дня после редактирования.

### 2.2. Проточная цитометрия

[00394] На день 7 после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка HLA-A после редактирования локуса HLA-A. Вкратце, Т-клетки инкубировали в коктейле антител, нацеленных на две аллельные версии поверхностного белка МНС I, соответствующие генотипу донорных клеток HLA-A2 (eBioscience, кат. № 17-9876-42) и HLA-A3 (eBioscience, кат. № 12-5754-42). Затем клетки промывали, обрабатывали с помощью проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки отбирали на основе размера, формы, жизнеспособности и экспрессии HLA-A2 и HLA-A3. В Таблице 7 продемонстрирован средний процент клеток, дважды отрицательных по HLA-A2 и HLA-A3 после редактирования локуса HLA-A.

[00395] Таблица 7 - Средний процент Т-клеток, отрицательных по HLA-A

(дважды отрицательные по HLA-A2 и HLA-A3) после редактирования локуса HLA-A

<b>ID направляющей последовательности</b>	<b>Средний % A2-/A3-</b>	<b>SD % A2-/A3-</b>
G018932	39,30	1,56
G018933	68,45	4,03
G018934	34,40	0,57
G018935	62,25	0,92
G018936	7,62	0,28
G018937	18,85	1,34
G018938	0,05	0,04
G018939	24,30	0,14
G018940	3,99	0,06
G018941	0,02	0,02
G018942	1,97	0,19
G018943	10,80	0,57
G018944	1,78	0,16
G018945	8,85	0,03
G018946	8,08	0,44
G018947	8,53	0,50
G018948	8,57	0,59
G018949	51,95	0,92
G018950	1,80	0,08
G018951	40,25	0,21
G018952	3,40	0,30
G018953	23,35	0,64
G018954	57,50	1,41
G018955	5,65	0,59
G018956	40,45	0,21
G018957	33,65	2,47
G018958	1,52	0,00
G018959	4,69	0,16
G018960	0,13	0,00
G018961	0,88	0,05
G018962	0,78	0,01

G018963	37,50	1,56
G018964	12,75	0,64
G018965	1,26	0,09
G018966	0,28	0,06
G018967	0,31	0,17
G018968	0,34	0,07
G018969	0,52	0,28
G018970	0,55	0,13
G018971	0,36	0,13
G018972	17,15	0,78
G018973	2,04	0,28
G018974	1,26	0,03
G018975	7,52	1,15
G018976	3,75	0,22
G018977	22,45	0,64
G018978	7,79	0,64
G018979	45,80	0,71
G018980	35,70	1,98
G018981	1,74	0,16
G018982	3,31	0,22
G018983	0,03	0,02
G018984	0,78	0,04
G018985	0,01	0,00
G018986	0,01	0,00
G018987	1,55	0,21
G018988	1,72	0,08
G018989	6,92	0,06
G018990	13,70	0,99
G018991	19,35	0,49
G018992	21,70	2,26
G018993	14,40	0,28
G018994	25,35	0,64
G018995	89,70	0,28
G018996	92,35	0,07

G018997	94,90	1,84
G018998	90,50	0,42
G018999	96,40	0,28
G019000	94,95	0,21
G019001	3,36	0,28
G019002	0,02	0,00
G019003	7,32	0,08
G019004	52,70	2,40
G019005	1,33	0,06
G019006	8,18	0,98
G019007	15,05	1,77
G019008	58,65	2,19
G019009	26,95	5,87
G019010	4,69	0,04
G019011	3,88	0,07
G019012	23,75	1,91
G019013	40,40	0,85
G019014	26,55	0,07
G019015	27,40	2,40
G019016	20,20	0,00
G019017	3,53	0,15
G019018	18,60	0,28
G019019	0,91	0,06

Пример 3: Скрининг РНК, разработанных для направления на HLA-A, с помощью BC22n и Cas9

[00396] РНК, разработанные для направления на HLA-A, подвергали скринингу на эффективность в Т-клетках путем оценки потери экспрессии HLA-A на клеточной поверхности. Процент Т-клеток, отрицательных в отношении белка HLA-A, на фоне HLA-A2 («% HLA-A2-») анализировали с помощью проточной цитометрии после редактирования HLA-A посредством доставки мРНК.

### 3.1. Электропорация мРНК Т-клеток

[00397] Активность редактирования Cas9 и BC22n оценивали с помощью электропорации мРНК, кодирующей Cas9 (SEQ ID NO:802), мРНК, кодирующей BC22n (SEQ ID NO:806), или мРНК, кодирующей UGI (SEQ ID NO:807), как указано ниже. После оттаивания Т-клетки Pan CD3+ (StemCell, HLA-A\*02.01/A\*02.01) высевали при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл в TCGM, состоящем из CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM

(Thermofisher, кат. № A3705001). с добавлением 5% сыворотки АВ человека (Gemini, кат. № 100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher, Cat.35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher, кат. № 15630080), 1x пенициллина-стрептомицина, дополнительно дополненного 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech, кат. № 200-02), 10 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 10 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec). Клетки размножали в среде Т-клеток RPMI в течение 72 часов при 37°C перед электропорацией mPHK.

[00398] HLA-A sgPHK удаляли из планшетов для хранения и денатурировали в течение 2 минут при 95°C перед инкубацией при комнатной температуре в течение 5 минут. Смесь для электропорации BC22n готовили из 100000 Т-клеток в буфере Р3 (Lonza), 200 нг mPHK, кодирующей UGI, 200 нг mPHK, кодирующей BC22n, и 20 пмоль sgPHK. Смесь для электропорации Cas9 готовили из 100000 Т-клеток в буфере Р3 (Lonza), 200 нг mPHK, кодирующей UGI, 200 нг mPHK, кодирующей Cas9, и 20 пмоль sgPHK. Каждую смесь переносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета для электропорации Lonza Shuttle. Клетки подвергали электропорации в двух повторениях с применением Lonza Shuttle 96w, применяя импульсный код производителя. Сразу после электропорации клетки восстанавливали в предварительно нагретой TCGM без цитокинов и инкубировали при 37°C в течение 15 минут. Затем электропорированные Т-клетки культивировали в TCGM с дополнительным добавлением 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech, кат. № 200-02), 10 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 10 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15) и собирали для проточной цитометрии через 8 дней после редактирования.

### 3.2. Проточная цитометрия

[00399] На 8-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка HLA-A. Вкратце, Т-клетки инкубировали с антителами, нацеленными на HLA-A2 (eBioscience, кат. № 17-9876-42). Затем клетки промывали, обрабатывали с помощью проточного цитометра Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки отбирали на основе размера, формы, жизнеспособности и экспрессии HLA-A2. В **Таблице 8** продемонстрирован процент клеток, отрицательных в отношении поверхностных белков HLA-A, после геномного редактирования HLA-A с применением BC22n или Cas9.

[00400] **Таблица 8 - Процент клеток, отрицательных в отношении поверхностного белка HLA-A, после геномного редактирования HLA-A с применением BC22n или Cas9.**

Идентификатор Intellia	BC22n		Cas9	
	Средний % A2-	SD % A2-	Средний % A2-	SD % A2-
G018932	20,15	2,76	43,30	1,70
G018933	10,35	1,20	74,00	0,57
G018934	0,50	0,14	15,30	1,56

G018935	0,00	0,00	69,30	0,28
G018936	0,10	0,00	29,65	2,62
G018937	0,15	0,07	50,50	0,71
G018938	0,00	0,00	0,00	0,00
G018939	0,00	0,00	44,90	1,27
G018940	0,00	0,00	12,00	0,42
G018941	0,00	0,00	2,65	0,35
G018942	0,10	0,00	2,15	0,07
G018943	0,00	0,00	16,20	0,42
G018944	0,00	0,00	3,00	0,28
G018945	0,05	0,07	3,20	0,42
G018946	0,00	0,00	2,30	0,14
G018947	0,00	0,00	1,55	0,49
G018949	0,00	0,00	47,10	0,57
G018950	0,00	0,00	0,30	0,00
G018951	0,00	0,00	13,30	0,28
G018952	0,00	0,00	0,50	0,00
G018953	0,00	0,00	3,65	0,64
G018955	0,20	0,14	5,20	0,28
G018958	0,00	0,00	1,30	0,28
G018959	0,00	0,00	3,70	0,14
G018960	0,00	0,00	0,35	0,07
G018961	0,00	0,00	0,40	0,00
G018962	0,00	0,00	2,90	0,42
G018963	0,00	0,00	12,50	0,14
G018964	0,00	0,00	6,45	0,64
G018965	0,00	0,00	0,90	0,00
G018966	0,00	0,00	1,30	0,14
G018968	0,10	0,00	0,10	0,00
G018969	0,00	0,00	0,80	0,14
G018970	0,00	0,00	0,95	0,07
G018971	0,00	0,00	0,10	0,00
G018972	0,05	0,07	3,40	0,28
G018973	0,00	0,00	1,35	0,07

G018974	0,00	0,00	0,45	0,07
G018976	0,05	0,07	2,45	0,07
G018977	0,00	0,00	12,45	1,06
G018978	0,00	0,00	1,75	0,07
G018979	0,05	0,07	37,40	0,71
G018980	0,05	0,07	32,40	2,40
G018981	0,00	0,00	17,45	0,35
G018982	0,00	0,00	26,35	0,92
G018983	0,00	0,00	0,25	0,07
G018984	0,00	0,00	0,65	0,07
G018986	0,00	0,00	1,85	0,21
G018987	0,00	0,00	2,25	0,07
G018988	0,00	0,00	0,15	0,07
G018989	0,00	0,00	1,85	0,07
G018990	0,25	0,07	17,45	1,06
G018991	0,20	0,00	23,15	0,92
G018992	0,20	0,14	38,15	0,07
G018993	0,15	0,07	12,15	1,34
G018994	4,35	0,35	23,75	0,49
G018995	0,55	0,07	94,27	0,30
G018996	0,85	0,07	92,39	0,83
G018997	97,80	0,08	95,03	1,87
G018998	74,75	7,71	93,33	0,18
G018999	98,26	0,30	96,05	2,27
G019000	9,05	0,35	94,67	0,74
G019001	0,05	0,07	4,05	0,64
G019002	0,00	0,00	0,05	0,07
G019003	0,00	0,00	11,10	0,00
G019004	0,00	0,00	30,70	0,00
G019005	0,00	0,00	1,65	0,35
G019006	0,00	0,00	4,75	0,49
G019007	0,00	0,00	5,35	0,78
G019008	0,00	0,00	55,20	3,54
G019009	0,00	0,00	19,55	2,19

G019010	0,05	0,07	5,40	0,14
G019011	0,00	0,00	4,40	0,85
G019012	0,05	0,07	22,90	2,55
G019013	0,00	0,00	30,60	2,40
G019014	0,05	0,07	14,65	0,49
G019015	0,00	0,00	44,70	1,70
G019016	0,00	0,00	13,95	0,35
G019017	0,00	0,00	2,35	0,35
G019018	0,00	0,00	19,90	0,00
G019019	0,00	0,00	3,20	0,14
G021205	0,00	0,00	0,00	0,00
G021206	0,00	0,00	4,10	0,28
G021207	0,00	0,00	2,80	0,28
G021208	84,75	2,05	58,50	0,28
G021209	97,96	0,16	83,35	1,77
G021210	71,45	2,90	75,20	1,70
G021211	0,10	0,00	67,80	1,70

Пример 4: Анализ функционального уничтожения НК-клеток

[00401] Т-клетки, отредактированные в различных комбинациях для разрушения СПТА, HLA-A или В2М или для сверхэкспрессии HLA-E, тестировали на их способность сопротивляться уничтожению, опосредованному клетками-натуральными киллерами (НК).

4.1. Сконструированные Т-клетки и очистка

[00402] После оттаивания Т-клетки Pan CD3+ (StemCell, HLA-A\*02.01/A\*03.01) высевали с плотностью  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл в среду RPMI для Т-клеток, состоящую из RPMI 1640 (Invitrogen, кат. № 22400-089), содержащий 5% (v/v) эмбриональной бычьей сыворотки, 1x GlutaMax (Gibco, кат. № 35050-061), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ заменимых аминокислот (Invitrogen, кат. № 11140-050), 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ буфера HEPES, 1% пенициллина-стрептомицина и 100 мкМ рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec).

[00403] Как описано в **Таблице 9**, через один день после активации Т-клетки редактировали, чтобы разрушить ген В2М. Вкратце, композиции LNP, содержащие мРНК Cas9 и sgРНК G000529 (SEQ ID NO: 245), нацеленные на В2М, были составлены, как описано в **Примере 1**. Композиции LNP инкубировали в среде на основе RPMI с цитокинами, как описано выше, с добавлением 1 мкг/мл рекомбинантного АроЕ3 человека (Peprotech, кат. № 350-02) в течение 15 минут при 37 °С. Смесь LNP добавляли к двум

миллионам активированных Т-клеток, чтобы получить конечную концентрацию 2,5 мкг общего количества LNP/мл.

**[00404] Таблица 9 - Порядок последовательного редактирования и трансдукции вируса**

Условие	День 1	День 2	День 3
Неотредактированные			
B2M <sup>+</sup>	B2M LNP		
B2M <sup>+</sup> + HLA-E	B2M LNP		Лентивирус HLA-E
HLA-A <sup>+</sup> MHC II		СИТА LNP	HLA-A LNP
HLA-A <sup>-</sup>			HLA-A LNP

[00405] Через два дня после активации дополнительные Т-клетки редактировали с применением композиций LNP, чтобы разрушить ген СИТА. Этот процесс выполняли, как описано для редактирования B2M, с применением композиций LNP, содержащих mPНК Cas9 и sgPНК G013675 (SEQ ID NO: 246), нацеленных на СИТА. Композиции LNP, применяемые на этом этапе, были приготовлены с липидом А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату PНК (N:P) около 6 и соотношением gPНК к mPНК 1:2 по массе.

[00406] Через три дня после активации все отредактированные и неотредактированные клетки ресуспендировали в свежей среде без TransAct. Образец B2M-отредактированных Т-клеток трансдуцировали центрифугированием при 1000 g при 37°C в течение 1 часа с применением лентивируса, экспрессирующего HLA-E, с промотора EF1a (SEQ ID NO. 1000) при MOI 10. Образец СИТА-отредактированных Т-клеток дополнительно редактировали композициями LNP, чтобы разрушить ген HLA-A. Редактирование выполняли, как описано выше для редактирования B2M, с применением композиций LNP, содержащих mPНК Cas9 и sgPНК G019000, нацеленных на HLA-A, в состав которых входили липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату PНК (N:P) около 6 и соотношением gPНК к mPНК 1:2 по массе. Через четыре дня после активации все клетки переносили на планшет GREX (Wilson Wolf, кат. № 80240M) для размножения.

[00407] Через семь дней после активации, HLA-E инфицированные Т-клетки отбирали для экспрессии HLA-E с применением биотинилированных антител анти-HLA-E (Biolegend), антибиотинных микрогранул (Miltenyi Biotec, кат. № 130-090-485) и магнитной колонки LS (Miltenyi Biotec, кат. № 130-042-401) в соответствии с протоколами производителя.

[00408] Аналогичным образом, через девять дней после активации СИТА-отредактированные Т-клетки, , были отрицательно отобраны из-за отсутствия экспрессии

МНС II с применением биотинилированного антитела анти-HLA- класса II (Miltenyi, кат. № 130-104-823), антибиотиновых микрогранул (Miltenyi Biotec, кат. № 130-090-485) и магнитной колонки LS (Miltenyi Biotec, кат. № 130-042-401) согласно протоколам производителя.

#### 4.2 Проточная цитометрия

[00409] Оценивали опосредованную НК-клетками цитотоксичность по отношению к сконструированным Т-клеткам. Для этого Т-клетки совместно культивировали с HLA-B/C-совпадающими CTV-мечеными НК-клетками при соотношениях эффектор/мишень (E:T) 10:1, 5:1, 2,5:1, 1,25:1 и 0,625:1 в течение 21 часа. Клетки окрашивали 7AAD (BD Pharmingen, кат. № 559925), обрабатывали на проточном цитометре Cytotflex (Beckman Coulter) и анализировали с применением пакета программного обеспечения FlowJo. Т-клетки отбирали на основании CTV негативности, размера, формы и жизнеспособности. В **Таблице 10** и на **Фиг. 2** продемонстрирован процент лизиса Т-клеток после добавления НК-клеток.

[00410] **Таблица 10 - Процент лизиса Т-клеток после добавления НК-клеток к сконструированным Т-клеткам**

Log(E:T)	Неотредактированные		HLA-A <sup>+</sup>		HLA-A <sup>+</sup> МНС II <sup>+</sup>		B2M <sup>+</sup>		B2M <sup>+</sup> + HLA-E		n
	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD	
Основн.	12,0	1,9	15,5	0,2	8,2	0,4	11,1	0,1	18,1	2,5	2
-0,20	15,1	0,0	16,0	0,5	11,2	0,8	32,6	1,6	25,0	0,9	2
0,10	14,5	0,2	15,6	0,4	10,6	0,1	44,7	2,3	29,4	0,1	2
0,40	12,8	0,6	13,6	0,4	9,3	0,1	66,0	1,8	39,3	0,1	2
0,70	10,4	0,4	11,9	0,2	9,2	0,4	71,2	1,3	51,9	1,6	2
1,00	8,4	0,1	9,4	0,6	7,6	0,1	62,8	0,6	51,7	2,8	2

Пример 5: Кривые доза-ответ LNP для лучших направляющих HLA-A

#### 5.1 Приготовление Т-клеток

[00411] Криоконсервированные отобранные CD8/CD4<sup>+</sup> Т-клетки, выделенные из лейкопака (Nemasare), размораживали и оставляли на ночь при концентрации  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл в среде для роста Т-клеток (TCGM), состоящей из CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM (Thermofisher, кат. № A3705001) с добавлением 5% сыворотки человека AB (Gemini, кат. № 100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher, Cat.35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher, кат. № 15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15).

[00412] Т-клетки активировали с применением T-cell TransAct<sup>TM</sup> (Miltenyi, кат. № 130-111-160) в разведении 1:50 и инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 48 часов. После инкубации клетки подсчитывали на Vi-cell и ресуспендировали в TCGM, как

описано выше, но с 2,5% сывороткой до конечной концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл. Через 24 часа клетки подсчитывали на Vi-cell, ресуспендировали в 5% сыворотке TCGM и переносили в 96-луночный планшет. Тем временем APOE (Peprotech, кат. № 350-02) добавляли в бессывороточный TCGM в конечной концентрации 10 мкг/мл и инкубировали с различными композициями HLA-A LNP (см. **Таблицу 11**) при титрованных концентрациях общей РНК LNP (10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 0,625 мкг/мл, 0,3125 мкг/мл, 0,15625 мкг/мл и 0,078125 мкг/мл) в течение 15 минут. Композиции LNP содержали mРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO:802), и направляющие, как указано в **Таблице 11**, и были составлены с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:39,5:9:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением gРНК к mРНК 1:2 по массе. После инкубации с APOE, к Т-клеткам добавляли суспензию LNP в соотношении 1:1 и инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. Через 24 часа клетки подсчитывали на Vi-cell, делили в соотношении 1:5 и культивировали в течение 96 часов. После инкубации отбирали аликвоту  $0,1-0,5 \times 10^6$  клеток для анализа методом проточной цитометрии.

## 5.2 Проточная цитометрия

[00413] Для проточного цитометрического анализа клетки промывали буфером FACS (PBS+2% FBS+2 mM EDTA) и инкубировали с APC-конъюгированным антителом анти- HLA-A2 человека (Biolegend®, 343308) и PC5.5-конъюгированным антителом против CD3 (Biolegend®, кат. № 317336) в разведении 1:200 в течение 30 минут при 4 °С. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в буфере FACS, подвергали проточной цитометрии, например, с применением Beckman Coulter CytoflexS, и анализировали с применением пакета программного обеспечения FlowJo. **Таблица 12** и **Фиг. 1А-1В** демонстрируют процент редактирования для каждой дозы LNP.

[00414] **Таблица 11 Максимальный процент инделов и EC50 для РНК, разработанных для направления на HLA-A**

sgРНК	Макс	EC50
G018933	90,71	0,3043
G018935	89,04	0,3906
G018954	87,68	0,5089
G018995	98,99	0,1665
G018996	98,61	0,2085
G018997	99,12	0,2196
G018998	98,64	0,2914
G018999	98,74	0,1724
G019000	98,61	0,1945
G019008	75,53	0,3322

sgPHK	Макс	EC50
G013006 TRAC		
G018091 СИТА	1,017	0,8941

[00415] Таблица 12. Процент клеток HLA-A- после редактирования с применением различных направляющих.

sgPHK	Концентрация LNP (мкг общей РНК/мл)	Средний % HLA-A-	SD	n
G018933	5	91,45	0,35	2
G018933	2,5	88,8	1,27	2
G018933	1,25	86,55	0,35	2
G018933	0,63	75	0,14	2
G018933	0,31	47	0,00	2
G018933	0,16	17,55	0,35	2
G018933	0,08	5,115	0,28	2
G018935	5	89,75	1,34	2
G018935	2,5	86,8	0,28	2
G018935	1,25	81,8	0,99	2
G018935	0,63	66,8	4,81	2
G018935	0,31	33,55	4,17	2
G018935	0,16	11,91	2,96	2
G018935	0,08	3,01	1,09	2
G018954	5	86,5	86,4	2
G018954	2,5	86	84	2
G018954	1,25	82	75	2
G018954	0,63	50,5	54,5	2
G018954	0,31	24,8	23	2
G018954	0,16	7,31	6,2	2
G018954	0,08	2,09	1,78	2
G018995	5	98,5	0,3	2
G018995	2,5	98,8	0,1	2
G018995	1,25	98,55	0,35	2
G018995	0,63	96	0	2
G018995	0,31	82,25	1,25	2
G018995	0,16	49,25	0,55	2

G018995	0,08	19	0,3	2
G018996	5	98,25	0,21	2
G018996	2,5	97,75	0,64	2
G018996	1,25	98,2	0,71	2
G018996	0,63	92,75	0,49	2
G018996	0,31	72,7	1,41	2
G018996	0,16	36,8	3,82	2
G018996	0,08	13,5	1,13	2
G018997	5	98,8	0,1	2
G018997	2,5	98,75	0,05	2
G018997	1,25	97,8	0,3	2
G018997	0,63	95,8	1,6	2
G018997	0,31	73,45	0,15	2
G018997	0,16	35,65	0,25	2
G018997	0,08	14,65	0,15	2
G018998	5	98,35	0,15	2
G018998	2,5	97,65	0,15	2
G018998	1,25	97,05	0,45	2
G018998	0,63	89,6	1,4	2
G018998	0,31	55,8	0,4	2
G018998	0,16	22,6	0,8	2
G018998	0,08	8,55	0,09	2
G018999	5	98,45	0,35	2
G018999	2,5	98,5	0,3	2
G018999	1,25	98,05	0,55	2
G018999	0,63	97,1	0,1	2
G018999	0,31	84	0,4	2
G018999	0,16	51,95	0,25	2
G018999	0,08	24,7	0,4	2
G019000	5	97,9	0	2
G019000	2,5	98,5	0,1	2
G019000	1,25	97,2	0,6	2
G019000	0,63	96,05	0,35	2
G019000	0,31	77	0,6	2

G019000	0,16	43,7	1,1	2
G019000	0,08	19,1	0,2	2
G019008	5	73,35	1,20	2
G019008	2,5	77,35	0,78	2
G019008	1,25	71,25	2,19	2
G019008	0,63	60,3	1,84	2
G019008	0,31	35,65	2,19	2
G019008	0,16	11,6	0,71	2
G019008	0,08	3,17	0,41	2
G018091	5	0,99	0,29	2
G018091	2,5	1,00	0,52	2
G018091	1,25	1,12	1,10	2
G018091	0,63	0,64	0,02	2
G018091	0,31	0,44	0,02	2
G018091	0,16	1,22	0,52	2
G018091	0,08	0,35	0,16	2
G013006	5	0,51	0,28	2
G013006	2,5	0,71	0,1	2
G013006	1,25	1,13	0,315	2
G013006	0,63	0,69	0,02	2
G013006	0,31	0,36	0,015	2
G013006	0,16	0,82	0,19	2
G013006	0,08	0,7	0,02	2

Пример 6: Множественное редактирование Т-клеток WT1 с последовательной доставкой LNP

[00416] Т-клетки конструировали с серией генных нарушений и вставок. Клетки от здорового донора обрабатывали последовательно четырьмя композициями LNP, каждую LNP составляли совместно с mPHK, кодирующей Cas9, и sgPHK, нацеленной на TRAC (G013006) (SEQ ID NO: 243), TRBC (G016239) (SEQ ID NO: 247), СИТА. (G013676) (SEQ ID NO: 248) или HLA-A (G018995) (sgPHK, содержащая SEQ ID NO: 13, как продемонстрировано в Таблице 2). Композиции LNP составляли с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату PHK (N:P) около 6 и соотношением gPHK к mPHK 1:2 по массе. Трансгенный Т-клеточный рецептор, нацеленный на антиген опухоли Вильмса (WT1 TCR) (SEQ ID NO: 1001), интегрировали в участок разреза TRAC

путем доставки матрицы гомологически направленной репарации с применением AAV.

#### 6.1. Приготовление Т-клеток

[00417] Т-клетки выделяли из продуктов лейкофереза трех здоровых доноров HLA-A2+ (STEMCELL Technologies). Т-клетки выделяли с применением набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя и криоконсервировали с применением Cryostor CS10 (STEMCELL Technologies, кат. № 07930). За день до начала редактирования Т-клеток клетки размораживали и оставляли на ночь в среде для активации Т-клеток (TCAM): CTS OpTmizer (Thermofisher, кат. № A3705001) с добавлением 2,5% сыворотки человека АВ (Gemini, кат. № 100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher, Cat.35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher, кат. № 15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech, кат. № 200-02), IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15).

#### 6.2. Обработка LNP и размножение Т-клеток

[00418] Композиции LNP готовили каждый день в среде, содержащей ApoE, и доставляли в Т-клетки, как описано в **Таблице 13** и ниже.

#### [00419] Таблица 13 - Порядок редактирования Т-клеточного конструирования

Группа	День 1	День 2	День 3	День 4
<b>1</b>	Неотредактированные	Неотредактированные	Неотредактированные	Неотредактированные
<b>2</b>	TRBC	СПТА	TRAC	HLA-A
<b>3</b>	TRBC	HLA-A	TRAC	СПТА
<b>4</b>	TRBC		TRAC	

[00420] В день 1, композиции LNP, как указано в **Таблице 13**, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, кат. № 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности  $2 \times 10^6$  клеток/мл в TCAM с разведением 1:50 реагента человека Т Cell TransAct (Miltenyi, кат. № 130-111-160). Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы на ночь.

[00421] В день 1 композиции LNP, как указано в **Таблице 13**, инкубировали в концентрации 25 мкг/мл в TCAM, содержащей 20 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, кат. № 350-02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:10.

[00422] В день 3, композиции TRAC-LNP инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 10 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, кат. № 350-02). Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы. Затем к каждой группе добавляли WT1 AAV при показателе MOI  $3 \times 10^5$  копий генома на клетку.

[00423] В день 4, композиции LNP, как указано в **Таблице 13**, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, кат. № 350-

02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:1.

[00424] В дни 5-11, Т-клетки переносили в 24-луночный планшет GREX (Wilson Wolf, кат. № 80192) в среде для размножения Т-клеток (TCЕМ): CTS OpTmizer (Thermofisher, кат. № A3705001) с добавлением 5% CTS Immune Cell Serum Replacement (Thermofisher, кат. № A2596101), 1X GlutaMAX (Thermofisher, кат. № 35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher, кат. № 15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech, кат. № 200-02), IL- 7 (Peprotech, кат. № 200-07) и IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15)). Клетки размножали в соответствии с протоколами производителей. Т-клетки размножали в течение 6 дней с заменой среды через день. Клетки подсчитывали с применением счетчика клеток Vi-CELL (Beckman Coulter) и рассчитывали кратность путем деления выхода клеток на исходный материал, как продемонстрировано в **Таблице 14**.

[00425] **Таблица 14 - Кратность размножения после мультиредактирования Т-клеточного конструирования**

Группа	Донор А	Донор В	Донор С	Среднее	SD
<b>1</b>	331,40	362,24	533,18	408,94	108,69
<b>2</b>	61,82	72,15	116,13	83,37	28,84
<b>3</b>	64,08	76,29	157,75	99,37	50,92
<b>4</b>	Нет данных	146,78	331,67	239,22	130,74

6.3. Количественная оценка редактирования Т-клеток с помощью проточной цитометрии и NGS

[00426] После размножения отредактированные Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии HLA-A2 (HLA-A+), экспрессии HLA-DR-DP-DQ (МНС II+) после нокдауна СРТА, экспрессии WT1-TCR (CD3+ Vb8+) и экспрессии остаточных эндогенных TCR (CD3+ Vb8-) или неправильно спаренных TCR (CD3+ Vb8low). Т-клетки инкубировали с коктейлем антител, нацеленных на следующие молекулы: CD4 (Biolegend, кат. № 300524), CD8 (Biolegend, кат. № 301045), Vb8 (Biolegend, кат. № 348106), CD3 (Biolegend, кат. № 300327), HLA-A2 (Biolegend, кат. № 343306), HLA-DRDPDQ (Biolegend, кат. № 361706), CD62L (Biolegend, кат. № 304844), CD45RO (Biolegend, кат. № 304230). Затем клетки промывали, анализировали на приборе Cytotflex LX (Beckman Coulter) с помощью пакета программ FlowJo. Т-клетки отбирали по размеру и статусу CD4/CD8 до того, как определяли экспрессию маркеров редактирования и вставки. Процент клеток, экспрессирующих соответствующие белки клеточной поверхности после последовательного конструирования Т-клеток, продемонстрирован в **Таблице 15** и на **Фигурах 3А-Г** для CD8+ Т-клеток и в **Таблице 16** и на **Фигурах 4А-Г** для CD4+ Т-клеток. Процент полностью отредактированных CD4+ или CD8+ Т-клеток определяли как % CD3+ Vb8+ HLA-A-МНС II-. В отредактированных образцах наблюдаются высокие уровни нокдауна HLA-A и МНС II, а также вставка WT1-TCR и эндогенный TCR KO. В дополнение к анализу с помощью проточной цитометрии геномную ДНК подготавливали и проводили анализ NGS, как описано в Примере 1, для



Донор	Группа	HLA-A2 <sup>+</sup>	HLA-DR-DP-DQ <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> Vb8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> Vb8 <sup>low</sup>	CD3 <sup>+</sup> Vb8 <sup>-</sup>	CD3 <sup>+</sup> Vb8 <sup>+</sup> HLA-A2 <sup>-</sup> HLA-DR-DP-DQ <sup>-</sup>
<b>A</b>	<b>1</b> Неотредактированные	100,0	36,3	5,4	0,4	94,5	0,0
<b>B</b>		98,7	27,6	5,6	0,4	94,3	0,0
<b>C</b>		99,3	32,3	6,2	0,3	93,6	0,1
<b>A</b>	<b>2</b>	2,6	0,7	62,4	2,4	1,1	60,9
<b>B</b>		1,8	0,5	59,7	2,2	1,0	58,5
<b>C</b>		1,7	3,2	58,6	1,6	1,8	55,8
<b>A</b>	<b>3</b>	1,3	0,8	63,0	3,4	0,8	61,7
<b>B</b>		1,1	1,1	61,8	2,6	0,9	60,6
<b>C</b>		1,1	0,4	60,9	1,7	1,0	59,9
<b>B</b>	<b>4</b>	99,5	25,1	61,9	1,9	5,2	0,1
<b>C</b>		97,9	40,1	69,5	4,7	1,9	0,8

[00429] Таблица 17: Процент инделов в СИТА, HLA-A, TRBC1 и TRBC2 после последовательного редактирования Т-клеток

Группа	СИТА (G013676)			HLA-A (G018995)			TRBC1 (G016239)			TRBC2 (G016239)		
	Донор А	Донор В	Донор С	Донор А	Донор В	Донор С	Донор А	Донор В	Донор С	Донор А	Донор В	Донор С
1	0,2	0,2	0,2	6,9	3,3	2,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
2	98,2	81,8	93,8	94,1	90,2	90,6	97,6	89,9	91,4	98,7	86,8	94,9
3	98,9	98,1	98,9	97,2	86,4	93,1	98,6	94,4	94,7	98,6	94,2	96,6
4	0,1	0,2	0,6	7,6	2,7	3,2	98,9	94	95	98,6	93,2	97,4

Пример 7: Нецелевой анализ последовательностей HLA-A человека

[00430] Был проведен скрининг потенциальных нецелевых геномных сайтов, расщепленных Cas9, нацеленных на HLA-A. (См., например, Cameron et al., Nature Methods. 6, 600-606; 2017). В этом эксперименте 10 sgPHK, нацеленных на HLA-A человека, и три контрольных направляющих, нацеленных на EMX1, VEGFA и RAG1B с известными нецелевыми профилями, подвергали скринингу с применением очищенной геномной ДНК из клеточной линии лимфоцитов NA24385 (Coriell Institute). Количество потенциальных нецелевых сайтов определяли с применением sgPHK, как продемонстрировано в Таблице 18, при концентрации sgPHK 192 нМ и 64 нМ RNP в биохимическом анализе. Анализ выявил потенциальные нецелевые сайты для тестируемых sgPHK.

[00431] Таблица 18. Нецелевой анализ

ID gPHK	Мишень	Направляющая последовательность (SEQ ID NO:)	Количество нецелевых сайтов
G018995	HLA-A	ACAGCGACGCCGCGAGCCAG (SEQ ID NO: 13)	17
G018996	HLA-A	CGACGCCGCGAGCCAGAGGA (SEQ ID NO: 14)	48
G018997	HLA-A	CGAGCCAGAGGAUGGAGCCG (SEQ ID NO: 15)	1299
G018998	HLA-A	CGGCUCCAUCCUCUGGCUCG (SEQ ID NO: 16)	250
G018999	HLA-A	GAGCCAGAGGAUGGAGCCGC (SEQ ID NO: 17)	733
G019000	HLA-A	GCGCCCGCGGCUCCAUCCUC (SEQ ID NO: 18)	386
G018933	HLA-A	GCACGGGUACCAGGGGCCAC (SEQ ID NO: 41)	865
G018935	HLA-A	GGGAGGCGCCCCGUGGCCCC (SEQ ID NO: 43)	258
G019008	HLA-A	GCAAGGGUCUCGGGGUCCCG (SEQ ID NO: 26)	324
G018954	HLA-A	UUGAGAAUGGACAGGACACC (SEQ ID NO: 62)	227
G000644	EMX1	GAGUCCGAGCAGAAGAAGAA (SEQ ID NO: 230)	253
G000645	VEGFA	GACCCCUCCACCCCGCCUC (SEQ ID NO: 231)	3856
G000646	RAG1B	GACUUGUUUCAUUGUUCUC (SEQ ID NO: 232)	62

[00432] В известных анализах обнаружения нецелевых объектов, таких как биохимический метод, примененный выше, обычно восстанавливается большое количество потенциальных нецелевых сайтов по замыслу, чтобы «закинуть широкую сеть» для потенциальных сайтов, которые могут быть валидированы в других контекстах, *например*, в представляющей интерес первичной клетке. Например, биохимический метод обычно завышает количество потенциальных нецелевых сайтов, поскольку в анализе применяется очищенная геномная ДНК с высокой молекулярной массой, свободная от клеточной среды, и он зависит от дозы применяемого RNP Cas9. Соответственно, потенциальные нецелевые сайты, идентифицированные этими методами, могут быть валидированы с помощью целевого секвенирования идентифицированных потенциальных нецелевых сайтов.

Пример 8. HLA-A и СИТА, частично совпадающие в мышинной модели уничтожения In Vivo посредством НК-клеток

[00433] Самкам мышей NOG-hIL-15 прививали  $1,5 \times 10^6$  первичных НК-клеток с последующей инъекцией сконструированных Т-клеток, содержащих люциферазу +/- HLA-A, СИТА или HLA-A/СИТА КО через 4 недели, чтобы определить 1) могут ли привитые НК-клетки легко лизировать контрольные Т-клетки (B2M<sup>-/-</sup>), и 2) обеспечивает ли добавление частично совпадающего редактирования (HLA-A или СИТА) защитный эффект для Т-клеток от лизиса НК-клетками in vivo.

8.1. Приготовление Т-клеток, содержащих люциферазу +/- HLA-A, СИТА или HLA-A/СИТА КО

[00434] Т-клетки выделяли из периферической крови здорового донора-человека со следующим фенотипом МНС I: HLA-A\*02:01:01G, 03:01:01G, HLA-B\*07:02:01G, HLA-C\*07:02:01G. Вкратце, лейкоферезный пакет (Stemcell Technologies) обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов с хлоридом аммония (Stemcell Technologies; кат. № 07800) в течение 15 минут для лизиса эритроцитов. Количество мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) определяли после лизиса, а выделение Т-клеток осуществляли с применением набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stemcell Technologies, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя. Выделенные CD3<sup>+</sup> Т-клетки ресуспендировали в среде Cryostor CS10 (Stemcell Technologies, кат. № 07930) и замораживали в жидком азоте до дальнейшего применения.

[00435] Замороженные Т-клетки размораживали при концентрации клеток  $1 \times 10^6$  клеток/мл в среде для роста Т-клеток (TCGM), состоящей из Optmizer TCGM, как описано в Примере 3, дополнительно дополненной 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Клетки активировали с применением T-cell TransAct<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec, кат. № 130-111-160) в разведении 1:100 при 37°C в течение 24 часов.

[00436] Через 24 часа после активации  $1 \times 10^6$  Т-клеток в 500 мкл свежего TCGM без цитокинов трансдуцировали путем центрифугирования 1000xG в течение 60 минут при 37°C со 150 мкл люциферазы лентивируса (Imanis Life Sciences, кат. № LV050L). Трансдуцированные клетки размножали в 24-луночной планшете G-Rex (Wilson Wolf, кат. № 80192M) в TCGM с цитокинами при 37°C в течение 24 часов.

[00437] Через сорок восемь часов после активации, Т-клетки, инфицированные люциферазой LV редактировали, чтобы разрушить гены B2M или HLA-A. Вкратце, композиции LNP, содержащие mPНК, кодирующую cas9 (SEQ ID NO:802), и sgPНК G019000 (SEQ ID NO:18), нацеленные на HLA-A, составляли с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату PНК (N:P) около 6 и соотношением gPНК к mPНК 1:2 по массе. Композиции LNP, содержащие mPНК Cas9 и sgPНК G000529 (SEQ ID NO: 245), нацеленные на B2M, составляли как описано в Примере 1. Композиции LNP инкубировали в Optmizer TCGM без сыворотки или цитокинов, дополнительно дополненных 1 мкг/мл рекомбинантного AроЕ3 человека (Peprotech, кат. № 350-02) в течение 15 минут при 37 °C. Т-клетки промывали и суспендировали в TCGM с цитокинами. Предварительно инкубированные LNP и Т-клетки смешивали для получения конечных концентраций  $0,5 \times 10^6$  Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей PНК/мл LNP в TCGM с 5% сывороткой АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Дополнительную группу клеток имитировали редактированием со средой, содержащей AроЕ3, но без композиций LNP. Все клетки инкубировали при



			нее		нее		ее		нее		
10	19,22	3,16	28,55	1,02	22,96	3,59	22,22	3,15	68,09	0,11	2
5	13,04	1,71	27,18	4,35	22,85	6,93	13,78	4,55	53,87	3,30	2
2,5	1,56	1,35	26,56	3,75	26,59	2,44	21,32	0,72	39,46	7,05	2
1,25	-0,26	1,94	19,78	3,24	19,91	5,38	12,86	0,54	25,79	7,96	2
0,625	8,67	6,81	25,44	0,23	18,32	4,28	19,80	7,20	29,31	2,67	2
0,312											
5	2,96	7,66	22,40	0,83	19,13	1,34	13,34	2,48	9,32	0,84	2

8.2. Т-клетки с двойным нокаутом HLA-A и СИТА защищены от уничтожения посредством НК-клеток

[00441] Для исследования *in vivo*, НК-клетки, выделенные из лейкопака методами, известными в данной области техники, промывали HBSS (Gibco, кат. № 14025-092) и ресуспендировали в концентрации  $10 \times 10^6$  клеток/мл для инъекции в 150 мкл HBSS. Двадцати двум самкам мышей NOG-hIL-15 (Taconic) путем инъекции в хвостовую вену вводили  $1,5 \times 10^6$  выделенных НК-клеток. Дополнительно 27 самок NOG-hIL-15 служили контролем без инъекций НК.

[00442] Через двадцать восемь дней после инъекции НК-клеток, мышам вводили неотредактированные или сконструированные Т-клетки, как описано в **Таблице 19**. Вкратце, сконструированные Т-клетки вводили через 16 дней после второй активации после промывания в PBS и ресуспендирования в растворе HBSS в концентрации  $6 \times 10^6$  клеток/150 мкл.

[00443] Визуализацию IVIS живых мышей проводили для идентификации люциферазоположительных Т-клеток по спектру IVIS. Визуализацию IVIS проводили через 6 часов, 24 часа, 48 часов, 8 дней, 13 дней, 18 дней и 27 дней после инъекции Т-клеток. Мышей готовили к визуализации с помощью инъекции D-люциферина внутрибрюшинно в дозе 10 мкг/г массы тела в соответствии с рекомендацией производителя, около 150 мкл на животное. Животных анестезировали, а затем помещали в блок визуализации IVIS. Визуализацию выполняли с автоматически установленным временем экспозиции, полем зрения D, средним биннингом и значением F/stop равным 1. **Таблица 20** и **Фиг. 6А** демонстрируют излучение (фотоны/с/см<sup>2</sup>/sr) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различные моменты времени после инъекции. **ФИГ. 6В** демонстрирует излучение (фотоны/с/см<sup>2</sup>/sr) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различных группах мышей через 27 дней. *In vitro*, B2М-отредактированные клетки продемонстрировали чувствительность к уничтожению посредством НК, в то время как HLA-A-отредактированные клетки, СИТА-отредактированные клетки и вдвойне (HLA-A, СИТА) отредактированные клетки продемонстрировали защиту от лизиса, опосредованного НК. Неожиданно было обнаружено, что даже после снижения уровня одного из трех высокополиморфных белков МНС класса I (HLA-A) клетки оказались защищены от НК-опосредованного отторжения.

[00444] Таблица 20 - Излучение (фотоны/с/см<sup>2</sup>/sr) от Т-клеток, экспрессирующих люциферазу, у обработанных мышей с интервалами после инъекции Т-клеток.

Инъекция Т-клеток	Момент времени (дни)	Без инъекции НК-клеток			Инъекция НК-клеток		
		Среднее	SD	n	Среднее	SD	n
Т-клетки отсутствуют	0,25	5065	474	2	6010	651	2
	1	5225	431	2	5150	467	2
	4	4715	403	2	4860	57	2
	6	5145	884	2	5110	226	2
	11	5230	382	2	4700	99	2
	13	6920	948	2	6735	35	2
	18	5055	148	2	5570	28	2
	27	4740	311	2	5185	290	2
Без редактирования	0,25	477200	51237	5	464000	112493	4
	1	547600	59315	5	517500	95710	4
	4	285600	43328	5	219750	77298	4
	6	249400	58748	5	137000	69190	4
	11	131500	28671	5	111150	36287	4
	13	147000	15732	5	43168	52128	4
	18	112100	20768	5	55825	47391	4
	27	53960	13546	5	59700	31479	4
B2M KO	0,25	662600	193865	5	261850	135636	4
	1	555200	122508	5	89400	41151	4
	4	266200	68845	5	25175	11072	4
	6	202600	41825	5	18500	7048	4
	11	106320	14377	5	17100	9440	4
	13	57714	45535	5	7048	2735	4
	18	77080	7792	5	9453	4592	4
	27	55240	12780	5	6860	1207	4
HLA-A KO	0,25	160000	30315	5	111500	30533	4
	1	206800	38493	5	153000	24427	4
	4	120200	23488	5	91025	69091	4
	6	81100	16903	5	91408	106141	4

	11	55520	6843	5	53367	21985	3
	13	30716	23658	5	33233	13615	3
	18	21802	10911	5	35667	5601	3
	27	20600	808	4	46900	4937	3
СИТА КО	0,25	121400	19680	5	116350	82606	4
	1	168200	32760	5	120225	43535	4
	4	93600	23187	5	76450	31056	4
	6	71298	40161	5	52500	35590	4
	11	59100	13805	5	73500	77242	4
	13	43870	22810	5	31760	30831	4
	18	28422	14019	5	35000	7902	3
	27	18780	3505	5	69067	31194	3
HLA-A КО СИТА КО	0,25	259250	59824	4	363000	113731	4
	1	456750	69188	4	481500	142778	4
	4	170500	26665	4	200750	70415	4
	6	108950	11046	4	98633	27450	3
	11	97350	19982	4	93867	32173	3
	13	85708	58720	4	68357	54428	3
	18	20923	22172	4	98633	27450	3
	27	37375	10602	4	31733	2593	3

Пример 9: HLA-A и СИТА, частично совпадающие в мышинной модели уничтожения *in vivo* посредством НК-клеток

[00445] Самкам мышей NOG-hIL-15 прививали  $1,5 \times 10^6$  первичных НК-клеток с последующей инъекцией сконструированных Т-клеток, содержащих люциферазу +/- HLA-A/СИТА КО с TCR HD1, через 4 недели, чтобы определить 1) могут ли привитые НК-клетки легко лизировать контрольные Т-клетки (B2M<sup>-/-</sup>), и 2) обеспечивает ли добавление частично совпадающего редактирования (HLA-A и СИТА) защитный эффект для Т-клеток с экзогенным TCR HD1 от лизиса НК-клетками *in vivo*.

9.1. Приготовление Т-клеток, содержащих люциферазу +/-HLA-A/СИТА КО и HD1 TCR

[00446] Т-клетки выделяли из периферической крови здорового донора-человека со следующим фенотипом МНС I: HLA-A\*02:01:01G, 03:01:01G, HLA-B\*07:02:01G, HLA-C\*07:02:01G. Вкратце, лейкоферезный пакет (Stemcell Technologies) обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов с хлоридом аммония (Stemcell Technologies; кат. № 07800) в течение 15 минут для лизиса эритроцитов. Количество мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) определяли после лизиса, а выделение Т-клеток

осуществляли с применением набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stemcell Technologies, кат. № 17951) согласно протоколу производителя. Выделенные CD3+ Т-клетки ресуспендировали в среде Cryostor CS10 (Stemcell Technologies, кат. № 07930) и замораживали в жидком азоте до дальнейшего применения.

[00447] Замороженные Т-клетки размораживали при концентрации клеток  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл в среде для активации Т-клеток (TCAM), состоящей из OpTmizer TCGM, как описано в **Примере 3**, и дополнительно добавляли 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Клетки выдерживали при 37 °С в течение 24 часов.

[00448] Через 24 часа после размораживания Т-клетки подсчитывали и ресуспендировали в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в среде TCAM и добавляли 1:50 Transact. Клетки перемешивали и инкубировали 20-30 мин при 37 °С. Композиции LNP, содержащие mРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO:802), и sgРНК G013675 (SEQ ID NO: 246), нацеленные на СПТА, составляли с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением gРНК к mРНК 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 5 мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM и дополнительно добавляли 5 мкг/мл рекомбинантного АроЕ3 человека (Peprotech, кат. № 350-02) в течение 15 минут при 37 °С. Предварительно инкубированные композиции LNP и Т-клетки с Transact смешивали для получения конечных концентраций  $1 \times 10^6$  Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей РНК/мл LNP в среде TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Дополнительную группу клеток имитировали редактированием со средой, содержащей АроЕ3, но без композиций LNP. Все клетки инкубировали при 37°С в течение 24 часов.

[00449] Через 48 часов после активации все группы трансдуцировали лентивирусом EF1 $\alpha$ -GFP-Лус. Лентивирус удаляли при температуре -80 °С и проводили размораживание на льду. Клетки собирали по группам и центрифугировали при 500×g в течение 5 минут, чтобы вымыть композиции LNP и среду. Клетки ресуспендировали, индивидуально в соответствии с их группами, в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в среде TCAM. Затем 500 мкл клеточной суспензии переносили в стерильную пробирку Эппендорфа (всего  $1 \times 10^6$  клеток) и добавляли 100 мкл лентивируса. Клетки центрифугировали при 1000×G в течение 60 минут при 37 °С. После центрифугирования клетки объединяли в соответствии с их группами и ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в среде TCAM, содержащей конечную концентрацию 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15) с последующей инкубацией при 37°С в течение 24 часов.

[00450] Через семьдесят два часа после активации трансдуцированные люциферазой Т-клетки обрабатывали композициями LNP для разрушения генов TRAC и дополнительно обрабатывали HD1 AAV для встраивания TCR HD1 в локус TRAC. Клетки собирали по группам и центрифугировали при  $500\times g$  в течение 5 минут, чтобы вымыть лентивирус и среду. Затем клетки ресуспендировали в среде TCAM при концентрации  $1\times 10^6$  клеток/мл в среде TCAM. Композиции LNP, содержащие mPHK, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO:802), и sgPHK G013006 (SEQ ID NO: 243), нацеленные на TRAC, составляли с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением gPHK к mPHK 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 5 мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM и дополнительно добавляли 5 мкг/мл рекомбинантного AroE3 человека (Peprotech, кат. № 350-02) в течение 15 минут при 37 °С. Предварительно инкубированные композиции LNP и Т-клетки с Transact смешивали для получения конечных концентраций  $1\times 10^6$  Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей РНК/мл LNP в среде TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Флакон с EF1 $\alpha$ -HD1 AAV размораживали на столе и добавляли к клеткам, обработанным TRAC LNP, в количестве  $3\times 10^5$  GC/клетку. Затем клетки инкубировали при 37 °С в течение 24 часов.

[00451] Затем через 96 часов после активации клетки обрабатывали для заключительного цикла редактирования либо только с TRBC LNP, либо в комбинации с HLA-A LNP. Группу В2М КО обрабатывали В2М LNP. Клетки собирали по группам и центрифугировали при  $500\times g$  в течение 5 минут, чтобы вымыть композиции LNP и среду. Затем клетки ресуспендировали в среде TCAM при концентрации  $1\times 10^6$  клеток/мл в среде TCAM. Вкратце, композиции LNP, содержащие mPHK, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 802), и sgPHK G018995 (sgPHK, содержащая SEQ ID NO: 13, как продемонстрировано в Таблице 2), нацеленные на HLA-A, составляли, как описано в **Примере 1**. Композиции LNP, содержащие mPHK Cas9 и sgPHK G000529 (SEQ ID NO: 245), нацеленные на В2М, и композиции LNP, содержащие mPHK Cas9 и sgPHK G016239 (SEQ ID NO: 247), нацеленные на TRBC, составляли с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением gPHK к mPHK 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 5 мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM и дополнительно добавляли 5 мкг/мл рекомбинантного AroE3 человека (Peprotech, кат. № 350-02) в течение 15 минут при 37 °С. Предварительно инкубированные композиции LNP и Т-клетки с Transact смешивали для получения конечных концентраций  $1\times 10^6$  Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей РНК/мл LNP в среде TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-

07), и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Для одновременного редактирования TRBC и HLA-A, LNP и AroE3 составляли в 4-кратном увеличении конечной концентрации с последующим добавлением TRBC LNP сначала к Т-клеткам и инкубацией при 37°C в течение 15 минут. После инкубации добавляли предварительно составленные композиции HLA-A LNP, клетки инкубировали в течение 24 часов.

[00452] После последнего цикла редактирования клетки промывали вращением при 500xG в течение 5 минут и ресуспендировали в среде TCGM, содержащей 5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15).

[00453] На день 5 после активации отредактированные Т-клетки сортировали на клетках GFP<sup>+</sup> с применением BD FACS Aria Flow Sorter для обогащения клетками, которые экспрессируют люциферазу. Отсортированные клетки выдерживали в течение ночи в среде TCGM с цитокинами в инкубаторе при 37 °C. На следующий день Т-клетки повторно стимулировали T-cell TransAct™ в разведении 1:100 в течение 24 часов. Через 24 часа после повторной стимуляции, TransAct™ вымывали, а Т-клетки культивировали и выдерживали на планшете G-Rex в течение 15 дней с регулярными заменами среды и цитокинов.

[00454] Через пятнадцать дней после первой рестимуляции уровни редактирования подтверждали с помощью проточной цитометрии, клетки промывали и ресуспендировали в буфере HBSS для инъекций.

## **9.2. Т-клетки с двойным нокаутом HLA-A и СПТА демонстрируют защиту от уничтожения посредством NK-клеток**

[00455] Для исследования *in vivo*, NK-клетки, выделенные из лейкопака методами, известными в данной области техники, промывали HBSS (Gibco, кат. № 14025-092) и ресуспендировали в концентрации  $10 \times 10^6$  клеток/мл для инъекции в 150 мкл HBSS. Тридцати самкам мышей NOG-hIL-15 (Taconic) вводили путем инъекции в хвостовую вену  $1,5 \times 10^6$  выделенных NK-клеток. Дополнительно 25 самок NOG-hIL-15 служили в качестве контроля без инъекций NK.

[00456] Через двадцать восемь дней после инъекции NK-клеток, мышам вводили неотредактированные или сконструированные Т-клетки, как описано в **Таблице 21**. Вкратце,  $0,2 \times 10^6$  сконструированных Т-клеток вводили через 16 дней после второй активации после промывания в PBS и ресуспендирования в растворе HBSS в концентрации  $6,0 \times 10^6$  клеток/150 мкл.

[00457] Визуализацию IVIS живых мышей проводили для идентификации люциферазоположительных Т-клеток по спектру IVIS. Визуализация IVIS проводили через 24 часа, 48 часов, 72 часа, 6 дней, 10 дней, 13 дней, 17 дней, 20 дней, 24 дня, 27 дней, 31 день, 34 дня, 38 дней, 42 дня, 44 дня, 48 дней, 55 дней, 63 дня, 72 дня, 77 дней, 85 дней и 91 день после инъекции Т-клеток. Мышей готовили к визуализации с помощью инъекции D-люциферина внутрибрюшинно в дозе 10 мкг/г массы тела в соответствии с рекомендацией производителя, около 150 мкл на животное. Животных анестезировали, а

затем помещали в блок визуализации IVIS. Визуализацию выполняли с автоматически установленным временем экспозиции, полем зрения D, средним биннингом и значением F/stop равным 1. **Таблица 22** и **Фиг. 7А** демонстрируют излучение (фотоны/с/см<sup>2</sup>/sr) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различные моменты времени после инъекции вплоть до 91 дня. **ФИГ. 7В** демонстрирует излучение (фотоны/с/см<sup>2</sup>/sr) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различных группах мышей через 31 день. In vivo, В2М-отредактированные клетки продемонстрировали чувствительность к уничтожению посредством НК, в то время как вдвойне (HLA-A, СРТА) отредактированные клетки продемонстрировали защиту от лизиса, опосредованного НК.

[00458] **Таблица 21 - Конструирование Т-клеток**

Группа	День 0	Day1	День 2	Day3	Day4	Day6	День 7	День 8	День 16
HLA-A СРТА КО	Размор аживан ие	СРТА	GFP- Luc LV	TRA С+А AV	TRB С, HLA- А	Пото к и сорт иров ка	Повтор ная стимул яция	Размно жение на G- Rex	Промы вание и введени е
В2М Контроль	Размор аживан ие	В2М	GFP- Luc LV	TRA С+А AV	TRB С	Пото к и сорт иров ка	Повтор ная стимул яция	Размно жение на G- Rex	Промы вание и введени е
Без редакт ирован ия	Размор аживан ие	-	GFP- Luc LV	-	-	Пото к и сорт иров ка	Повтор ная стимул яция	Размно жение на G- Rex	Промы вание и введени е

[00459] **Таблица 22 - Общий поток (фотонов/с) от Т-клеток, экспрессирующих люциферазу, у мышей, получавших инъекции Т-клеток, в определенные моменты времени**

Инъекция Т-клеток	Момент времени (дни)	Без инъекции НК-клеток			Инъекция НК-клеток		
		Среднее	SD	n	Среднее	SD	n
Т-клетки	1	1170000	0	1	1060000	0	1

отсутству ют	2	884000	0	1	728000	0	1
	3	1090000	0	1	771000	0	1
	6	1040000	0	1	888000	0	1
	10	741000	0	1	799000	0	1
	13	1350000	0	1	751000	0	1
	17	1210000	0	1	709000	0	1
	20	1530000	0	1	1190000	0	1
	24	1280000	0	1	823000	0	1
	27	1430000	0	1	577000	0	1
	31	1310000	0	1	970000	0	1
	34	1840000	0	1	800000	0	1
	38	937000	0	1	750000	0	1
	42	1450000	0	1	757000	0	1
	44	1770000	0	1	797000	0	1
	48	1850000	0	1	666000	0	1
	55	1170000	0	1	723000	0	1
	63	1680000	0	1	799000	0	1
	72	1400000	0	1	840000	0	1
	77	1570000	0	1	801000	0	1
85	1220000	0	1	770000	0	1	
91	1580000	0	1	905000	0	1	
Без редактиро вания	1	37560000	34014482,9	5	27882000	27141262,31	5
	2	40698000	22307084,5	5	28640000	14568047,23	5
	3	34210000	18847559,5	5	25692000	14362636,25	5
	6	51440000	10855551,6	5	37700000	34510288,32	5
	10	29460000	5028220,36	5	34060000	24420544,63	5
	13	17350000	8731122,49	5	42864000	47552123,82	5
	17	17380000	4065956,22	5	124180000	217126534,5	5
	20	35860000	9912012,91	5	329720000	644006666,9	5
	24	41400000	6393355,93	5	1784780000	3583692731	5
	27	70500000	28116809,9	5	9112600000	1917210686 9	5
	31	124260000	57196923	5	1438300000 0	2725446820 2	5

	34	313000000	256943574	5	1745000000 0	2485961282 9	5
	38	667800000	614512978	5	2531600000 0	2611130559 7	5
	42	1727400000	1703225998	5	2108400000 0	1695661169 0	5
	44	2101400000	2213844349	5	1697500000 0	1372112118 8	4
	48	5068000000	4995313854	5	1510666666 7	1161353233 7	3
	55	6386750000	5350377767	4	1630333333 3	1191318737 1	3
	63	8105750000	6722716632	4			
	72						
	77						
	85						
	91						
B2M KO	1	96334000	62882587,3	5	7192000	6901425,215	5
	2	138300000	57619007,3	5	7296000	2213194,524	5
	3	117980000	43943736,8	5	7342000	2837475,991	5
	6	104240000	34772230,3	5	7276000	2743998,907	5
	10	81120000	19876921,3	5	6124000	1967035,841	5
	13	45386000	24729233,3	5	5748000	3248448,861	5
	17	50600000	19718899,6	5	4390000	902607,3343	5
	20	38200000	12211470	5	2772000	947507,2559	5
	24	32180000	17561520,4	5	4566000	1182742,576	5
	27	35840000	15497354,6	5	3626000	1995903,304	5
	31	41380000	12243243	5	3344000	1295812,486	5
	34	40740000	13481394,6	5	3864000	506635,964	5
	38	33980000	15116117,2	5	3468000	1330139,09	5
	42	38840000	15452605	5	3504000	688534,676	5
	44	35280000	19116929,7	5	3266000	910291,1622	5
	48	31600000	17624982,3	5	3196000	726691,1311	5
55	38920000	30824779	5	2654000	475794,0731	5	

	63	29300000	22330584,4	5	2530000	274135,0032	5
	72	19070000	13309188,6	5	2522000	437344,258	5
	77	30680000	24960508,8	5	2650000	531554,3246	5
	85	24738000	22937833,8	5	1816000	410524,0553	5
	91	18234000	10913394,5	5	1736000	297707,9105	5
HLA-A	1	63960000	33085918,5	5	59320000	32265414,92	5
KO СИТА	2	55412000	31461432,3	5	49560000	9862707,539	5
KO	3	64686000	39918742,2	5	41264000	22521777,9	5
	6	88440000	22053865,9	5	33442000	18099663,53	5
	10	68320000	18250397,3	5	42040000	4585084,514	5
	13	57880000	8452041,17	5	37028000	20443236,53	5
	17	39320000	11283040,4	5	41400000	10968135,67	5
	20	40480000	12259363,8	5	37540000	8371260,359	5
	24	39900000	18287017,3	5	37740000	9070446,516	5
	27	37800000	14406422,2	5	31840000	11387185,78	5
	31	46160000	13751836,2	5	25020000	11377477,75	5
	34	39820000	8990383,75	5	28980000	5348551,206	5
	38	42620000	8249363,61	5	31000000	7146677,55	5
	42	30740000	10083798,9	5	16928000	9138868,639	5
	44	31740000	9619667,35	5	26580000	7343500,528	5
	48	30740000	9147021,37	5	28620000	3141178,123	5
	55	27600000	5482244,07	5	21340000	3673281,911	5
	63	24820000	6599015,08	5	12428000	3646082,83	5
	72	10918000	3813609,84	5	13094000	3349355,162	5
	77	24840000	4728953,37	5	14200000	3801973,172	5
	85	15520000	4283923,44	5	14580000	2920102,738	5
	91	17260000	5452797,45	5	11256000	2456141,283	5

Пример 10: Эффективность МНСI и МНСII KO in vivo для Т-клеток HD1

[00460] Самкам мышей NOG-hIL-15 прививали  $0,2 \times 10^6$  клеточной линии острого лимфобластного лейкоза человека (ALL) 697-Luc2 с последующей инъекцией  $10 \times 10^6$  сконструированных Т-клеток с различными редактированиями, чтобы определить, обеспечивают ли эти редактирования специфический противоопухолевый эффект. Группы изученных Т-клеток включают: контрольную группу Т-клеток без редактирования (только 697); Т-клетки с редактированиями в TRAC и TRBC (TCR KO); Т-клетки с редактированиями в TRAC и TRBC и вставкой HD1 (вставка TCR KO/WT1); Т-клетки с

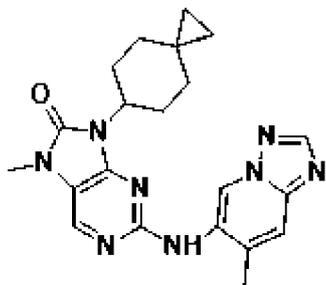
редактированиями в TRAC и TRBC, вставкой HD1 и нарушением в HLA-A (HLA-A KO); Т-клетки с редактированиями в TRAC и TRBC, вставкой HD1 и редактированиями в HLA-A и СИТА (AlloWT1); и Т-клетки с редактированиями в TRAC и TRBC и вставкой HD1 в присутствии соединения ДНК PKi, а также редактированиями в HLA-A и СИТА (AlloWT1+PKi, Соединение 1).

#### 10.1. Приготовление Т-клеток

[00461] Т-клетки от донора HLA-A2+ (110046967) выделяли из продуктов лейкофереза здорового донора (STEMCELL Technologies). Т-клетки выделяли с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя и криоконсервировали с помощью Cryostor CS10 (STEMCELL Technologies, кат. № 07930). За день до начала редактирования Т-клеток, клетки размораживали и оставляли на ночь в среде для активации Т-клеток TCAM: CTS OpTmizer (Thermofisher №A3705001) с добавлением 2,5% сыворотки АВ человека (Gemini №100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher №35050061), 10mM HEPES (Thermofisher №15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech №200-02), IL-7 (Peprotech №200-07), IL-15 (Peprotech №200-15).

#### 10.2: Множественное редактирование Т-клеток с последовательной доставкой LNP

[00462] Т-клетки готовили путем последовательной обработки клеток здорового донора четырьмя композициями LNP, составленными совместно с mPНК Cas9 и sgPНК, нацеленными на TRAC, TRBC, СИТА и HLA-A. Липидная часть композиций LNP включала липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату PНК (N:P) около 6 и соотношением gPНК к mPНК 1:2 по массе. Трансгенный TCR, нацеленный на WT1, сайт специфически интегрировали в сайт разреза TRAC с помощью шаблона гомологически-направленной репарации с применением AAV, указанных в Таблице 24, в сочетании с низкомолекулярным ингибитором ДНК-зависимой протеинкиназы для увеличения скорости вставки tgTCR. Ингибитор, именуемый в дальнейшем «Соединение 1 DNAPKi», представляет собой 9-(4,4-дифторциклогексил)-7-метил-2-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)амино)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он, также обозначаемый как:



[00463] DNAPKi Соединение 1 готовили следующим образом:

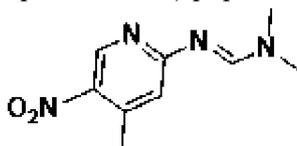
[00464] Общая информация

[00465] Все реагенты и растворители были закуплены и применялись в том виде, в

каком они были получены от коммерческих поставщиков, или синтезировались в соответствии с указанными процедурами. Все промежуточные соединения и конечные соединения очищали посредством колоночной флэш-хроматографии на силикагеле. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker или Varian 400 МГц, а данные ЯМР регистрировали в CDCl<sub>3</sub> при температуре окружающей среды. Химические сдвиги указаны в миллионных долях (ppm) относительно CDCl<sub>3</sub> (7.26). Данные для <sup>1</sup>H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг, мультиплетность (bг=широкий, s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, dd=дублет дублетов, dt=дублет триплетов, m=мультиплет), константа связывания и интегрирование. Данные MS регистрировали на масс-спектрометре Waters SQD2 с источником ионизации электрораспылением (ESI). Чистоту конечных соединений определяли с помощью UPLC-MS-ELS с применением прибора для жидкостной хроматографии Waters Acquity H-Class, оснащенного масс-спектрометром SQD2 с детекторами фотодиодной матрицы (PDA) и испарительного светорассеяния (ELS).

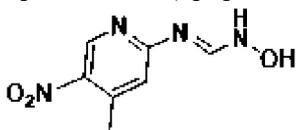
[00466] Пример 1 - Соединение 1

[00467] Промежуточное соединение 1a: (E)-N, N-диметил-N'-(4-метил-5-нитропиридин-2-ил)формимидамид



[00468] К раствору 4-метил-5-нитропиридин-2-амина (5 г, 1,0 экв.) в толуоле (0,3 М) добавляли DMF-DMA (3,0 экв.). Смесь перемешивали при 110°C в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде твердого вещества желтого цвета (59%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 8,82 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 3,21 (m, 6H).

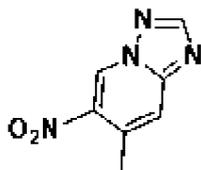
[00469] Промежуточное соединение 1b: (E)-N-гидрокси-N'-(4-метил-5-нитропиридин-2-ил)формимидамид



[00470] К раствору промежуточного соединения 1a (4 г, 1,0 экв.) в MeOH (0,2 М) добавляли NH<sub>2</sub>OH·HCl (2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток распределяли между H<sub>2</sub>O и EtOAc с последующей двукратной экстракцией EtOAc. Органические фазы концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (66%). <sup>1</sup>H NMR (400 МГц, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 10,52 (d, J=3,8 Гц, 1H), 10,08 (dd, J=9,9, 3,7 Гц, 1H), 8,84 (d, J=3,8 Гц, 1H), 7,85

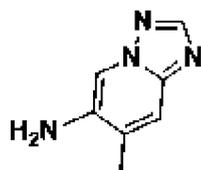
(dd,  $J=9,7$ ,  $3,8$  Гц, 1H), 7,01 (d,  $J=3,9$  Гц, 1H), 3,36 (s, 3H).

[00471] Промежуточное соединение 1c: 7-метил-6-нитро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин.



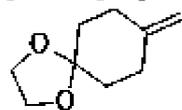
[00472] К раствору промежуточного соединения 1b (2,5 г, 1,0 экв.) в THF (0,4 М) добавляли трифторуксусный ангидрид (1,0 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (44%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,53 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 2,78 (d,  $J=1,0$  Гц, 3H).

[00473] Промежуточное соединение 1d: 7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-амин.



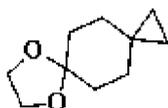
[00474] К смеси Pd/C (10% w/w, 0,2 экв.) в EtOH (0,1 М) добавляли промежуточное соединение 1c (1,0 экв. и формиат аммония (5,0 экв.). Смесь нагревали при 105 °C в течение 2 часов. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-коричневого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  8,41 (s, 2H), 8,07 (d,  $J=9,0$  Гц, 2H), 7,43 (s, 1H), 2,22 (s, 3H).

[00475] Промежуточное соединение 1e: 8-метилен-1,4-диоксапиро[4.5]декан.



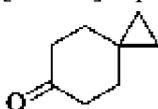
[00476] К раствору метил(трифенил)фосфония бромида (1,15 экв.) в THF (0,6 М) по каплям добавляли *n*-BuLi (1,1 экв.) при -78 °C и смесь перемешивали при 0 °C в течение 1 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 1,4-диоксапиро[4.5]декан-8-он (50 г, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Реакционную смесь выливали в водн.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  при 0 °C, разбавляли  $\text{H}_2\text{O}$  и трижды экстрагировали с применением EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (51%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,67 (s, 1H), 3,96 (s, 4H), 2,82 (t,  $J=6,4$  Гц, 4H), 1,70 (t,  $J=6,4$  Гц, 4H).

[00477] Промежуточное соединение 1f: 7,10-диоксадиспиرو[2.2.4<sup>6</sup>.2<sup>3</sup>]додекан.



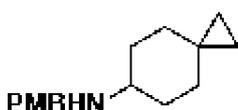
[00478] К раствору промежуточного соединения 4a (5 г, 1,0 экв.) в толуоле (3 М) по каплям добавляли  $ZnEt_2$  (2,57 экв.) при  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  и смесь перемешивали при  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 1 часа. Затем к смеси по каплям добавляли диiodметан (6,0 экв.) при  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  в атмосфере  $N_2$ . Затем смесь перемешивали при  $20\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 17 ч в атмосфере  $N_2$ . Реакционную смесь выливали в водн.  $NH_4Cl$  при  $0\text{ }^\circ\text{C}$  и дважды экстрагировали  $EtOAc$ . Объединенные органические фазы промывали соляным раствором (20 мл), сушили безводным  $Na_2SO_4$ , фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого масла (73%).

[00479] Промежуточное соединение 1g: спиро[2.5]октан-6-он



[00480] К раствору промежуточного соединения 4b (4 г, 1,0 экв.) в 1:1 THF/ $H_2O$  (1,0 М) добавляли TFA (3,0 экв.). Смесь перемешивали при  $20\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 2 ч в атмосфере  $N_2$ . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления THF и pH остатка доводили до 7 с помощью 2 М NaOH (водн.). Смесь выливали в воду и трижды экстрагировали с применением  $EtOAc$ . Объединенную органическую фазу промывали соляным раствором, сушили безводным  $Na_2SO_4$ , фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого масла (68%).  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  2,35 (t,  $J=6,6$  Гц, 4H), 1,62 (t,  $J=6,6$  Гц, 4H), 0,42 (s, 4H).

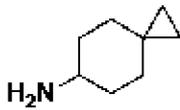
[00481] Промежуточное соединение 1h: N-(4-метоксибензил)спиро[2.5]октан-6-амин



[00482] К смеси промежуточного соединения 4c (2 г, 1,0 экв.) и (4-метоксифенил)метанамина (1,1 экв.) в DCM (0,3 М) добавляли  $AcOH$  (1,3 экв.). Смесь перемешивали при  $20\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 1 ч в атмосфере  $N_2$ . Затем к смеси добавляли  $NaBH(OAc)_3$  (3,3 экв.) при  $0\text{ }^\circ\text{C}$  и смесь перемешивали при  $20\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 17 ч в атмосфере  $N_2$ . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM, полученный остаток разбавляли  $H_2O$  и трижды экстрагировали с применением  $EtOAc$ . Объединенные органические слои промывали соляным раствором, сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде твердого вещества серого цвета (51%).  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $(CD_3)_2SO$ )  $\delta$  7,15-7,07 (м, 2H), 6,77-6,68 (м, 2H), 3,58 (с, 3H), 3,54 (с, 2H), 2,30 (ддт,  $J=10,1, 7,3, 3,7$  Гц, 1H), 1,69-1,62 (м, 2H), 1,37 (тд,  $J=12,6, 3,5$  Гц, 2H), 1,12-1,02 (м, 2H), 0,87-0,78 (м, 2H),

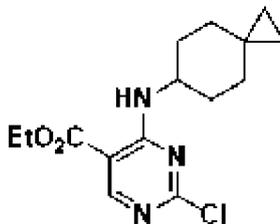
0,13-0,04 (м, 2H).

[00483] Промежуточное соединение 1i: спиро[2.5]октан-6-амин



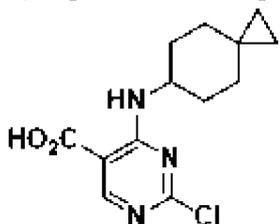
[00484] К суспензии Pd/C (10% w/w, 1,0 экв.) в MeOH (0,25 M) добавляли промежуточное соединение 4d (2 г, 1,0 экв.) и смесь перемешивали при 80 °С при 50 Psi в течение 24 ч в атмосфере H<sub>2</sub>. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 2,61 (тт, J=10,8, 3,9 Гц, 1H), 1,63 (ддд, J=9,6, 5,1, 2,2 Гц, 2H), 1,47 (тд, J=12,8, 3,5 Гц, 2H), 1,21-1,06 (м, 2H), 0,82-0,72 (м, 2H), 0,14-0,05 (м, 2H).

[00485] Промежуточное соединение 1j: этил 2-хлор-4-(спиро[2.5]октан-6-иламино)пиримидин-5-карбоксилат.



[00486] К смеси этил 2,4-дихлорпиримидин-5-карбоксилата (2,7 г, 1,0 экв.) и промежуточного соединения 1i (1,0 экв.) в ACN (0,5-0,6 M) добавляли K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,5 экв.) одной порцией в атмосфере N<sub>2</sub>. Смесь перемешивали при 20°С в течение 12 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (54%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 8,64 (с, 1H), 8,41 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,33 (кв., J=7,1 Гц, 2H), 4,08 (д, J=9,8 Гц, 1H), 1,90 (дд, J=12,7, 4,8 Гц, 2H), 1,64 (т, J=12,3 Гц, 2H), 1,52 (кв., J=10,7, 9,1 Гц, 2H), 1,33 (т, J=7,1 Гц, 3H), 1,12 (д, J=13,0 Гц, 2H), 0,40-0,21 (м, 4H).

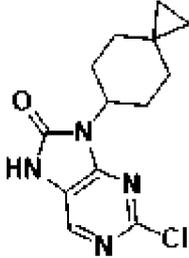
[00487] Промежуточное соединение 1k: 2-хлор-4-(спиро[2.5]октан-6-иламино)пиримидин-5-карбоновая кислота



[00488] К раствору промежуточного соединения 1j (2 г, 1,0 экв.) в 1:1 THF/H<sub>2</sub>O (0,3 M) добавляли LiOH (2,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°С в течение 12 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток доводили до pH 2 с применением 2 M HCl, осадок собирали фильтрованием, промывали водой и тестировали в вакууме. Продукт применяли

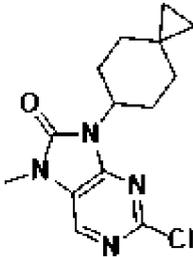
непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (82%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  13,54 (с, 1H), 8,38 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 8,35 (с, 1H), 3,82 (кв,  $J=8,2, 3,7$  Гц, 1H), 1,66 (дк,  $J=12,8, 4,1$  Гц, 2H), 1,47-1,34 (м, 2H), 1,33-1,20 (м, 2H), 0,86 (дт,  $J=13,6, 4,2$  Гц, 2H), 0,08 (дд,  $J=8,3, 4,8$  Гц, 4H).

[00489] Промежуточное соединение 1l: 2-хлор-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



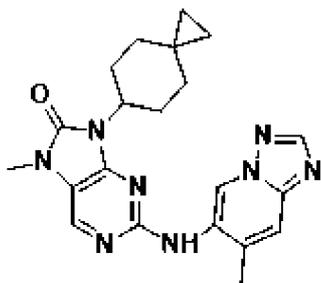
[00490] К смеси промежуточного соединения 1k (1,5 г, 1,0 экв.) и  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,0 экв.) в DMF (0,3 М) добавляли DPPA (1,0 экв.). Смесь перемешивали при 120 °С в течение 8 ч в атмосфере  $\text{N}_2$ . Реакционную смесь выливали в воду. Осадок собирали фильтрованием, промывали водой и сушили в вакууме, получая остаток, который применяли непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (67%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  11,68 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 4,26 (ддт,  $J=12,3, 7,5, 3,7$  Гц, 1H), 2,42 (кд,  $J=12,6, 3,7$  Гц, 2H), 1,95 (тд,  $J=13,3, 3,5$  Гц, 2H), 1,82-1,69 (м, 2H), 1,08-0,95 (м, 2H), 0,39 (тдк,  $J=11,6, 8,7, 4,2, 3,5$  Гц, 4H).

[00491] Промежуточное соединение 1m: 2-хлор-7-метил-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



[00492] К смеси промежуточного соединения 1l (1,0 г, 1,0 экв.) и  $\text{NaOH}$  (5,0 экв.) в 1:1 THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (0,3-0,5 М) добавляли  $\text{MeI}$  (2,0 экв.). Смесь перемешивали при 20 °С в течение 12 ч в атмосфере  $\text{N}_2$ . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого твердого вещества (67%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,57 (с, 1H), 4,03 (тт,  $J=12,5, 3,9$  Гц, 1H), 3,03 (с, 3H), 2,17 (кд,  $J=12,6, 3,8$  Гц, 2H), 1,60 (тд,  $J=13,4, 3,6$  Гц, 2H), 1,47-1,34 (м, 2H), 1,07 (с, 1H), 0,63 (дп,  $J=14,0, 2,5$  Гц, 2H), -0,05 (с, 4H).

[00493] Соединение 1: 7-метил-2-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)амино)-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



[00494] Смесь Промежуточного соединения 1m (1,0 экв.) и Промежуточного соединения 1d (1,0 экв.), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0,2 экв.), XantPhos (0,4 экв.) и Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,0 экв.) в DMF (0,2-0,3 M) дегазировали и продували 3 раза N<sub>2</sub>, и указанную смесь перемешивали при 130°C в течение 12 часов в атмосфере N<sub>2</sub>. Затем смесь выливали в воду и трижды экстрагировали с применением DCM. Объединенную органическую фазу промывали соляным раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде не совсем белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 9,09 (с, 1H), 8,73 (с, 1H), 8,44 (с, 1H), 8,16 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 4,21 (т, J=12,5 Гц, 1H), 3,36 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 2,34 (дт, J=13,0, 6,5 Гц, 2H), 1,93-1,77 (м, 2H), 1,77-1,62 (м, 2H), 0,91 (д, J=13,2 Гц, 2H), 0,31 (т, J=7,1 Гц, 2H). MS: 405,5 m/z [M+H].

[00495] Последовательное редактирование происходило для каждой группы, как продемонстрировано в **Таблице 23**.

[00496] Таблица 23 - Конструирование Т-клеток

Название группы	День 1	День 2	День 3	День 4
TCR KO	TRBC		TRAC	
Вставка TCR KO/WT1	TRBC		TRAC/AAV	
WT1/HLA-A		HLA-A	TRAC/AAV	TRBC
AlloWT1	СИТА	HLA-A	TRAC/AAV	TRBC
AlloWT1+ДНК PKi Соединение 1	СИТА	HLA-A	TRAC/AAV+Co единение 1 (0,25 мкМ)	TRBC

### 10.3. Обработка LNP и размножение Т-клеток

[00497] Композиции LNP готовили в среде, содержащей AroE, и доставляли в Т-клетки следующим образом: в день 1 композиции LNP, указанные в Таблице 24, инкубировали при концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhAroE3 (Reprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности  $2 \times 10^6$  клеток/мл в TCAM с разведением 1:50 реагента человека T Cell TransAct (Miltenyi, 130-111-160). Т-клетки и среду LNP-AroE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы на ночь.

[00498] В день 2, композиции LNP, как указано в **Таблице 23**, инкубировали в концентрации 25 мкг/мл в TCAM, содержащей 20 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, 350-02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:10.

[00499] В день 3, композиции TRAC-LNP (**Таблица 23**), инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 10 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы. Затем к соответствующим группам добавляли AAV WT1 при показателе MOI  $3 \times 10^5$  GC/клетку. Соединение 1 добавляли к соответствующим группам в конечной концентрации 0,25  $\mu$ M.

[00500] В день 4, композиции LNP, как указано в **Таблице 23**, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, 350-02). Т-клетки промывали центрифугированием и ресуспендировали при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Затем к соответствующим культурам добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:1.

[00501] В дни с 5 по 11 Т-клетки переносили на планшет GREX (Wilson Wolf) в среде для размножения Т-клеток (TCEM: CTS OpTmizer (Thermofisher #A3705001) с добавлением 5% CTS Immune Cell Serum Replacement (Thermofisher #A2596101), 1X GlutaMAX (Thermofisher #35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher #15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech #200-02), IL-7 (Peprotech #200-07), IL-15 (Peprotech #200-15) и размножали. Вкратце, Т-клетки размножали в течение 6 дней с добавлением свежих цитокинов через день. Клетки подсчитывали с применением счетчика клеток Vi-CELL (Beckman Coulter) и рассчитывали кратность путем деления выхода клеток на исходный материал.

10.4. Количественная оценка редактирования Т-клеток с помощью проточной цитометрии и NGS

[00502] После размножения отредактированные Т-клетки окрашивали в коктейле антител для определения нокаута HLA-A2 (HLA-A2<sup>-</sup>), нокаута HLA-DR-DP-DQ посредством нокаута СИТА (HLA-DRDPDQ<sup>-</sup>), вставки WT1-TCR (CD3<sup>+</sup>Vb8<sup>+</sup>), и процента клеток, экспрессирующих остаточный эндогенный (CD3<sup>+</sup>Vb8<sup>-</sup>). Затем клетки промывали, анализировали на приборе Cytoflex LX (Beckman Coulter) с помощью пакета программ FlowJo. Т-клетки были отобраны по размеру и статусу CD8<sup>+</sup>, прежде чем были определены показатели редактирования и вставки. Показатели редактирования и вставки можно найти в **Таблице 24** и на **Фигурах 9А-9Е**. Процент полностью отредактированных клеток AlloWT1-Т, экспрессирующих WT1-TCR с нокаутом HLA-A и СИТА, определяли как % CD3<sup>+</sup>Vb8<sup>+</sup>HLA-A<sup>-</sup>HLA-DRDPDQ<sup>-</sup>. В отредактированных образцах наблюдались высокие уровни нокаута HLA-A и СИТА, а также вставки WT1-TCR и эндогенного TCR KO. Примечательно, что Т-клетки, получавшие ингибитор ПК ДНК, Соединение 1, продемонстрировали улучшенную эффективность редактирования.

[00503] Визуализацию IVIS живых мышей проводили для идентификации люциферазоположительных опухолевых клеток по спектру IVIS. Визуализацию IVIS

выполняли через 2 дня, 6 дней, 9 дней, 13 дней, 16 дней и 18 дней после инъекции Т-клеток. Мышей готовили к визуализации с помощью инъекции D-люциферина внутривентриально в дозе 10 мкг/г массы тела в соответствии с рекомендацией производителя, около 150 мкл на животное. Животных анестезировали, а затем помещали в блок визуализации IVIS. Визуализацию выполняли с автоматически установленным временем экспозиции, полем зрения D, средним биннингом и значением F/stop равным 1. В **Таблице 25** и на **Фигуре 10** продемонстрирована яркость (фотоны/с/см<sup>2</sup>/sr) экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различные моменты времени после инъекции вплоть до 18 дней.

[00504] Таблица 24 - Эффективность редактирования Т-клеток

	CD8+	Эндогенный TCR+	WT1 TCR+	HLA-A2-	HLA- DRDPDQ-	AlloW T1+
Неотредактиро ванные	26,9	95,4	4,39	0,66	35,7	0,0029 2
TCR KO	31,1	5,12	0,5	0,62	30,8	0,23
WT1	34,2	1,2	78,5	0,47	49,7	0,03
WT1/HLA-A	24,8	0,93	63,3	99,1	56,4	40,5
AlloWT1	28,8	0,51	69,3	98,7	96,2	66,1
AlloWT1+Соед инение 1	29,2	0,23	89,8	99	96,5	86

[00505] Таблица 25 - Общий поток (фотонов/с) от целевых клеток, экспрессирующих люциферазу, у обработанных мышей с интервалами после инъекции Т-клеток.

		Среднее	SD	n
<b>IR Контроль</b>	2	668000	0	1
	6	662000	0	1
	9	802000	0	1
	13	834000	0	1
	16	799000	0	1
	18	727000	0	1
<b>Только 697</b>	2	11695000	6766940,65	8
	6	11756250	6759771,63	8
	9	6542375000	4097940177	8
	13	34156125000	19588932739	8
	16	56000000000	14890936841	8
	18			

<b>TCR KO</b>	2	8696250	3615004,20	8	
	6	8755000	3659211,47	8	
	9	1985750000	1311102671	8	
	13	39295000000	18556359711	8	
	16	50442857143	12082474518	7	
	18	35000000000	0	1	
<b>Вставка KO/WT1</b>	<b>TCR</b>	2	1395750	651356,99	8
		6	1418625	660585,66	8
		9	13293750	10040193,42	8
		13	416762500	340405656,90	8
		16	987625000	637380114,80	8
		18	2523750000	1518542699	8
<b>HLA-A KO</b>	2	1306375	514478,92	8	
	6	1323750	504219,55	8	
	9	1785000	691416,77	8	
	13	9851428,57	13794971,82	7	
	16	35832857,14	53937852,11	7	
	18	53608571,43	65167479,22	7	
<b>AlloWT1</b>	2	1085625	137185,94	8	
	6	1100250	136031,25	8	
	9	12085000	20455051,77	8	
	13	43676250	87426018,67	8	
	16	146917500	310795920,60	8	
	18	31418750	33596200,65	8	
<b>AlloWT1+ДНКРki</b>	2	1138000	429877,06	8	
	6	1152750	420860,26	8	
	9	1720000	654391,77	8	
	13	3976250	5828721,83	8	
	16	39420000	97704137,36	8	
	18	80597500	162813409,10	8	

### 10.5. Выделение цитокинов сконструированными Т-клетками

[00506] Сконструированные Т-клетки, приготовленные, как описано в Примерах 10.1 и 10.2, анализировали на их профили высвобождения цитокинов. Анализы уничтожения опухолевых клеток OCI-AML3 *in vitro* проводили отдельно (данные не продемонстрированы) с применением сконструированных Т-клеток. Супернатанты из

анализов уничтожения опухолевых клеток применяли для оценки профиля выделения цитокинов каждой сконструированной Т-клеткой.

[00507] Вкратце, Т-клетки TCR KO, аутологичные Т-клетки WT1 (TCR KO+вставка TCR WT1) и аллогенные Т-клетки WT1 (как указано в Таблице 24) размораживали и оставляли на ночь в TCGM с добавлением IL-2, IL-7 и IL-15. На следующий день проводили анализ совместного культивирования, в котором каждую группу сконструированных Т-клеток культивировали совместно с целевой опухолью OCI-AML3. Сначала целевые опухолевые клетки OCI-AML3 обрабатывали пептидом VLD в различных концентрациях (500, 50, 5, 0,5, 0,05 и 0,005 нМ) в течение 1 часа. Затем Т-клетки из каждой группы подсчитывали и ресуспендировали в среде TCGM без цитокинов и совместно культивировали с импульсным OCI-AML3 при соотношении E:T 1:1. Количество Т-клеток при совместном культивировании нормализовали по показателю встраивания, чтобы сохранить согласованность E:T среди разных групп. После 24 часов совместного культивирования надосадочную жидкость из каждого образца совместного культивирования разбавляли в 5 раз Разбавителем 2 из набора для анализа U-PLEX Immuno-Oncology Group 1 (hu) (MSD, кат. № K151AEL-2). 50 мкл разведенных образцов из каждой группы загружали в планшет meso scale discovery (MSD) и инкубировали в течение 1 часа.

[00508] Для каждого из измеренных цитокинов к назначенному линкеру в соответствии с протоколом набора добавляли биотинилированное захватывающее антитело из иммуноонкологических анализов U-PLEX группы 1 (hu) Assays (MSD, кат. № K151AEL-2). Смеси антитело-линкер встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После инкубации планшет промывали, запечатывали и оставляли на ночь.

[00509] На следующий день калибраторы, содержащие стандарты для каждого из анализируемых цитокинов (IL-2 и IFN- $\gamma$ ), восстанавливали в соответствии с инструкциями производителя и разбавляли для получения 4-кратной стандартной кривой.

[00510] Планшеты промывали и добавляли по 50 мкл раствора детектирующих антител (приготовленного в соответствии с инструкциями к набору) в каждую лунку планшета MSD. Планшет инкубировали в течение 1 часа.

[00511] После инкубации планшет промывали и сразу считывали на приборе MSD. Выделение цитокинов продемонстрировано в **Таблицах 26-27** и на **Фиг. 11А-11В**.

[00512] **Таблица 26: IFN- $\gamma$**

IFN- $\gamma$						
Log[пептид (нМ)]	TCR KO		AutoWT1		AlloWT1	
2,70	122,55	25,96	93417,51	7094,06	147620,65	9709,50
1,70	134,20	16,97	60680,24	2770,37	104018,15	10358,48
0,70	144,94	24,90	41863,52	1759,74	99896,25	7700,60

-0,30	146,14	58,09	4812,67	175,51	31820,97	1331,50
-1,30	155,20	11,49	77,72	23,65	1592,76	131,04
-2,30	110,63	22,03	69,41	3,27	351,29	23,17

[00513] Таблица 27: IL-2

IL-2						
Log[пептид (нМ)]	TCR KO		AutoWT1		AlloWT1	
2,70	4,21	0,63	6031,67	373,56	7525,26	1116,85
1,70	4,17	0,76	3419,94	97,86	4450,71	861,82
0,70	5,28	0,25	1882,55	204,86	3780,66	381,75
-0,30	6,62	2,96	69,51	6,86	452,94	20,13
-1,30	5,87	1,47	4,88	1,07	10,91	2,80
-2,30	6,55	2,18	5,19	1,32	4,94	2,17

**Пример 11: Анализ реакции смешанных лимфоцитов**

[00514] Т-клетки выделяли из периферической крови здорового донора-человека со следующим фенотипом МНС I: HLA-A\*02:01:01G, 03:01:01G, HLA-B\*07:02:01G, HLA-C\*07:02:01G. Вкратце, лейкоферезный пакет (Stemcell Technologies) обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов с хлоридом аммония (Stemcell Technologies; кат. № 07800) в течение 15 минут для лизиса эритроцитов. Количество мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) определяли после лизиса, а выделение Т-клеток осуществляли с применением набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stemcell Technologies, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя. Выделенные CD3<sup>+</sup> Т-клетки ресуспендировали в среде Cryostor CS10 (Stemcell Technologies, кат. № 07930) и замораживали в жидком азоте до дальнейшего применения.

[00515] Замороженные Т-клетки размораживали при концентрации клеток  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл в среде для активации Т-клеток (TCAM), состоящей из OpTmizer TCGM, как описано в Примере 3, с дополнительным добавлением 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, Cat. 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Клетки выдерживали при 37 °С в течение 24 часов.

[00516] Через 24 часа после размораживания Т-клетки подсчитывали и ресуспендировали в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в среде TCAM и добавляли 1:50 по объему TransAct (Miltenyi Biotec кат. № 30-111-160).

В каждую лунку 24-луночного планшета для тканевых культур добавляли  $1 \times 10^6$  клеток, оставляя по 2 лунки для каждой группы, которую нужно сконструировать, и 2 лунки в качестве неотредактированных контролей (сконструированные группы: неотредактированные или WT, B2M KO (также обозначается как HLA- I или HLA класса I), СИТА (также обозначается как HLA класса II или HLA-II) KO, B2M+СИТА DKO, HLA-A KO, HLA-A+СИТА DKO). Планшет переносили в инкубатор при 37 °С. Композиции

LNP, содержащие mPHK, кодирующую cas9 (SEQ ID NO:802), и sgPHK G013675 (SEQ ID NO: 236), нацеленные на СИТА, составляли с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением gPHK к mPHK 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 5 мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM с дополнительным добавлением 5 мкг/мл рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, Cat. 350-02) в течение 15 минут при 37 °С. В 6 из 12 лунках, предварительно инкубированные LNP и Т-клетки с Transact смешивали для получения конечных концентраций  $1 \times 10^6$  Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей РНК/мл LNP в среде TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15) (Это будут 2 лунки для группы СИТА КО, 2 лунки для группы HLA-A+СИТА ДКО и 2 лунки для группы В2М+СИТА ДКО). Все дополнительные лунки редактировали имитационно с применением среды, содержащей ApoE3, но без композиций LNP. Все клетки инкубировали при 37°С в течение 24 часов.

[00517] Через 24 часа после активации, 2 ранее необработанные лунки и 2 лунки, содержащие СИТА LNP, обрабатывали композициями LNP для В2М (для групп В2М КО и В2М+СИТА ДКО); и 2 ранее необработанные лунки и 2 лунки, содержащие СИТА LNP, обрабатывали композициями LNP для HLA-A (для групп HLA-A КО и HLA-A+СИТА ДКО). Композиции LNP, содержащие mPHK Cas9 и sgPHK G000529 (SEQ ID NO: 245), нацеленные на В2М, и композиции LNP, содержащие mPHK, кодирующую cas9 (SEQ ID NO: 802), и sgPHK G018995 (sgPHK, содержащая SEQ ID NO: 13, как продемонстрирован в Таблице 2), нацеленные на HLA-A, составляли с липидом А, холестерином I, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением gPHK к mPHK 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 25 мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM с дополнительным добавлением 20 мкг/мл рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, кат. № 350-02) в течение 15 минут при 37 °С. Композиции LNP В2М и HLA-A добавляли в соответствующие лунки 24-луночного планшета, как указано выше, с получением конечных концентраций 2,5 мкг общей РНК/мл LNP в среде TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Дополнительную группу клеток редактировали имитационно с применением среды, содержащей ApoE3, но без композиций LNP, для применения в качестве неотредактированного или WT-контроля. Все клетки инкубировали при 37°С в течение 24 часов.

[00518] Через 24 часа после второго цикла редактирования клетки промывали вращением при 500XG в течение 5 минут и ресуспендировали в среде TCEM, содержащей

5% CTST™ Immune Cell SR (Gibco кат. № A2596101), 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Клетки культивировали и выдерживали в чашке G-Rex в течение 7 дней с регулярной сменой среды и цитокинов, после чего ресуспендировали в среде Cryostor CS10 (Stemcell Technologies, кат. № 07930) и замораживали в жидком азоте до дальнейшего применения.

[00519] Шесть групп донорных Т-клеток (неотредактированные дикого типа, В2М КО, HLA-A КО, СИТА КО, HLA-A+СИТА ДКО, В2М+СИТА ДКО) размораживали и ресуспендировали в TCGM в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл+100 U/мл IL-2, 0,5 нг/мл IL-7 и IL-15 (HLA-генотипы донора и хозяина продемонстрированы ниже в **Таблице 28**). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от 3 хозяев (аутологичный хозяин, аллогенный хозяин (хозяин, совпадающий по HLA-B и C) и хозяин положительного контроля (несовпадающий по HLA-A, HLA-B и HLA-C) размораживали, ресуспендировали в TCGM при  $1 \times 10^6$ /мл+100 Ед/мл IL-2, 0,5 нг/мл IL-7 и IL-15. Клетки донора и хозяина выдерживали в течение ночи в инкубаторе при 37 ° С. На следующий день флаконы с донорными клетками облучали при 4000 rad и центрифугировали, и каждую группу ресуспендировали при  $1 \times 10^6$ /мл в TCGM без цитокинов. PBMC хозяина от двух хозяев удаляли из CD56<sup>+</sup> клеток с применением CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec, кат. № 130-050-401). Около  $1 \times 10^6$  клеток от каждого хозяина сохраняли в пробирках объемом 15 мл для немеченых контролей потока. Чтобы пометить  $18 \times 10^6$  клеток каждого хозяина, флакон с Cell Trace Violet (Thermo Fisher, кат. № C34571) доводили до комнатной температуры и восстанавливали с применением 20 мкл DMSO для получения рабочей концентрации 5 мМ CTV. Клетки хозяина ресуспендировали в концентрации  $\sim 1 \times 10^6$ /мл в забуференном фосфатом солевом растворе (Corning, кат. № 21-040-CV) и переносили в другую коническую пробирку на 50 мл. После добавления 18 мкл CTV в пробирки для окрашивания клеток хозяина пробирки переносили в инкубатор при 37°C на 15 минут. После этого пробирки заполняли до 40 мл TCGM без цитокинов для поглощения любого несвязанного красителя. Затем меченые клетки хозяина центрифугировали при 500xg в течение 5 минут и ресуспендировали в TCGM без цитокинов при  $1 \times 10^6$ /мл. 50 000 клеток на 50 мкл на лунку PBMC хозяина высевали на лунку от соответствующих хозяев. В лунках, требующих 4х клеток хозяина (контрольные образцы для нормализации данных), высевали 200 000 клеток хозяина по 200 мкл на лунку. В клетки хозяина, меченные как «хозяин+TransAct» (положительный контроль пролиферации), высевали 50 000 клеток на 50 мкл на лунку PBMC хозяина с последующим добавлением 1 мкл T Cell TransAct™ человека (Miltenyi Biotec, кат. № 130-111-160), и объем этих лунок доводили до 200 мкл безцитокиновым TCGM. Облученные донорные клетки высевали в соответствии со схемой планшета по 150 000 клеток на 150 мкл на лунку. Для контроля потока по 50 000 клеток от одного донора и хозяина помещали вместе. Объем во всех лунках заполняли до 200 мкл TCGM без цитокинов.

[00520] На день 5 после совместного культивирования половину среды (~100 мкл)

из каждой лунки заменяли свежей средой (TCGM без цитокинов).

[00521] На день 8 после совместного культивирования планшет для анализа окрашивали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Для окрашивания планшет центрифугировали при 600xg в течение 3 минут, встряхивали для удаления среды и добавляли по 100 мкл 1:100 v/v раствора блокатора Fc (Biolegend, кат. № 422302) в буфер FACS в каждую лунку. Клетки ресуспендировали в блокаторе Fc и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Коктейль антител готовили таким образом, чтобы каждое антитело присутствовало в разведении 1:100 v/v, и 100 мкл этой смеси антител добавляли в каждую лунку к образцу. Планшет защищали от света, накрывая алюминиевой фольгой, и инкубировали при 2-8 °С в течение 20-30 минут. После окрашивания планшет центрифугировали при 600xg в течение 3 минут, встряхивали для удаления среды и промывали 200 мкл буфера FACS. Планшет снова промывали и клеточный осадок ресуспендировали в 70 мкл раствора 1:200 v/v красителя для определения жизнеспособности 7-AAD (BD Pharmingen, кат. № 51-68981E). Неокрашенные лунки ресуспендировали в 70 мкл буфера FACS. Планшет запускали в быстром режиме (60 секунд на лунку) на проточном цитометре Cytotflex. Результаты, продемонстрированные в **Таблицах 29А и 29В** и на **Фигурах 8А и 8В** (на Фигурах продемонстрированы подмножества данных для дикого типа, В2М КО и HLA-A+СІТА DKO), указывающие на то, что клетки HLA-A+СІТА DKO индуцируют минимальные CD4 и CD8 ответы у аллогенного хозяина (совпадающего по HLA-B и C), которые были сопоставимы с ответом, вызванным клетками В2М+СІТА DKO. Результаты для каждой группы были нормализованы к результатам пролиферации 4х группы хозяев для соответствующего хозяина.

[00522] Таблица 28 - Генотипы доноров Т-клеток и хозяев PBMC

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
<b>Донор Т-клеток и аутологичный хозяин</b>	A*02:01:01G, 03:01:01G	B*07:02:01G	C*07:02:01G	DRB1*15:01:01G, DRB5*01:01:01G	DQA1*01:02:01G, DQB1*06:02:01G	DPA1*01:03:01G, 02:07:01G, , DPB1*04:01:01G, 19:01:01G
<b>Хозяин, совпадающий по В, С</b>	A*02:01:01G	B*07:02:01G, 44:02:01G	C*05:01:01G, 07:02:01G	DRB1*13:01:01G, 15:01:01G, DRB3*01:01:02G, DRB5*01:01:01G	DQB1*06:02:01G, 06:03:01G, DQA1*01:02:01G, 01:03:01G	DPB1*02:01:02G, 04:02:01G, , DPA1*01:03:01G

				01		
<b>хозяин, несовпа дающи й по HLA</b>	A*11:01:0 1G, 24:02:01G	B*40:01:0 1G	C*03:04:0 1G	DRB1*08:01: 01G, 13:02:01G, DRB3*03:01: 01G	DQB1*04:02: 01G, 06:04:01G	DPB1*03: 01:01G, 05:01:01G

[00523] Таблица 29А - Проллиферация CD4+ Т-клеток хозяина

Группа	Аутологичный хозяин		Аллогенный хозяин		Хозяин положительного контроля	
	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации
WT	-13,76	3,05	5,93	1,72	39,07	3,68
B2M KO	-13,50	2,66	-3,22	5,10	42,47	3,20
СПТА KO	-12,62	4,27	-7,00	5,54	-8,83	14,93
B2M+СПТА KO	-11,98	2,76	-5,15	5,21	-14,20	4,64
HLA-A KO	-9,14	7,96	7,67	12,41	41,83	5,01
HLA-A+СПТА KO	-11,33	2,03	-3,00	4,47	-3,97	6,57

[00524] Таблица 29В - Проллиферация CD8+ Т-клеток хозяина

Группа	Аутологичный хозяин		Аллогенный хозяин		Хозяин положительного контроля	
	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации
WT	7,53	6,95	35,71	12,28	74,00	1,42
B2M KO	-8,87	3,75	20,41	0,95	31,97	11,70
СИТА KO	1,43	5,24	6,17	4,89	56,07	8,53
B2M+СИТА KO	9,63	14,50	-0,05	4,59	0,47	5,23
HLA-A KO	22,40	23,65	25,31	16,59	71,83	2,25
HLA-A+СИТА KO	17,57	12,00	5,14	2,88	58,13	7,02

**Пример 12: Последовательная доставка множества композиций LNP для множественных нарушений и вставок генов**

[00525] Т-клетки конструировали с серией генных нарушений и вставок. Клетки от здорового донора обрабатывали последовательно четырьмя композициями LNP, при этом каждая композиция LNP содержала mPHK, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 802) и sgPHK, нацеленную на TRAC (G013006) (SEQ ID NO: 243), TRBC (G016239) (SEQ ID NO: 247), СИТА (G013675) (SEQ ID NO: 246) или HLA-A (G018995) (sgPHK, содержащая SEQ ID NO: 13, как продемонстрировано в Таблице 2). Композиции LNP составляли в соответствии с Группами, указанными в Таблице 30, либо с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 35:47,5:15:2,5 (Группы 1 и 2), соответственно, либо с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:35:10:1,5 (Группа 3) соответственно в указанных дозах. Группы 1 и 2 различаются по концентрации LNP. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату PHK (N:P) около 6 и соотношением gPHK к mPHK 1:2 по массе. Трансгенный WT1, нацеленный на TCR, был сайт-специфически интегрирован в сайт разреза TRAC путем доставки матрицы гомологически направленной репарации с применением AAV. Композиции LNP готовили каждый день и доставляли в Т-клетки, как описано в Таблице 30.

**12.1. Приготовление Т-клеток**

[00526] Т-клетки трех HLA-A\*02:01+ серотипов выделяли из продуктов лейкофереза двух здоровых доноров (STEMCELL Technologies). Т-клетки выделяли с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя и криоконсервировали с помощью Cryostor CS10 (STEMCELL Technologies, кат. № 07930). За день до начала редактирования Т-клеток, клетки размораживали и оставляли на ночь в среде для активации Т-клеток (TCAM: CTS OpTmizer Thermofisher №A3705001) с добавлением 2,5% сыворотки АВ человека (Gemini №100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher №35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher №15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech №200-02), IL-7 (Peprotech №200-07), и IL-15 (Peprotech №200-15).

## 12.2 Обработка LNP и размножение Т-клеток

[00527] Композиции LNP размораживали и разбавляли каждый день в среде, содержащей ApoE, и доставляли к Т-клеткам следующим образом.

[00528] Таблица 30 - Порядок редактирования Т-клеточного конструирования

Группа	День 1 Редактирование (LNP состав и конечная концентрация)	День 2 Редактирование (LNP состав и конечная концентрация)	День 3 Редактирование (LNP состав и конечная концентрация)	День 4 Редактирование (LNP состав и конечная концентрация)
Группа 1	СПТА КО (Липид А: 35:47,5:15:2,5, 0,65 мкг/мл)	HLA-A КО (Липид А: 35:47,5:15:2,5, 0,65 мкг/мл)	TRAC KI (Липид А: 35:47,5:15:2,5 , 0,65 мкг/мл)	TRBC КО (Липид А: 35:47,5:15:2,5, 0,65 мкг/мл)
Группа 2	СПТА КО (Липид А: 35:47,5:15:2,5, 2,5 мкг/мл)	HLA-A КО (Липид А: 35:47,5:15:2,5, 2,5 мкг/мл)	TRAC KI (Липид А: 35:47,5:15:2,5 , 2,5 мкг/мл)	TRBC КО (Липид А: 35:47,5:15:2,5, 2,5 мкг/мл)
Группа 3	СПТА КО (Липид А: 50:35,5:10:1,5, 2,5 мкг/мл)	HLA-A КО (Липид А: 50:35,5:10:1,5, 2,5 мкг/мл)	TRAC KI (Липид А: 50:35,5:10:1,5 , 2,5 мкг/мл)	TRBC КО (Липид А: 50:35,5:10:1,5, 2,5 мкг/мл)
Неотредактированные	Нет	Нет	Нет	Нет

[00529] В день 1, композиции LNP, указанные в Таблице 30, инкубировали в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности  $2 \times 10^6$  клеток/мл в TCAM с

разведением 1:50 реагента человека T Cell TransAct (Miltenyi, 130-111-160). Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы на ночь.

[00530] В день 2, композиции LNP, как указано в **Таблице 30**, инкубировали в концентрации 25 мкг/мл в TCAM, содержащей 20 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, 350-02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 10:1.

[00531] В день 3, как указано в **Таблице 30**, композиции TRAC-LNP инкубировали в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы. Затем к каждой группе добавляли WT1 AAV при показателе MOI  $3 \times 10^5$  GC/клетку. В каждую группу добавляли ингибитор ДНК-ПК «Соединение 1» в концентрации 0,25 мкМ.

[00532] На день 4, композиции LNP, указанные в **Таблице 30**, инкубировали в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы.

[00533] На день 5-13, Т-клетки переносили в 24-луночный планшет GREX (Wilson Wolf, 80192) в среде для размножения Т-клеток (TCEM: CTS OpTmizer, Thermofisher №A3705001), дополненной 5% сывороткой АВ человека (Gemini №100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher №35050061), 10 mM HEPES (Thermofisher №15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech №200-02), IL-7 (Peprotech #200-07), IL-15 (Peprotech №200-15) и размножали в соответствии с протоколами производителей. Вкратце, Т-клетки размножали в течение 8 дней с заменой среды каждые 2-3 дня.

[00534] После размножения отредактированные Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для определения нокаута HLA-A\*02:01, нокаута HLA-DR-DP-DQ посредством нокаута СИТА, вставки WT1-TCR ( $CD3^+Vb8^+$ ) и процентной доли клеток, экспрессирующих остаточный эндогенный ( $CD3^+Vb8^-$ ). Т-клетки инкубировали со коктейлем антител, нацеленным на следующие молекулы: Vb8 (Biolegend, кат. № 348104), HLA-A2 (Biolegend, кат. № 343320), HLA-DRDPDQ (Biolegend, кат. № 361712), CD4 (Biolegend, кат. № 300538), CD8 (Biolegend, кат. № 301046), CD3 (Biolegend, кат. № 317336), CCR7 (Biolegend, кат. № 353214), CD62L (Biolegend, кат. № 304820), CD45RA (Biolegend, кат. № 304134), CD45RO (Biolegend, кат. № 304230), CD56 (Biolegend, кат. № 318328), и Viakrome (Beckman Coulter, кат. № C36628). Затем клетки промывали, обрабатывали с помощью прибора Cytoflex LX (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки гейтировали по размеру и статусу CD4/CD8, прежде чем были определяли показатели редактирования и вставки. Процент клеток, экспрессирующих соответствующие белки на клеточной поверхности после последовательного конструирования Т-клеток,

продемонстрирован в **Таблице 31** и на **Фигуре 12А** для CD8<sup>+</sup> Т-клеток соответственно. Процент Т-клеток со всеми предполагаемыми редактурами (вставка WT1-TCR в сочетании с нокаутом HLA-A и СИТА) определяли как % CD3<sup>+</sup>Vb8<sup>+</sup> HLA-A<sup>-</sup>HLA-DRDPDQ<sup>-</sup>, что продемонстрировано на **Фигуре 12В**. Высокие уровни нокаута HLA-A и СИТА, а также вставки WT1-TCR наблюдались в отредактированных образцах из всех групп, дающих >75% полностью отредактированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Более низкая доза (0,65 мкг/мл), применяемая для композиции липида А 35:15:47,5:2,5, продемонстрировала такую же эффективность в редактировании Т-клеток для всех целей, что и состав липида А 50:10:35,5:1,5 с более высокой дозой (2,5 мкг/мл).

[00535] **Таблица 31. Показатели редактирования в CD8<sup>+</sup> Т-клетках**

Редактированные	Группа 1			Группа 2			Группа 3			Неотредактированные		
	Среднее	S D	N	Среднее	S D	N	Среднее	S D	N	Среднее	SD	N
Полностью отредактированные (Vb8 <sup>+</sup> ,CD3 <sup>+</sup> , HLA-DRDPDQ <sup>-</sup> ,HLA-A*02:01-)	79,6	4,7	3,0	80,5	4,2	3,0	76,8	1,9	3,0	0,2	0,2	3,0
HLA-A KO (HLA-A*02:01-)	97,1	3,6	3,0	96,4	4,7	3,0	96,4	4,4	3,0	3,6	3,8	3,0
СИТА KO (HLA-DRDPDQ-)	99,3	0,4	3,0	97,7	2,1	3,0	98,7	0,9	3,0	н/д	н/д	н/д
TCR KO (CD3-)	99,3	0,1	3,0	99,7	0,1	3,0	98,7	1,1	3,0	1,8	1,4	3,0
Вставка TCR WT1 (Vb8 <sup>+</sup> )	82,6	2,0	3,0	85,6	0,8	3,0	81,1	2,1	3,0	0,2	0,2	3,0

**Пример 13. Цитотоксическая чувствительность сконструированных Т-клеток**

[00536] Сконструированные Т-клетки анализировали на цитотоксическую чувствительность при нацеливании на них клеток-натуральных киллеров (NK).

[00537] NK-клетки (Stemcell Technologies) размораживали и ресуспендировали при

концентрации клеток  $1 \times 10^6$  клеток/мл в среде для роста Т-клеток (TCGM), состоящей из OpTmizer TCGM, и дополнительно добавляли 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Клетки инкубировали при 37 °С в течение 24 часов.

[00538] Через 24 часа после размораживания НК-клетки метили 0,5 мкМ Cell Trace Violet (CTV) следующим образом: флакон CTV (набор CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, для проточной цитометрии, кат. № C34571) восстанавливали в DMSO из набора для получения рабочей концентрации 5 мМ. Два мкл рабочего раствора CTV разбавляли 18 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) (Corning, кат. № 21-040-CV) до получения концентрации 0,5 мМ. НК-клетки центрифугировали при 500 x g в течение 5 минут, среду аспирировали и клетки ресуспендировали в PBS в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл, так что конечная концентрация красителя CTV составляла 0,5 мкМ. Клетки смешивали с раствором красителя CTV и инкубировали при 37°C в течение 20 минут. Несвязанный краситель гасили добавлением TCGM и инкубировали в течение 5 минут. Клетки центрифугировали при 500 x g в течение 5 минут. Клетки ресуспендировали в TCGM с добавлением 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15) в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Для тестирования диапазона соотношений эффектор:мишень (Е:Т), меченые CTV НК-клетки помещали в аликвоты в 100 мкл среды в 6-моментном 2-кратном серийном разведении, при этом максимальное количество клеток составляло  $2 \times 10^5$  клеток. Образцы, содержащие только среду, были включены в качестве отрицательного контроля.

[00539] Т-клетки конструировали с применением BC22n и UGI мРНК с применением G023523 (SEQ ID NO: 1016), нацеленного на HLA-A, в качестве тестируемого образца и с G023519 (SEQ ID NO: 816), направленного на B2M, в качестве положительного контроля для уничтожения посредством НК.

[00540] Т-клетки готовили из лейкопака с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stem Cell Technology, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя. Т-клетки криоконсервировали в среде для замораживания Cryostor CS10 (кат. № 07930) для будущего применения. После размораживания Т-клетки высевали с плотностью  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл в среду T-cell R10, состоящую из RPMI 1640 (Corning, кат. № 10-040-CV), содержащую 10% (v/v) эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ Glutamax (Gibco, кат. № 35050-061), 22 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ заменимых аминокислот (Corning, кат. № 25-025-C1), 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ буфера HEPES, 1% пенициллин-стрептомицина, плюс 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02). Т-клетки активировали с применением Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco, кат. № 11141D). Клетки размножали в среде Т-клеток в течение 72 часов перед трансфекцией мРНК.

[00541] Растворы, содержащие мРНК, кодирующую BC22n (SEQ ID NO: 972) или UGI (SEQ ID NO: 1005), готовили в стерильной воде. 50 мкМ нацеливающихся sgРНК

удаляли из их планшетов для хранения и денатурировали в течение 2 минут при 95°C перед охлаждением на льду. Через семьдесят два часа после активации Т-клетки собирали, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации  $12,5 \times 10^6$  Т-клеток/мл в буфере для электропорации РЗ (Lonza). Для каждой лунки для электропорации  $1 \times 10^5$  Т-клеток смешивали с 200 нг редактора mPНК (BC22n), 200 нг mPНК UGI и 20 пмоль sgPНК в конечном объеме 20 мкл буфера для электропорации РЗ. Эту смесь подвергали электропорации с применением импульсного кода производителя.

[00542] Неотредактированные Т-клетки анализировали в качестве отрицательного контроля на уничтожение посредством НК. Другие контроли для проточной цитометрии включали НК-клетки, меченные CTV, без Т-клеток; «неокрашенный» образец, объединяющий немеченые НК-клетки и Т-клетки; и смесь 1:1 немеченых и не убитых нагреванием НК-клеток и Т-клеток, окрашенных 7AAD. Т-клетки ресуспендировали при плотности  $2 \times 10^5$  клеток в TCGM, состоящем из OpTmizer TCGM, и дополнительно добавляли 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Двадцать тысяч Т-клеток добавляли в каждую лунку с НК-клетками и контрольными средами. Клетки инкубировали при 37 °C в течение 24 часов.

[00543] Через 24 часа половина объема клеток из лунки, подвергнутой тепловому умерщвлению LD, была убита нагреванием и перенесена обратно в ту же лунку в планшете для анализа. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в 80 мкл раствора 1:200 v/v 7-AAD (BD Biosciences, кат. № 559925) в буфере FACS (PBS+2% FBS (Gibco, кат. № A31605-02) + 2 mM EDTA (Invitrogen, кат. № 15-575-020)). Данные по специфическому лизису Т-клеток получали с помощью проточной цитометрии на приборе Cytotflex LX (Beckman Coulter) и анализировали с применением пакета программного обеспечения FlowJo. Сначала были нарисованы гейты на CTV-отрицательной популяции, чтобы гейтировать НК-клетки, затем гейты на синглетах, после чего были нарисованы гейты на 7-AAD-отрицательной популяции, чтобы гейтировать живые Т-клетки. Процент лизиса Т-клеток рассчитывали путем вычитания процента живых клеток из 100. Т-клетки, отредактированные с применением G023523, направленного на BC22n и HLA-A (SEQ ID NO: 1016), были защищены от опосредованной НК-клетками цитотоксичности, как продемонстрировано в **Таблице 32** и на **Фиг. 13**.

[00544] **Таблица 32 - Средний процент лизиса сконструированных Т-клеток, подвергшихся воздействию НК-клеток, совпадающих по HLA-B и C**

E:T	Неотредактированные			G023519 B2M			G023523 HLA-A		
	Среднее	SD	n	Среднее	SD	n	Среднее	SD	n
10	19,65	2,33	2	69,60	4,81	2	22,23	1,10	3
5	18,80	1,59	3	61,10	0,85	2	21,35	0,49	2
2,5	22,27	6,62	3	47,95	0,49	2	22,10	1,27	2
1,25	18,47	1,27	3	39,20	2,98	3	21,00	0,81	3

0,63	19,30	0,66	3	30,20	н/д	1	19,75	0,35	2
0,31	20,70	5,02	3	40,60	н/д	1	20,27	1,67	3
0	19,77	2,01	3	26,57	2,73	3	18,30	1,41	3

**Пример 14: Редактирование Т-клеток человека с помощью BC22п, UGI и 91-мерных sgРНК**

[00545] Эффективность редактирования оснований 91-мерной sgРНК, оцененной по нокауту рецептора, сравнивали с эффективностью 100-мерного формата sgРНК с той же направляющей последовательностью.

[00546] Тестируемая 91-мерная sgРНК включает направляющую последовательность из 20 нуклеотидов (обозначена буквой N) и следующий направляющий каркас: mN\*mN\*mN\*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGmUmGmC\*mU (SEQ ID NO: 1003), где A, C, G, U и N представляют собой аденин, цитозин, гуанин, урацил и любой рибонуклеотид соответственно, если не указано иное. Символ m указывает на модификацию 2'О-метила, а \* указывает на фосфоротиоатную связь между нуклеотидами. Немодифицированные и модифицированные версии направляющих представлены в Таблице 6 (Таблица последовательностей).

**Пример 14.1. Приготовление Т-клеток**

[00547] Компоненты афереза от здоровых доноров получали коммерческим путем (Hemacare), клетки промывали, повторно суспендировали в буфере CliniMACS® PBS/EDTA (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) и обрабатывали в устройстве MultiMACS™ Cell 24 Separator Plus (Miltenyi Biotec). Т-клетки выделяли посредством положительной селекции с помощью набора Straight from Leukopak® CD4/CD8 MicroBead для человека (Miltenyi Biotec, кат. № 130-122-352). Т-клетки разделяли на аликвоты и криоконсервировали для будущего применения в Cryostor® CS10 (StemCell Technologies, кат. № 07930).

[00548] Компоненты афереза от здоровых доноров получали коммерческим путем (Hemacare), клетки промывали, повторно суспендировали в буфере CliniMACS® PBS/EDTA (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) и обрабатывали в устройстве MultiMACS™ Cell 24 Separator Plus (Miltenyi Biotec). Т-клетки выделяли посредством положительной селекции с помощью набора Straight from Leukopak® CD4/CD8 MicroBead для человека (Miltenyi Biotec, кат. № 130-122-352). Т-клетки разделяли на аликвоты и криоконсервировали для будущего применения в Cryostor® CS10 (StemCell Technologies, кат. № 07930).

[00549] После размораживания Т-клетки высевали с плотностью  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл в среде для роста Т-клеток (TCGM), состоящей из CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM и T Cell Expansion Supplement (ThermoFisher кат. № A1048501), 5% сыворотки АВ человека (GeminiBio, кат. № 100-512) 1X пенициллин-стрептомицина, 1X

Glutamax, 10 mM HEPES, 200 Ед/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. № 200-15). Т-клетки выдерживали в этой среде в течение 24 часов, после чего их активировали реагентом T Cell TransAct™ для человека (Miltenyi, кат. № 130-111-160), добавленным в соотношении 1:100 по объему. Т-клетки активировали в течение 48 часов до обработки LNP.

**Пример 14.2. Обработка LNP и размножение Т-клеток**

[00550] Через 48 часов после активации, Т-клетки собирали, центрифугировали при 500 g в течение 5 минут и ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$  Т-клеток/мл в среде для посева Т-клеток (TCPM): версия без сыворотки TCGM, содержащая 400 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 10 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 10 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. № 200-15). 50 мкл Т-клеток в TCPM ( $5 \times 10^4$  Т-клеток) добавляли на лунку для обработки в плоскодонные 96-луночные планшеты.

[00551] LNP готовили, как описано в Примере 1, в соотношении 35:47,5:15:2,5 (липид А/холестерин/DSPC/PEG2k-DMG). LNP составляли с молярным соотношением липидамина к РНК-фосфату (N:P), равным примерно 6. LNP инкапсулировали один вид РНК, либо sgРНК, как описано в Таблице 34, mРНК BC22n (SEQ ID №: 972), либо UGI mРНК (SEQ ID № 1005).

[00552] **Таблица 33-100-мерные и 91-мерные sgРНК.**

Целевой ген	100-мерные	91-мерные
HLA-A	G021209 (SEQ ID NO: 381)	G023523 (SEQ ID NO: 1016)

[00553] Перед обработкой Т-клеток, LNP, инкапсулирующие sgРНК, разводили до 6,64 мкг/мл в среде для обработки Т-клеток (TCTM): вариант TCGM, содержащий 20 мкг/мл rhApoE3 в отсутствие интерлейкинов 2, 5 или 7. Эти LNP инкубировали при 37°C в течение 15 минут и серийно разбавляли 1:4 с применением TCTM, что приводило к 8-моментной серии разведений в диапазоне от 6,64 мкг/мл до нуля. Аналогично, LNP, нагруженные либо mРНК BC22n (SEQ ID NO: 972), либо mРНК UGI (SEQ ID NO: 1005) разбавляли в TCTM до 3,32 и 1,67 мкг/мл соответственно, инкубировали при 37°C в течение 15 минут и смешивали 1:1 по объему с LNP sgРНК, серийно разбавленными на предыдущем этапе. Наконец, 50 мкл полученной смеси добавляли к Т-клеткам в 96-луночных планшетах в соотношении 1:1 по объему. Т-клетки инкубировали при 37°C в течение 24 часов, после чего их собирали, центрифугировали при 500 g в течение 5 минут, ресуспендировали в 200 мкл TCGM и возвращали в инкубатор.

**Пример 14.4. Оценка нокаута рецепторов с помощью проточной цитометрии**

[00554] Набор sgРНК, нацеленных на ген HLA-A, оценивали с помощью проточной

цитометрии вместо NGS из-за гиперполиморфной природы локуса HLA-A.

[00555] Через семь дней после обработки LNP, Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки нокаута рецепторов. Т-клетки инкубировали с фиксируемым красителем для определения жизнеспособности (Beckman Coulter, кат. № С36628) и коктейлем антител, нацеленных на HLA-A2 (Biolegend, кат. № 343304). Затем клетки промывали, анализировали на приборе Cytotflex LX (Beckman Coulter) с помощью пакета программ FlowJo. Перед определением экспрессии каких-либо маркеров Т-клетки гейтировали по размеру, жизнеспособности и позитивности относительно CD8. Полученные данные были нанесены на GraphPad Prism v. 9.0.2 и проанализированы с применением нелинейной регрессии с переменным наклоном (четыре параметра).

[00556] Как продемонстрировано в **Таблицах 34 и 35** и на **Фиг. 14**, протестированная 91-мерная sgРНК превосходила 100-мерную версию. Мишени с более низкой активностью (т. е. с более высокой EC50) в 100-мерном формате (HLA-A), по-видимому, получают наибольшую пользу от применения 91-мерных sgРНК.

**[00557] Таблица 34. Средний процент CD8+ Т-клеток, которые являются негативными в отношении поверхностных рецепторов HLA-A2 после обработки sgРНК, нацеленной на HLA-A, в 100-мерном или 91-мерном форматах.**

sgРНК (нг)	HLA-A (HLA-A2-)			
	100-мерные		91-мерные	
	Среднее	SD	Среднее	SD
166,00	98,8	0,1	99,6	0,2
41,50	93,6	0,8	99,2	0,4
10,38	70,2	1,0	93,8	1,4
2,59	34,0	2,1	63,2	3,0
0,65	12,1	1,3	28,5	1,2
0,16	3,3	0,2	8,3	0,6
0,04	0,9	0,3	2,6	0,5
0,00	0,1	0,0	0,3	0,2

**[00558] Таблица 35 - Количество (пмоль) sgРНК, которое приводит к 50% потере экспрессии рецептора на поверхности CD8+ Т-клеток (EC50). Крайний правый столбец демонстрирует кратное увеличение эффективности, достигаемое 91-мерной sgРНК, по сравнению со 100-мерной sgРНК с той же направляющей последовательностью.**

Целевой ген	100-мерные		91-мерные		EC50 сдвиг (100- мерные/91- мерные)
	sgРНК ID	EC50 (пмоль)	sgРНК ID	EC50 (пмоль)	

HLA-A	G021209	0,150	G023523	0,053	2,81
-------	---------	-------	---------	-------	------

**Пример 15: Корреляция между редактированием HLA-A с помощью NGS и КО белка посредством проточной цитометрии**

[00559] Замороженные Т-клетки от трех доноров Т-клеток, первые гетерозиготные по HLA-A\*02:01:01G, 03:01:01G, вторые гомозиготные по HLA-A\*02:01:01G и третьи гомозиготные по HLA-A\*03:01:01G, размораживали при концентрации клеток  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл в среде для роста Т-клеток (TCGM), состоящей из среды CTS OpTmizer (Gibco, кат. № A10485-01) с 2,5% сыворотки GemCell Plus Human AB Serum (Gemini, кат. № 100-512) и по 10 мл GlutaMAX 100X (Gibco, кат. №35050061), HEPES (Gibco, кат. № 15630080) и Pen/Strep (Gibco, кат. № 15140-122), дополнительно дополненной 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. № 200-07), 5 нг/мл. мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15) и оставляли на ночь в инкубаторе при 37 ° С.

[00560] Через двадцать четыре (24) часа после размораживания клетки активировали с помощью T-cell TransAct (Miltenyi Biotec, кат. № 130-111-160) в разведении 1:100 при 37 °С в течение 24 часов. Клетки высевали в количестве  $1 \times 10^5$  клеток на 100 мкл на лунку, а затем трансфицировали серийными разведениями направляющих, составленных в LNP, начиная с 5 мкг/мл в качестве самой высокой дозы и со снижением до 0,04 мкг/мл.

[00561] На День 5 после трансфекции, клетки каждого донора центрифугировали и собирали для анализа NGS. Геномную ДНК экстрагировали с применением раствора для экстракции ДНК QuickExtract. PCR1 проводили для амплификации специфических для гена последовательностей, тогда как PCR2 проводили для амплификации общего адаптера для секвенирования (NEB кат. № N0494). Образцы PCR очищали с помощью AMPure XP Beads (Beckman Coulter, кат. № A63881) перед секвенированием с помощью NGS.

[00562] На День 8 после трансфекции планшет для анализа окрашивали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Для окрашивания планшет центрифугировали при 500 x g в течение 5 минут, встряхивали для удаления среды и добавляли 100 мкл раствора блокатора Fc 1:100 v/v (Biolegend, кат. № 422302) в буфере FACS в каждую лунку. Клетки ресуспендировали в блокаторе Fc и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Смесь антител была приготовлена таким образом, чтобы каждое антитело (моноклональное антитело HLA-A2 (BB7.2), APC, eBioscience, кат. № 17-9876-42 и моноклональное антитело HLA-A3 (GAR.A3), PE, № 12-5754-42) присутствовало в разведении 1:100 по объему, и 100 мкл этой смеси антител добавляли в каждую лунку для образца. Планшет защищали от света, накрывая алюминиевой фольгой, и инкубировали при 2-8 ° С в течение 20-30 минут. После окрашивания планшет центрифугировали при 600 x g в течение 3 минут, встряхивали для удаления среды и промывали 200 мкл буфера FACS. Планшет снова промывали и осадки клеток ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS. Планшет анализировали в быстром режиме (60 секунд на лунку) на проточном цитометре Cytoflex. Анализ данных проводили

на FlowJo.

[00563] Высокая корреляция между нокаутом белка и редактированием наблюдалась у всех трех доноров и для трех уникальных наборов праймеров, как продемонстрировано в Таблицах 36-38 и на Фиг. 15А-15С.

**Таблица 36: Корреляция редактирования гена HLA-A с нокаутом белка у Донора А**

Концентрация LNP	NGS Праймер 1 (% редактирования)	NGS Праймер 2 (% редактирования)	NGS Праймер 3 (% редактирования)	Белок КО
5	92,7	91,9	93,5	89,15
2,5	93,6	94,4	92,7	88,35
1,25	93,2	94	92,8	87,55
0,63	72,9	79,3	74,3	68,45
0,31	41,8	41,8	46,1	27,6
0,17	12,9	18,5	15,8	7,23
0,08	4,7	7,8	1,9	1,44
0,04	2	1,7	6,8	0,30

**Таблица 37: Корреляция редактирования гена HLA-A с нокаутом белка у Донора В**

Концентрация LNP	NGS Праймер 1 (% редактирования)	NGS Праймер 2 (% редактирования)	NGS Праймер 3 (% редактирования)	Белок КО
5	97,9	97,5	97,9	92,3
2,5	97,2	96,9	97,2	92,6
1,25	96,4	96,1	96,5	91,25
0,63	82,1	81,9	82	71,35
0,31	42,4	43,6	44,7	24,5
0,17	20,3	20,2	21,2	5,65
0,08	7,4	8,6	8,4	0,94
0,04	2,1	2,7	2,3	0,15

**Таблица 38: Корреляция редактирования гена HLA-A с нокаутом белка у Донора С**

Концентрация LNP	NGS Праймер 1 (% редактирования)	NGS Праймер 2 (% редактирования)	NGS Праймер 3 (% редактирования)	Белок КО
------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------

5	96,6	95,3	96,6	99,295
2,5	97,3	97,4	97,3	99,165
1,25	95,7	95,8	97,4	98,9
0,63	77,9	78,1	79,4	91
0,31	37,7	38,5	37,7	54,25
0,17	16,3	16	16,7	23,35
0,08	7	6,8	6,5	9,22
0,04	3,1	2,5	2,6	3,108

### **Пример 16. Дополнительные варианты осуществления**

[00564] Следующие пронумерованные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают дополнительную поддержку и описание вариантов осуществления согласно настоящего изобретения.

[00565] Вариант осуществления 1 представляет собой сконструированную клетку человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащей генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00566] Вариант осуществления 2 представляет собой сконструированную клетку человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: (a) chr6:29942854-chr6:29942913 и (b) chr6:29943518-chr6: 29943619; при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00567] Вариант осуществления 3 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что в клетке снижена или устранена экспрессия по меньшей мере одного аллеля HLA-A, выбранного из: HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 и HLA-A24.

[00568] Вариант осуществления 4 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A1.

[00569] Вариант осуществления 5 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A2.

[00570] Вариант осуществления 6 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A3.

[00571] Вариант осуществления 7 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что

в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A11.

[00572] Вариант осуществления 8 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что в клетке снижена или устранена экспрессия HLA-A24.

[00573] Вариант осуществления 9 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942864-chr6: 29942903.

[00574] Вариант осуществления 10 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-chr6: 29943609.

[00575] Вариант осуществления 11 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; и chr6:29942883-29942903.

[00576] Вариант осуществления 12 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609.

[00577] Вариант осуществления 13 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942876-29942897.

[00578] Вариант осуществления 14 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-chr6:29943550.

[00579] Вариант осуществления 15 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, и chr6:29942877-29942897.

[00580] Вариант осуществления 16 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, и chr6:29943530-29943550.

[00581] Вариант осуществления 17 представляет собой сконструированную клетку человека, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046.

[00582] Вариант осуществления 18 представляет собой сконструированную клетку человека, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация содержит индел, замену С на Т, или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046.

[00583] Вариант осуществления 19 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 17-18, отличающуюся тем, что клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00584] Вариант осуществления 20 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 17-19, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, или по меньшей мере 10 последовательных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат, или при этом генетическая модификация включает по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00585] Вариант осуществления 21 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 17-20, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00586] Вариант осуществления 22 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 17-21, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену С на Т или по меньшей мере одну замену А на G в пределах указанных геномных координат.

[00587] Вариант осуществления 23 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов,

которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: (a) chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046, chr6:29934330-29934350, chr6:29943115-29943135, chr6:29943135-29943155, chr6:29943140-29943160, chr6:29943590-29943610, chr6:29943824-29943844, chr6:29943858-29943878, chr6:29944478-29944498, и chr6:29944850-29944870; (b) chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29944026-29944046; (c) chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29944026-29944046; (d) chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; и chr6:29942883-29942903; (e) chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; и chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609; (f) chr6:29942864-29942884, chr6:29942876-29942896, и chr6:29942877-29942897; (g) chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, и chr6:29943530-29943550; (h) chr6:29945290-29945310, chr6:29945296-29945316, и chr6:29945297-29945317, chr6:29945300-29945320; (i) chr6:29890117-29890137, chr6:29927058-29927078, chr6:29934330-29934350, chr6:29942541-29942561, chr6:29942542-29942562, chr6:29942543-29942563, chr6:29942543-29942563, chr6:29942550-29942570, chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, chr6:29942876-29942896, chr6:29942877-29942897, chr6:29942883-29942903, chr6:29943062-29943082, chr6:29943063-29943083, chr6:29943092-29943112, chr6:29943115-29943135, chr6:29943118-29943138, chr6:29943119-29943139, chr6:29943120-29943140, chr6:29943126-29943146, chr6:29943128-29943148, chr6:29943129-29943149, chr6:29943134-29943154, chr6:29943134-29943154, chr6:29943135-29943155, chr6:29943136-29943156, chr6:29943140-29943160, chr6:29943142-29943162, chr6:29943143-29943163, chr6:29943188-29943208, chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, chr6:29943530-29943550, chr6:29943536-29943556, chr6:29943537-29943557, chr6:29943538-29943558, chr6:29943549-29943569, chr6:29943556-29943576, chr6:29943589-29943609, chr6:29943590-29943610, chr6:29943590-29943610, chr6:29943600-29943620, и chr6:29943601-29943621,

chr6:29943602-29943622, chr6:29943603-29943623, chr6:29943774-29943794,  
 chr6:29943779-29943799, chr6:29943780-29943800, chr6:29943822-29943842,  
 chr6:29943824-29943844, chr6:29943857-29943877, chr6:29943858-29943878,  
 chr6:29943859-29943879, chr6:29943860-29943880, chr6:29944026-29944046,  
 chr6:29944077-29944097, chr6:29944078-29944098, chr6:29944458-29944478,  
 chr6:29944478-29944498, chr6:29944597-29944617, chr6:29944642-29944662,  
 chr6:29944643-29944663, chr6:29944772-29944792, chr6:29944782-29944802,  
 chr6:29944850-29944870, chr6:29944907-29944927, chr6:29945024-29945044,  
 chr6:29945097-29945117, chr6:29945104-29945124, chr6:29945105-29945125,  
 chr6:29945116-29945136, chr6:29945118-29945138, chr6:29945119-29945139,  
 chr6:29945124-29945144, chr6:29945176-29945196, chr6:29945177-29945197,  
 chr6:29945177-29945197, chr6:29945180-29945200, chr6:29945187-29945207,  
 chr6:29945188-29945208, chr6:29945228-29945248, chr6:29945230-29945250,  
 chr6:29945231-29945251, chr6:29945232-29945252, chr6:29945308-29945328,  
 chr6:29945361-29945381, chr6:29945362-29945382, и chr6:31382543-31382563; (j)  
 chr6:29942815-29942835, chr6:29942816-29942836, chr6:29942817-29942837,  
 chr6:29942817-29942837, chr6:29942828-29942848, chr6:29942837-29942857,  
 chr6:29942885-29942905, chr6:29942895-29942915, chr6:29942896-29942916,  
 chr6:29942898-29942918, chr6:29942899-29942919, chr6:29942900-29942920,  
 chr6:29942904-29942924, chr6:29942905-29942925, chr6:29942912-29942932,  
 chr6:29942913-29942933, chr6:29943490-29943510, chr6:29943497-29943517,  
 chr6:29943498-29943518, chr6:29943502-29943522, chr6:29943502-29943522,  
 chr6:29943511-29943531, chr6:29943520-29943540, chr6:29943521-29943541,  
 chr6:29943566-29943586, chr6:29943569-29943589, chr6:29943569-29943589,  
 chr6:29943570-29943590, chr6:29943573-29943593, chr6:29943578-29943598,  
 chr6:29943585-29943605, chr6:29943589-29943609, chr6:29943568-29943588, и  
 chr6:29942815-29942835. (k) chr6:29942884-29942904, chr6:29943519-29943539,  
 chr6:29942863-29942883; (l) chr6:29943517-29943537, и chr6:29943523-29943543; (m)  
 chr6:29942845-29942869, chr6:29942852-29942876, chr6:29942865-29942889,  
 chr6:29942891-29942915, chr6:29942895-29942919, chr6:29942903-29942927,  
 chr6:29942904-29942928, chr6:29943518-29943542, chr6:29943525-29943549,  
 chr6:29943535-29943559, chr6:29943538-29943562, chr6:29943539-29943563,  
 chr6:29943547-29943571, chr6:29943547-29943571, chr6:29943548-29943572,  
 chr6:29943555-29943579, chr6:29943556-29943580, chr6:29943557-29943581,  
 chr6:29943558-29943582, chr6:29943559-29943583, chr6:29943563-29943587,  
 chr6:29943564-29943588, chr6:29943565-29943589, chr6:29943568-29943592,  
 chr6:29943571-29943595, chr6:29943572-29943596, chr6:29943595-29943619,  
 chr6:29943596-29943620, и chr6:29943600-29943624; (n) chr6:29942885-29942905,  
 chr6:29942895-29942915, chr6:29942896-29942916, chr6:29942885-29942905,  
 chr6:29942899-29942919, chr6:29942900-29942920, chr6:29942898-29942918,  
 chr6:29942904-29942924,

chr6:29943511-29943531, chr6:29943520-29943540, chr6:29943521-29943541,  
 chr6:29943529-29943549, chr6:29943566-29943586, chr6:29943568-29943588,  
 chr6:29943569-29943589, chr6:29943569-29943589, chr6:29943570-29943590,  
 chr6:29943573-29943593, chr6:29943578-29943598, chr6:29943585-29943605, и  
 chr6:29943589-29943609; или (о) chr6:29942469-29942489, chr6:29943058-29943078,  
 chr6:29943063-29943083, chr6:29943080-29943100, chr6:29943187-29943207,  
 chr6:29943192-29943212, chr6:29943197-29943217, chr6:29943812-29943832,  
 chr6:29944349-29944369, chr6:29944996-29945016, chr6:29945018-29945038, и  
 chr6:29945341-29945361, chr6:29945526-29945546.

[00588] Вариант осуществления 24 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854-chr6:29942913 и chr6:29943518-chr6:29943619.

[00589] Вариант осуществления 25 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29942876-29942897.

[00590] Вариант осуществления 26 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29943528-chr6:29943550.

[00591] Вариант осуществления 27 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29942864-29942884.

[00592] Вариант осуществления 28 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29942868-29942888.

[00593] Вариант осуществления 29 представляет собой сконструированную клетку

в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29942876-29942896.

[00594] Вариант осуществления 30 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29942877-29942897.

[00595] Вариант осуществления 31 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29942883-29942903.

[00596] Вариант осуществления 32 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29943126-29943146.

[00597] Вариант осуществления 33 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29943528-29943548.

[00598] Вариант осуществления 34 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29943529-29943549.

[00599] Вариант осуществления 35 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29943530-

29943550.

[00600] Вариант осуществления 36 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29943537-29943557.

[00601] Вариант осуществления 37 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29943549-29943569.

[00602] Вариант осуществления 38 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29943589-29943609.

[00603] Вариант осуществления 39 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат и chr6:29944026-29944046.

[00604] Вариант осуществления 40 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 23-39, отличающуюся тем, что геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00605] Вариант осуществления 41 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 23-40, отличающуюся тем, что геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00606] Вариант осуществления 42 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 23-41, отличающуюся тем, что геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 17, 19, 18 или 20 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00607] Вариант осуществления 43 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 23-41, отличающуюся тем, что система редактирования генов содержит эффекторную нуклеазу, подобную активатору

транскрипции (TALEN).

[00608] Вариант осуществления 44 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 23-41, отличающуюся тем, что система редактирования генов содержит нуклеазу "цинковые пальцы".

[00609] Вариант осуществления 45 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 23-41, отличающуюся тем, что система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00610] Вариант осуществления 46 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержит белок Cas9.

[00611] Вариант осуществления 47 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой *S. pyogenes* Cas9.

[00612] Вариант осуществления 48 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой *N. meningitidis* Cas9, необязательно Nme2Cas9.

[00613] Вариант осуществления 49 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой *S. thermophilus* Cas9.

[00614] Вариант осуществления 50 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой *S. aureus* Cas9.

[00615] Вариант осуществления 51 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой Cpf1 из *F. novicida*.

[00616] Вариант осуществления 52 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой Cpf1 из *Acidaminococcus* sp.

[00617] Вариант осуществления 53 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой Cpf1 из *Lachnospiraceae bacterium* ND2006.

[00618] Вариант осуществления 54 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой редактор оснований С на Т.

[00619] Вариант осуществления 55 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой редактор оснований А на G.

[00620] Вариант осуществления 56 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержит деаминазу АРОВЕС3А (А3А) и РНК-зависимую нуклеазу.

[00621] Вариант осуществления 57 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой Cas12a.

[00622] Вариант осуществления 58 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой CasX.

[00623] Вариант осуществления 59 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой Nme2Cas9.

[00624] Вариант осуществления 60 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой нуклеазу Mad7.

[00625] Вариант осуществления 61 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, отличающуюся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или ДНК-связывающий агент, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляет собой нуклеазу ARCUS.

[00626] Вариант осуществления 62 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 17-61, отличающуюся тем, что клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00627] Вариант осуществления 63 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B\*07:02; HLA-B\*08:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*35:01; HLA-B\*40:01; HLA-B\*57:01; HLA-B\*14:02; HLA-

B\*15:01; HLA-B\*13:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*38:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*44:03; HLA-B\*51:01; HLA-B\*49:01; HLA-B\*15:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*27:05; HLA-B\*35:03; HLA-B\*18:01; HLA-B\*52:01; HLA-B\*51:01; HLA-B\*37:01; HLA-B\*53:01; HLA-B\*55:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*35:02; HLA-B\*15:01; и HLA-B\*40:02.

[00628] Вариант осуществления 64 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C\*07:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*04:01 HLA-C\*03:04; HLA-C\*06:02; HLA-C\*08:02; HLA-C\*03:03; HLA-C\*06:02; HLA-C\*16:01; HLA-C\*12:03; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*15:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*03:04; HLA-C\*12:03; HLA-C\*02:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*12:02; HLA-C\*14:02; HLA-C\*06:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*03:03; HLA-C\*07:04; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*04:01; и HLA-C\*02:02.

[00629] Вариант осуществления 65 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B\*07:02; HLA-B\*08:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*35:01; HLA-B\*40:01; HLA-B\*57:01; HLA-B\*14:02; HLA-B\*15:01; HLA-B\*13:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*38:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*44:03; HLA-B\*51:01; HLA-B\*49:01; HLA-B\*15:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*27:05; HLA-B\*35:03; HLA-B\*18:01; HLA-B\*52:01; HLA-B\*51:01; HLA-B\*37:01; HLA-B\*53:01; HLA-B\*55:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*35:02; HLA-B\*15:01 и HLA-B\*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C\*07:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*04:01 HLA-C\*03:04; HLA-C\*06:02; HLA-C\*08:02; HLA-C\*03:03; HLA-C\*06:02; HLA-C\*16:01; HLA-C\*12:03; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*15:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*03:04; HLA-C\*12:03; HLA-C\*02:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*12:02; HLA-C\*14:02; HLA-C\*06:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*03:03; HLA-C\*07:04; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*04:01; и HLA-C\*02:02.

[00630] Вариант осуществления 66 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что аллели HLA-B и HLA-C выбраны из любого из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B\*07:02 и HLA-C\*07:02; HLA-B\*08:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*44:02 и HLA-C\*05:01; HLA-B\*35:01 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*40:01 и HLA-C\*03:04; HLA-B\*57:01 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*14:02 и HLA-C\*08:02; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*03:03; HLA-B\*13:02 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*16:01; HLA-B\*38:01 и HLA-C\*12:03; HLA-B\*18:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*51:01 и HLA-C\*15:02; HLA-B\*49:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*03:04; HLA-B\*18:01 и HLA-C\*12:03; HLA-B\*27:05 и HLA-C\*02:02; HLA-B\*35:03 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*18:01 и HLA-C\*05:01; HLA-B\*52:01 и HLA-C\*12:02; HLA-B\*51:01 и HLA-C\*14:02; HLA-B\*37:01 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*53:01 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*55:01 и HLA-C\*03:03; HLA-B\*44:02 и HLA-C\*07:04; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*35:02 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*04:01; и HLA-B\*40:02 и HLA-C\*02:02.

[00631] Вариант осуществления 67 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*07:02 и HLA-C\*07:02.

[00632] Вариант осуществления 68 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*08:01 и HLA-C\*07:01.

[00633] Вариант осуществления 69 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*44:02 и HLA-C\*05:01.

[00634] Вариант осуществления 70 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*35:01 и HLA-C\*04:01.

[00635] Вариант осуществления 71 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что клетка имеет сниженную экспрессию белка MHC класса II на поверхности клетки.

[00636] Вариант осуществления 72 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что клетка имеет генетическую модификацию гена, выбранного из СИТА, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, RFX5, RFXB/ANK, RFXAP, CREB, NF-YA, NF-YB и NF-YC.

[00637] Вариант осуществления 73 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что клетка имеет генетическую модификацию в гене СИТА.

[00638] Вариант осуществления 74 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что клетка имеет сниженную экспрессию белка TRAC на поверхности клетки.

[00639] Вариант осуществления 75 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что клетка имеет сниженную экспрессию белка TRBC на поверхности клетки.

[00640] Вариант осуществления 76 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту.

[00641] Вариант осуществления 77 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки, или лиганд для рецептора.

[00642] Вариант осуществления 78 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 77, отличающуюся тем, что нацеливающий рецептор представляет собой CAR.

[00643] Вариант осуществления 79 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 77, отличающуюся тем, что нацеливающий рецептор представляет собой TCR.

[00644] Вариант осуществления 80 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 77, отличающуюся тем, что нацеливающий рецептор представляет собой WT1 TCR.

[00645] Вариант осуществления 81 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантом осуществления 77, отличающуюся тем, что сконструированная клетка содержит лиганд для рецептора.

[00646] Вариант осуществления 82 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется сконструированной клеткой.

[00647] Вариант осуществления 83 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой иммунную клетку.

[00648] Вариант осуществления 84 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что клетка представляет собой первичную клетку.

[00649] Вариант осуществления 85 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой моноцит, макрофаг, тучную клетку, дендритную клетку или гранулоцит.

[00650] Вариант осуществления 86 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой лимфоцит.

[00651] Вариант осуществления 87 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой Т-клетку.

[00652] Вариант осуществления 88 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой Т-клетку CD8+.

[00653] Вариант осуществления 89 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой CD4+ Т-клетку .

[00654] Вариант осуществления 90 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой В-клетку.

[00655] Вариант осуществления 91 представляет собой сконструированную клетку

в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что клетка представляет собой клетку-натуральный киллер (NK).

[00656] Вариант осуществления 92 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой макрофаг.

[00657] Вариант осуществления 93 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой В-клетку.

[00658] Вариант осуществления 94 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой плазматическую В-клетку.

[00659] Вариант осуществления 95 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что клетка представляет собой В-клетку памяти.

[00660] Вариант осуществления 96 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой стволовую клетку или клетку-предшественника.

[00661] Вариант осуществления 97 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что стволовая клетка или клетка-предшественник представляет собой HSC или iPSC.

[00662] Вариант осуществления 98 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой активированную клетку.

[00663] Вариант осуществления 99 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой активированную клетку.

[00664] Вариант осуществления 100 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат, или при этом генетическая модификация включает по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00665] Вариант осуществления 101 представляет собой сконструированную

клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах указанных геномных координат.

[00666] Вариант осуществления 102 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит индел.

[00667] Вариант осуществления 103 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену С на Т или по меньшей мере одну замену А на G в пределах указанных геномных координат.

[00668] Вариант осуществления 104 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления.

[00669] Вариант осуществления 105 представляет собой популяцию клеток, содержащую сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления.

[00670] Вариант осуществления 106 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую популяцию клеток варианта осуществления 105.

[00671] Вариант осуществления 107 представляет собой популяцию в соответствии с вариантом осуществления 105 или фармацевтическую композицию в соответствии с вариантом осуществления 106, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 65% HLA-A-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

[00672] Вариант осуществления 107.1 представляет собой популяцию в соответствии с вариантом осуществления 105 или фармацевтическую композицию в соответствии с вариантом осуществления 106, отличающиеся тем, что по меньшей мере 65% популяции клеток содержат генетическую модификацию гена HLA-A, по данным секвенирования следующего поколения (NGS).

[00673] Вариант осуществления 108 представляет собой популяцию в соответствии с вариантом осуществления 105 или фармацевтическую композицию в соответствии с вариантом осуществления 106, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 70% HLA-A-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

[00674] Вариант осуществления 108.1 представляет собой популяцию в соответствии с вариантом осуществления 105 или фармацевтическую композицию в соответствии с вариантом осуществления 106, отличающиеся тем, что по меньшей мере 70% популяции клеток содержат генетическую модификацию гена HLA-A, по данным секвенирования следующего поколения (NGS).

[00675] Вариант осуществления 109 представляет собой популяцию в соответствии с вариантом осуществления 105 или фармацевтическую композицию в соответствии с вариантом осуществления 106, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 80% HLA-A-отрицательной, по данным проточной цитометрии.





вариантом осуществления 106, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 99% HLA-A-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

[00694] Вариант осуществления 118.1 представляет собой популяцию в соответствии с вариантом осуществления 105 или фармацевтическую композицию в соответствии с вариантом осуществления 106, отличающиеся тем, что по меньшей мере 99% популяции клеток содержат генетическую модификацию гена HLA-A, по данным секвенирования следующего поколения (NGS).

[00695] Вариант осуществления 119 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-118, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 94% СПТА-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

[00696] Вариант осуществления 120 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-118, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 95% СПТА-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

[00697] Вариант осуществления 121 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-118, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 96% СПТА-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

[00698] Вариант осуществления 122 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-118, отличающуюся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 97% СПТА-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

[00699] Вариант осуществления 123 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-118, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 98% СПТА-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

[00700] Вариант осуществления 124 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-118, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 99% СПТА-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

[00701] Вариант осуществления 125 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-124, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 95% отрицательной по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии.

[00702] Вариант осуществления 126 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-124, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 97% отрицательной по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии.

[00703] Вариант осуществления 127 представляет собой популяцию или

фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-124, отличающиеся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 98% отрицательной по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии.

[00704] Вариант осуществления 128 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-124, популяция клеток является по меньшей мере на 99% отрицательной отличающиеся тем, что по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии.

[00705] Вариант осуществления 129 представляет собой популяцию или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 105-124, отличающуюся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 99,5% отрицательной по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии.

[00706] Вариант осуществления 130 представляет собой способ введения сконструированной клетки, популяции клеток, фармацевтической композиции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом.

[00707] Вариант осуществления 131 представляет собой способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (ACT).

[00708] Вариант осуществления 132 представляет собой способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом.

[00709] Вариант осуществления 133 представляет собой способ получения сконструированной клетки человека, у которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, при этом указанный способ включает приведение клетки в контакт с композицией, содержащей: (a) РНК, направленную на HLA-A, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211; или (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или (iii) направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или (iv) направляющую последовательность, которая связывает целевой сайт, содержащий геномную область из Таблиц 2-5; или (v) направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам геномной области из Таблиц 1-2 и 5, или направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам геномной области из Таблицы 4; или (vi) направляющую последовательность, которая на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из (v); и необязательно (b) РНК-направляемый ДНК-

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

[00710] Вариант осуществления 134 представляет собой способ снижения поверхностной экспрессии белка HLA-A в клетке человека по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей: (a) РНК, направленную на HLA-A, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211; или (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или (iii) направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или (iv) направляющую последовательность, которая связывает целевой сайт, содержащий геномную область из Таблиц 2-5; или (v) направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам геномной области из Таблиц 1-2 и 5, или направляющую последовательность, которая комплементарна по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам геномной области из Таблицы 4; или (vi) направляющую последовательность, которая на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из (v); и необязательно (b) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00711] Вариант осуществления 135 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9.

[00712] Вариант осуществления 136 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. pyogenes* Cas9.

[00713] Вариант осуществления 137 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *N. meningitidis* Cas9.

[00714] Вариант осуществления 138 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. thermophilus* Cas9.

[00715] Вариант осуществления 139 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой *S. Aureus* Cas9.

[00716] Вариант осуществления 140 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-

связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cpfl из *F. novicida*.

[00717] Вариант осуществления 141 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cpfl из *F. novicida*.

[00718] Вариант осуществления 142 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cpfl из *Lachnospiraceae bacterium ND2006*.

[00719] Вариант осуществления 143 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой редактор оснований С на Т.

[00720] Вариант осуществления 144 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой редактор оснований А на G.

[00721] Вариант осуществления 145 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу АРОВЕС3А (А3А) и РНК-зависимую нуклеазу.

[00722] Вариант осуществления 146 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Cas12a.

[00723] Вариант осуществления 147 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой CasX.

[00724] Вариант осуществления 148 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 133 или 134, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой Nme2Cas9.

[00725] Вариант осуществления 149 представляет собой способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 133-148, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка МНС класса II в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, например, путем приведения в контакт клетки с системой редактирования генов, нацеленной на ген, выбранный из СРТА, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, RFX5, RFXB/ANK, RFXAP, CREB, NF-YA, NF-YB и NF-YC.

[00726] Вариант осуществления 150 представляет собой способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 133-149, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с РНК, направленной на СРТА.

[00727] Вариант осуществления 151 представляет собой способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 133-150, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка ТКР в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00728] Вариант осуществления 152 представляет собой способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 133-151, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой.

[00729] Вариант осуществления 153 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 152, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор.

[00730] Вариант осуществления 154 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 152, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, секретлируемый клеткой.

[00731] Вариант осуществления 155 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 152, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с ингибитором ДНК-зависимой протеинкиназы (DNAPKi).

[00732] Вариант осуществления 156 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 155, отличающийся тем, что DNAPKi представляет собой Соединение 1.

[00733] Вариант осуществления 157 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00734] Вариант осуществления 158 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой первичную клетку.

[00735] Вариант осуществления 159 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой CD4<sup>+</sup> Т-клетку .

[00736] Вариант осуществления 160 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку .

[00737] Вариант осуществления 161 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с

любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой Т-клетку памяти.

[00738] Вариант осуществления 162 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой В-клетку.

[00739] Вариант осуществления 163 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой плазматическую В-клетку.

[00740] Вариант осуществления 164 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой В-клетку памяти.

[00741] Вариант осуществления 165 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой клетку-натуральный киллер (NK).

[00742] Вариант осуществления 166 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой макрофаг.

[00743] Вариант осуществления 167 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой стволовую клетку.

[00744] Вариант осуществления 168 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (PSC).

[00745] Вариант осуществления 169 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (HSC).

[00746] Вариант осуществления 170 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (iPSC).

[00747] Вариант осуществления 171 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с

любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC).

[00748] Вариант осуществления 172 Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой нейральную стволовую клетку (NSC).

[00749] Вариант осуществления 173 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (LSC).

[00750] Вариант осуществления 174 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой клетку-предшественника, например, эндотелиальная клетка-предшественник или нейральная клетка-предшественник.

[00751] Вариант осуществления 175 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой первичную клетку.

[00752] Вариант осуществления 176 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка выбрана из: хондроцита, миоцита и кератиноцита.

[00753] Вариант осуществления 177 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой активированную клетку.

[00754] Вариант осуществления 178 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что клетка представляет собой неактивированную клетку.

[00755] Вариант осуществления 179 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой антитело или фрагмент антитела.

[00756] Вариант осуществления 180 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую

кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой полноразмерное антитело IgG.

[00757] Вариант осуществления 181 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой одноцепочечное антитело.

[00758] Вариант осуществления 182 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой нейтрализующее антитело.

[00759] Вариант осуществления 183 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой фермент.

[00760] Вариант осуществления 184 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой цитокин.

[00761] Вариант осуществления 185 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитые белки которые секретируются клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой слитый белок.

[00762] Вариант осуществления 186 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитые белки которые секретируются клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид содержит растворимый рецептор.

[00763] Вариант осуществления 187 представляет собой сконструированную

клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой T-клеточный рецептор (TCR).

[00764] Вариант осуществления 188 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой генетически модифицированный TCR.

[00765] Вариант осуществления 189 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой WT1 TCR.

[00766] Вариант осуществления 190 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой CAR.

[00767] Вариант осуществления 191 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой универсальный CAR.

[00768] Вариант осуществления 192 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL).

[00769] Вариант осуществления 193 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что клетки сконструированы с помощью системы редактирования генов.

[00770] Вариант осуществления 194 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по варианту осуществления 193, отличающиеся тем, что система редактирования генов содержит подобную активатору транскрипции эффекторную нуклеазу (TALEN).

[00771] Вариант осуществления 195 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по варианту осуществления 193, отличающуюся тем, что система редактирования генов содержит нуклеазу "цинковые пальцы".

[00772] Вариант осуществления 196 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по варианту осуществления 193, отличающиеся тем, что система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, необязательно при этом РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9.

[00773] Вариант осуществления 197 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, вводится в клетку в векторе.

[00774] Вариант осуществления 198 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент для СПТА вводится в клетку в векторе, необязательно в том же векторе, что и РНК, направленная на HLA-A.

[00775] Вариант осуществления 199 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что экзогенная нуклеиновая кислота вводится в клетку в векторе.

[00776] Вариант осуществления 200 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор.

[00777] Вариант осуществления 201 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что вектор представляет собой невирусный вектор.

[00778] Вариант осуществления 202 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[00779] Вариант осуществления 203 представляет собой сконструированную

клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что вектор представляет собой ретровирусный вектор.

[00780] Вариант осуществления 204 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что вектор представляет собой AAV.

[00781] Вариант осуществления 205 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что направляющую РНК вводят в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, необязательно в той же составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, что и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00782] Вариант осуществления 206 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что экзогенную нуклеиновую кислоту вводят в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты.

[00783] Вариант осуществления 207 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что составная композиция липида и нуклеиновой кислоты представляет собой липидную наночастицу (LNP).

[00784] Вариант осуществления 208 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что экзогенную нуклеиновую кислоту интегрируют в геном клетки.

[00785] Вариант осуществления 209 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что экзогенную нуклеиновую кислоту интегрируют в геном клетки путем гомологичной рекомбинации (HR).

[00786] Вариант осуществления 210 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что экзогенную нуклеиновую кислоту интегрируют в безопасный локус в геноме клетки.

[00787] Вариант осуществления 211 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 13 или отличающиеся тем, что РНК,



направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 43.

[00798] Вариант осуществления 222 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 45.

[00799] Вариант осуществления 223 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит SEQ ID NO: 62.

[00800] Вариант осуществления 224 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию.

[00801] Вариант осуществления 225 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация включает 2'-О- метил (2'-О-Me) модифицированный нуклеотид.

[00802] Вариант осуществления 226 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

[00803] Вариант осуществления 227 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

[00804] Вариант осуществления 228 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую модификацию одного или большего количества из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК.

[00805] Вариант осуществления 229 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую модификацию одного или большего количества из последних пяти нуклеотидов на 3'-

конце направляющей РНК.

[00806] Вариант осуществления 230 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую PS связь между первыми четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

[00807] Вариант осуществления 231 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую PS связь между последними четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

[00808] Вариант осуществления 232 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что РНК, направленная на HLA-A содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую модифицированный нуклеотид 2'-O-Me на первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей РНК.

[00809] Вариант осуществления 233 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую модифицированный нуклеотид 2'-O-Me на последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК.

[00810] Вариант осуществления 234 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения с целью экспрессии TCR со специфичностью к полипептиду, экспрессируемому раковыми клетками.

[00811] Вариант осуществления 235 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения при введении субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (ACT).

[00812] Вариант осуществления 236 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения при лечении субъекта, больного раком.

[00813] Вариант осуществления 237 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения при лечении субъекта с инфекционным заболеванием.

[00814] Вариант осуществления 238 представляет собой сконструированную

клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения при лечении субъекта с аутоиммунным заболеванием.

[00815] Вариант осуществления 239 представляет собой банк клеток, содержащий: (а) сконструированные клетки в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления или сконструированные клетки, полученные способом в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления; и (b) каталог, содержащий информацию, документирующую аллели HLA-B и HLA-C донорных клеток в банке клеток.

[00816] Вариант осуществления 240 представляет собой банк клеток в соответствии с вариантом осуществления 239, отличающийся тем, что указанный банк клеток содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40 донорных клеток, которые имеют уникальную комбинацию аллелей HLA-B и HLA-C по сравнению с другими донорными клетками в банке клеток.

[00817] Вариант осуществления 241 представляет собой способ введения сконструированной клетки нуждающемуся в этом субъекту-реципиенту, включающий: (а) определение аллелей HLA-B и HLA-C субъекта-реципиента; (b) выбор сконструированной клетки или клеточной популяции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления настоящего изобретения или сконструированной клетки или клеточной популяции, полученной способом в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления настоящего изобретения, при этом указанная сконструированная клетка содержит по меньшей мере один из тех же аллелей HLA-B или HLA-C, что и субъект-реципиент; (с) введение выбранной сконструированной клетки субъекту-реципиенту.

[00818] Вариант осуществления 242 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 241, отличающийся тем, что субъект имеет аллели HLA-B и HLA-C сконструированной клетки.

[00819] Вариант осуществления 243 представляет собой сконструированную клетку, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения при введении частично совместимому субъекту для терапии методом адоптивного переноса клеток (АСТ), при этом частично совместимый субъект имеет аллели HLA-B и HLA-C сконструированной клетки или популяции клеток.

[00820] Вариант осуществления 244 представляет собой сконструированную клетку, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 130-132, 235-238, 241-243, отличающиеся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток содержат аллели HLA-B и HLA-C, общие с субъектом.

[00821] Вариант осуществления 245 представляет собой сконструированную клетку, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 130-132, 235-238, 241-243, отличающиеся тем,

что аллели HLA-B и HLA-C сконструированной клетки или клеточной популяции состоят из аллелей, которые соответствуют одному или большему количеству аллелей HLA-B и HLA-C субъекта.

[00822] Вариант осуществления 246 представляет собой сконструированную клетку, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 130-132, 235-238, 241-243, отличающиеся тем, что аллели HLA-B и HLA-C сконструированной клетки или клеточной популяции состоят из аллелей, которые соответствуют одному или обоим аллелям HLA-B и/или одному или обоим аллелям HLA-C субъекта.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

2. Сконструированная клетка человека, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из:

chr6:29942854-chr6:29942913 и

chr6:29943518-chr6:29943619;

при этом указанная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

3. Сконструированная клетка по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что в клетке снижена или устранена экспрессия по меньшей мере одного аллеля HLA-A, выбранного из: HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 и HLA-A24.

4. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-3, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942864-chr6: 29942903.

5. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-4, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528-chr6: 29943609.

6. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-5, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897 и chr6:29942883-29942903.

7. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-6, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569 и chr6:29943589-29943609.

8. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-7, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29942876-29942897.

9. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-8, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr6:29943528- 29943550.

10. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-9, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в

пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896 и chr6:29942877-29942897.

11. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-10, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549 и chr6:29943530-29943550.

12. Сконструированная клетка человека, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена HLA-A, при этом генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046.

13. Сконструированная клетка человека, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация содержит индел, замену С на Т, или замену А на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046.

14. Сконструированная клетка в соответствии с п. 12 или 13, отличающаяся тем, что является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

15. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 12-14, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

16. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 12-15, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену С на Т или по меньшей мере одну замену А на G в пределах геномных координат.

17. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-16, отличающаяся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из:

- a. chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550;

- chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и  
 chr6:29944026-29944046, chr6:29934330-29934350, chr6:29943115-29943135,  
 chr6:29943135-29943155, chr6:29943140-29943160, chr6:29943590-29943610,  
 chr6:29943824-29943844, chr6:29943858-29943878, chr6:29944478-29944498, и  
 chr6:29944850-29944870;
- b. chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896;  
 chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146;  
 chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550;  
 chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и  
 chr6:29944026-29944046;
- c. chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896;  
 chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943528-29943548;  
 chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557;  
 chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609;
- d. chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896;  
 chr6:29942877-29942897; и chr6:29942883-29942903;
- e. chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550;  
 chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; и chr6:29943589-29943609;
- f. chr6:29942864-29942884, chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, и  
 chr6:29942877-29942897;
- g. chr6:29943528-29943548, chr6:29943529-29943549, и chr6:29943530-29943550;
- h. chr6:29945290-29945310, chr6:29945296-29945316, и chr6:29945297-29945317,  
 chr6:29945300-29945320;
- i. chr6:29890117-29890137, chr6:29927058-29927078, chr6:29934330-29934350,  
 chr6:29942541-29942561, chr6:29942542-29942562, chr6:29942543-29942563,  
 chr6:29942543-29942563, chr6:29942550-29942570, chr6:29942864-29942884,  
 chr6:29942868-29942888, chr6:29942876-29942896, chr6:29942876-29942896,  
 chr6:29942877-29942897, chr6:29942883-29942903, chr6:29943062-29943082,  
 chr6:29943063-29943083, chr6:29943092-29943112, chr6:29943115-29943135,  
 chr6:29943118-29943138, chr6:29943119-29943139, chr6:29943120-29943140,  
 chr6:29943126-29943146, chr6:29943128-29943148, chr6:29943129-29943149,  
 chr6:29943134-29943154, chr6:29943134-29943154, chr6:29943135-29943155,  
 chr6:29943136-29943156, chr6:29943140-29943160, chr6:29943142-29943162,  
 chr6:29943143-29943163, chr6:29943188-29943208, chr6:29943528-29943548,  
 chr6:29943529-29943549, chr6:29943530-29943550, chr6:29943536-29943556,  
 chr6:29943537-29943557, chr6:29943538-29943558, chr6:29943549-29943569,  
 chr6:29943556-29943576, chr6:29943589-29943609, chr6:29943590-29943610,  
 chr6:29943590-29943610, chr6:29943599-29943619, chr6:29943600-29943620,  
 chr6:29943601-29943621, chr6:29943602-29943622, chr6:29943603-29943623,  
 chr6:29943774-29943794, chr6:29943779-29943799, chr6:29943780-29943800,

- chr6:29943822-29943842, chr6:29943824-29943844, chr6:29943857-29943877,  
 chr6:29943858-29943878, chr6:29943859-29943879, chr6:29943860-29943880,  
 chr6:29944026-29944046, chr6:29944077-29944097, chr6:29944078-29944098,  
 chr6:29944458-29944478, chr6:29944478-29944498, chr6:29944597-29944617,  
 chr6:29944642-29944662, chr6:29944643-29944663, chr6:29944772-29944792,  
 chr6:29944782-29944802, chr6:29944850-29944870, chr6:29944907-29944927,  
 chr6:29945024-29945044, chr6:29945097-29945117, chr6:29945104-29945124,  
 chr6:29945105-29945125, chr6:29945116-29945136, chr6:29945118-29945138,  
 chr6:29945119-29945139, chr6:29945124-29945144, chr6:29945176-29945196,  
 chr6:29945177-29945197, chr6:29945177-29945197, chr6:29945180-29945200,  
 chr6:29945187-29945207, chr6:29945188-29945208, chr6:29945228-29945248,  
 chr6:29945230-29945250, chr6:29945231-29945251, chr6:29945232-29945252,  
 chr6:29945308-29945328, chr6:29945361-29945381, chr6:29945362-29945382, и  
 chr6:31382543-31382563;
- j. chr6:29942815-29942835, chr6:29942816-29942836, chr6:29942817-29942837,  
 chr6:29942817-29942837, chr6:29942828-29942848, chr6:29942837-29942857,  
 chr6:29942885-29942905, chr6:29942895-29942915, chr6:29942896-29942916,  
 chr6:29942898-29942918, chr6:29942899-29942919, chr6:29942900-29942920,  
 chr6:29942904-29942924, chr6:29942905-29942925, chr6:29942912-29942932,  
 chr6:29942913-29942933, chr6:29943490-29943510, chr6:29943497-29943517,  
 chr6:29943498-29943518, chr6:29943502-29943522, chr6:29943502-29943522,  
 chr6:29943511-29943531, chr6:29943520-29943540, chr6:29943521-29943541,  
 chr6:29943566-29943586, chr6:29943569-29943589, chr6:29943569-29943589,  
 chr6:29943570-29943590, chr6:29943573-29943593, chr6:29943578-29943598,  
 chr6:29943585-29943605, chr6:29943589-29943609, chr6:29943568-29943588, и  
 chr6:29942815-29942835;
- k. chr6:29942884-29942904, chr6:29943519-29943539, chr6:29942863-29942883;
- l. chr6:29943517-29943537, и chr6:29943523-29943543;
- m. chr6:29942845-29942869, chr6:29942852-29942876, chr6:29942865-29942889,  
 chr6:29942891-29942915, chr6:29942895-29942919, chr6:29942903-29942927,  
 chr6:29942904-29942928, chr6:29943518-29943542, chr6:29943525-29943549,  
 chr6:29943535-29943559, chr6:29943538-29943562, chr6:29943539-29943563,  
 chr6:29943547-29943571, chr6:29943547-29943571, chr6:29943548-29943572,  
 chr6:29943555-29943579, chr6:29943556-29943580, chr6:29943557-29943581,  
 chr6:29943558-29943582, chr6:29943559-29943583, chr6:29943563-29943587,  
 chr6:29943564-29943588, chr6:29943565-29943589, chr6:29943568-29943592,  
 chr6:29943571-29943595, chr6:29943572-29943596, chr6:29943595-29943619,  
 chr6:29943596-29943620, и chr6:29943600-29943624;
- n. chr6:29942885-29942905, chr6:29942895-29942915, chr6:29942896-29942916,  
 chr6:29942898-29942918, chr6:29942899-29942919, chr6:29942900-29942920,

- chr6:29942904-29942924, chr6:29943511-29943531, chr6:29943520-29943540, chr6:29943521-29943541, chr6:29943529-29943549, chr6:29943566-29943586, chr6:29943568-29943588, chr6:29943569-29943589, chr6:29943569-29943589, chr6:29943570-29943590, chr6:29943573-29943593, chr6:29943578-29943598, chr6:29943585-29943605, и chr6:29943589-29943609; или
- о. chr6:29942469-29942489, chr6:29943058-29943078, chr6:29943063-29943083, chr6:29943080-29943100, chr6:29943187-29943207, chr6:29943192-29943212, chr6:29943197-29943217, chr6:29943812-29943832, chr6:29944349-29944369, chr6:29944996-29945016, chr6:29945018-29945038, и chr6:29945341-29945361, chr6:29945526-29945546.

18. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-17, отличающаяся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854-chr6:29942913 и chr6:29943518-chr6:29943619.

19. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-18, отличающаяся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29942876-29942897.

20. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-19, отличающаяся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr6:29943528-29943550.

21. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-20, отличающаяся тем, что экспрессия HLA-A снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046.

22. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 17-21, отличающаяся тем, что геномная целевая последовательность HLA-A содержит по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

23. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 12-22, отличающаяся

тем, что является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

24. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-23, отличающаяся тем, что аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B\*07:02; HLA-B\*08:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*35:01; HLA-B\*40:01; HLA-B\*57:01; HLA-B\*14:02; HLA-B\*15:01; HLA-B\*13:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*38:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*44:03; HLA-B\*51:01; HLA-B\*49:01; HLA-B\*15:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*27:05; HLA-B\*35:03; HLA-B\*18:01; HLA-B\*52:01; HLA-B\*51:01; HLA-B\*37:01; HLA-B\*53:01; HLA-B\*55:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*35:02; HLA-B\*15:01; и HLA-B\*40:02.

25. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-24, отличающаяся тем, что аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C\*07:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*04:01 HLA-C\*03:04; HLA-C\*06:02; HLA-C\*08:02; HLA-C\*03:03; HLA-C\*06:02; HLA-C\*16:01; HLA-C\*12:03; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*15:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*03:04; HLA-C\*12:03; HLA-C\*02:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*12:02; HLA-C\*14:02; HLA-C\*06:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*03:03; HLA-C\*07:04; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*04:01; и HLA-C\*02:02.

26. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-25, отличающаяся тем, что аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B\*07:02; HLA-B\*08:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*35:01; HLA-B\*40:01; HLA-B\*57:01; HLA-B\*14:02; HLA-B\*15:01; HLA-B\*13:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*38:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*44:03; HLA-B\*51:01; HLA-B\*49:01; HLA-B\*15:01; HLA-B\*18:01; HLA-B\*27:05; HLA-B\*35:03; HLA-B\*18:01; HLA-B\*52:01; HLA-B\*51:01; HLA-B\*37:01; HLA-B\*53:01; HLA-B\*55:01; HLA-B\*44:02; HLA-B\*44:03; HLA-B\*35:02; HLA-B\*15:01 и HLA-B\*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C\*07:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*04:01 HLA-C\*03:04; HLA-C\*06:02; HLA-C\*08:02; HLA-C\*03:03; HLA-C\*06:02; HLA-C\*16:01; HLA-C\*12:03; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*15:02; HLA-C\*07:01; HLA-C\*03:04; HLA-C\*12:03; HLA-C\*02:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*05:01; HLA-C\*12:02; HLA-C\*14:02; HLA-C\*06:02; HLA-C\*04:01; HLA-C\*03:03; HLA-C\*07:04; HLA-C\*07:01; HLA-C\*04:01; HLA-C\*04:01; и HLA-C\*02:02.

27. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-26, отличающаяся тем, что аллели HLA-B и HLA-C выбраны из любого из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B\*07:02 и HLA-C\*07:02; HLA-B\*08:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*44:02 и HLA-C\*05:01; HLA-B\*35:01 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*40:01 и HLA-C\*03:04; HLA-B\*57:01 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*14:02 и HLA-C\*08:02; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*03:03; HLA-B\*13:02 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*16:01; HLA-B\*38:01 и HLA-C\*12:03; HLA-B\*18:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*51:01 и HLA-C\*15:02; HLA-B\*49:01 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*03:04; HLA-B\*18:01 и HLA-C\*12:03; HLA-B\*27:05 и HLA-C\*02:02; HLA-B\*35:03 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*18:01 и HLA-C\*05:01; HLA-B\*52:01 и HLA-C\*12:02; HLA-B\*51:01 и HLA-C\*14:02; HLA-B\*37:01 и HLA-C\*06:02; HLA-B\*53:01 и HLA-C\*04:01; HLA-B\*55:01 и HLA-C\*03:03; HLA-B\*44:02 и HLA-C\*07:04; HLA-B\*44:03 и HLA-C\*07:01; HLA-B\*35:02 и HLA-

C\*04:01; HLA-B\*15:01 и HLA-C\*04:01; и HLA-B\*40:02 и HLA-C\*02:02.

28. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-27, отличающаяся тем, что аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*07:02 и HLA-C\*07:02.

29. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-28, отличающаяся тем, что аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*08:01 и HLA-C\*07:01.

30. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-29, отличающаяся тем, что аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*44:02 и HLA-C\*05:01.

31. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-30, отличающаяся тем, что аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B\*35:01 и HLA-C\*04:01.

32. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-31, отличающаяся тем, что имеет сниженную экспрессию белка MHC класса II на поверхности клетки.

33. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-32, отличающаяся тем, что имеет генетическую модификацию гена, выбранного из СИТА, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, RFX5, RFXB/ANK, RFXAP, CREB, NF-YA, NF-YB и NF-YC.

34. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-33, отличающаяся тем, что содержит генетическую модификацию в гене СИТА.

35. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-34, отличающаяся тем, что имеет сниженную экспрессию белка TRAC или белка TRBC на поверхности клетки.

36. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-35, отличающаяся тем, что содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки, или лиганд для рецептора.

37. Сконструированная клетка в соответствии с п. 36, отличающаяся тем, что нацеливающий рецептор представляет собой CAR или TCR.

38. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-37, отличающаяся тем, что дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется сконструированной клеткой.

39. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-38, отличающаяся тем, что представляет собой иммунную клетку.

40. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-39, отличающаяся тем, что представляет собой первичную клетку.

41. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-40, отличающаяся тем, что представляет собой моноцит, макрофаг, тучную клетку, дендритную клетку или гранулоцит.

42. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-41, отличающаяся тем, что представляет собой лимфоцит.

43. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-42, отличающаяся тем, что представляет собой Т-клетку.

44. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-43, отличающаяся

тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

45. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-44, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит индел.

46. Сконструированная клетка в соответствии с любым из пп. 1-45, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену С на Т или по меньшей мере одну замену А на G в пределах геномных координат.

47. Фармацевтическая композиция, содержащая сконструированную клетку в соответствии с любым из пп. 1-46.

48. Популяция клеток, содержащая сконструированную клетку в соответствии с любым из пп. 1-47.

49. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток в соответствии с п. 48.

50. Популяция в соответствии с п. 48 или фармацевтическая композиция в соответствии с п. 49, отличающиеся тем, что популяция является по меньшей мере на 65% по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% HLA-A-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

51. Популяция или фармацевтическая композиция в соответствии с любым из пп. 48-50, отличающаяся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% СПТА-отрицательной, по данным проточной цитометрии.

52. Популяция или фармацевтическая композиция в соответствии с любым из пп. 48-51, отличающаяся тем, что популяция клеток является по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 99,5% отрицательной по эндогенному белку TCR, по данным проточной цитометрии.

53. Способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции в соответствии с любым из пп. 1-53 субъекту, нуждающемуся в этом.

54. Способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-53 субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (ACT).

55. Способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции в соответствии с любым из пп. 1-53 субъекту, нуждающемуся в этом.

56. Способ получения сконструированной клетки человека, у которой снижена или

устранена поверхностная экспрессия белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей:

РНК, направленную на HLA-A, содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или

направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или

направляющую последовательность, которая связывает целевой сайт, содержащий геномную область, указанную в Таблицах 2-5; или

направляющую последовательность, комплементарную по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам геномной области, указанной в Таблицах 1-2 и 5, или направляющую последовательность, комплементарную по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам геномной области, указанную в Таблице 4; или

направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из (v); и необязательно

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

57. Способ снижения поверхностной экспрессии белка HLA-A в клетке человека по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей:

РНК, направленную на HLA-A, содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-211; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или

направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-211; или

направляющую последовательность, которая связывает целевой сайт, содержащий геномную область, указанную в Таблицах 2-5; или

направляющую последовательность, комплементарную по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежным нуклеотидам геномной области, указанной в Таблицах 1-2 и 5, или направляющую последовательность, комплементарную по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 смежным нуклеотидам геномной области, указанную в Таблице 4; или

направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из (v); и необязательно

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

58. Способ в соответствии с п. 56 или 57, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9.

59. Способ в соответствии с п. 56 или 57, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляют собой Cas9 *S. pyogenes*, Cas9 *N. meningitidis*, Cas9 *S. thermophilus*, Cas9 *S. aureus*, Cpf1 из *F. novicida*, Cpf1 из *Acidaminococcus* sp. или Cpf1 из *Lachnospiraceae bacterium ND2006*.

60. Способ в соответствии с п. 56 или 57, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой редактор оснований С на Т, редактор оснований А на G или деаминазу АРОВЕС3А (А3А) и РНК-зависимую нуклеазу.

61. Способ в соответствии с любым из пп. 56-60, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка МНС класса II в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой путем приведения в контакт клетки с системой редактирования генов, нацеленной на ген, выбранный из СИТА, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, RFX5, RFXB/ANK, RFXAP, CREB, NF- $\gamma$ A, NF- $\gamma$ B и NF- $\gamma$ C.

62. Способ в соответствии с любым из пп. 56-61, дополнительно включающий приведение в контакт клетки с РНК, направленной на СИТА.

63. Способ в соответствии с любым из пп. 56-62, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка TCR в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

64. Способ в соответствии с любым из пп. 56-63, дополнительно включающий приведение в контакт клетки с экзогенной нуклеиновой кислотой.

65. Способ в соответствии с п. 64, отличающийся тем, что экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор или полипептид, который секретируется клеткой.

66. Способ в соответствии с п. 64, дополнительно включающий приведение в контакт клетки с ингибитором ДНК-зависимой протеинкиназы (DNAPK $\alpha$ ), необязательно при этом DNAPK $\alpha$  представляет собой Соединение 1.

67. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-66, отличающиеся тем, что клетка представляет собой аллогенную клетку.

68. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-67, отличающиеся тем, что клетка представляет собой первичную клетку.

69. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-68, отличающиеся тем, что клетка представляет собой Т-клетку, необязательно при этом Т-клетка представляет собой CD4 $^{+}$  Т-клетку, CD8 $^{+}$  Т-клетку или Т-клетку памяти.

70. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-68, отличающиеся тем, что клетка представляет собой В-клетку, необязательно при этом В-клетка представляет собой

плазматическую В-клетку или В-клетку памяти.

71. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-68, отличающиеся тем, что клетка представляет собой стволовую клетку, необязательно при этом стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (PSC), гемопоэтическую стволовую клетку (HSC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC), нейральную стволовую клетку (NSC) или лимбальную стволовую клетку (LSC).

72. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-71, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение в контакт клетки с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой антитело или фрагмент антитела.

73. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-72, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой полноразмерное антитело IgG, одноцепочечное антитело или нейтрализующее антитело.

74. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-73, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение в контакт клетки с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой цитокин.

75. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-74, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение в контакт клетки с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR), CAR или лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL).

76. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-75, отличающиеся тем, что клетка сконструирована с помощью системы редактирования генов.

77. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с п. 76, отличающиеся тем, что система редактирования генов содержит эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), или нуклеазу "цинковые пальцы".

78. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с п. 76, отличающиеся тем, что система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота,

кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, необязательно при этом РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9.

79. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 56-78, отличающиеся тем, что в клетку вводят РНК, направленную на HLA-A, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и/или экзогенную нуклеиновую кислоту в векторе, необязательно при этом РНК, направленная на HLA-A, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент находятся в одном и том же векторе.

80. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 56-79, отличающиеся тем, что направляющую РНК или экзогенную нуклеиновую кислоту вводят в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, необязательно в той же составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, что и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

81. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по п. 80, отличающиеся тем, что составная композиция липида и нуклеиновой кислоты представляет собой липидную наночастицу (LNP).

82. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 56-81, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит одну направляющую РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 344-438, 472-504, 533-560 и 1016 или последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 344-438, 472-504, 533-560 и 1016.

83. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 56-82, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 13-18, 26, 37-39, 41, 43, 45 и 62; или при этом РНК, направленная на HLA-A, содержит одну направляющую РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 356-361, 369, 380-382, 384, 386, 388 и 405, или последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 356-361, 369, 380-382, 384, 386, 388 и 405.

84. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 56-83, отличающиеся тем, что РНК, направленная на HLA-A, содержит по меньшей мере одну модификацию.

85. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с п. 84, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает (i) модифицированный 2'-О-метил (2'-O-Me) нуклеотид, (ii) фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами, (iii) 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид, (iv) модификацию одного или большего количества из первых пяти

нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК, (v) модификацию одного или большего количества из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК, (vi) PS связь между первыми четырьмя нуклеотидами направляющей РНК, (vii) PS связь между последними четырьмя нуклеотидами направляющей РНК, (viii) 2'-О-Ме модифицированный нуклеотид на первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей РНК, (ix) 2'-О-Ме модифицированный нуклеотид на последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК или комбинации одного или большего количества из (i)-(ix).

86. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-85 для применения с целью экспрессии TCR со специфичностью к полипептиду, экспрессируемому раковыми клетками.

87. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-85 для применения при введении субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (АСТ).

88. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-85 для применения при лечении субъекта, больного раком, инфекционным заболеванием или аутоиммунным заболеванием.

89. Банк клеток, содержащий:

сконструированную клетку в соответствии с любым из пп. 1-46 и 67-88 или сконструированную клетку, полученную способом в соответствии с любым из пп. 56 и 58-88; и

каталог, содержащий информацию, документирующую аллели HLA-B и HLA-C донорных клеток в банке клеток.

90. Банк клеток в соответствии с п. 89, отличающийся тем, что содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40 донорных клеток, которые имеют уникальную комбинацию аллелей HLA-B и HLA-C по сравнению с другими донорными клетками в банке клеток.

91. Способ введения сконструированной клетки нуждающемуся в этом субъекту-реципиенту, включающий:

определение аллелей HLA-B и HLA-C субъекта-реципиента;

выбор сконструированной клетки или популяции клеток в соответствии с любым из пп. 1-46, 48, 50-52 и 67-88, или сконструированной клетки, полученной способом в соответствии с любым из пп. 56 и 58-88, причем сконструированная клетка содержит по меньшей мере один из тех же аллелей HLA-B или HLA-C, что и субъект-реципиент;

введение выбранной сконструированной клетки субъекту-реципиенту.

92. Способ в соответствии с п. 91, отличающийся тем, что субъект имеет аллели HLA-B и HLA-C сконструированной клетки.

93. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 1-92 для применения при введении частично совместимому субъекту для терапии методом адоптивного переноса клеток (АСТ), при этом частично совместимый субъект имеет аллели HLA-B и HLA-C сконструированной

клетки или популяции клеток.

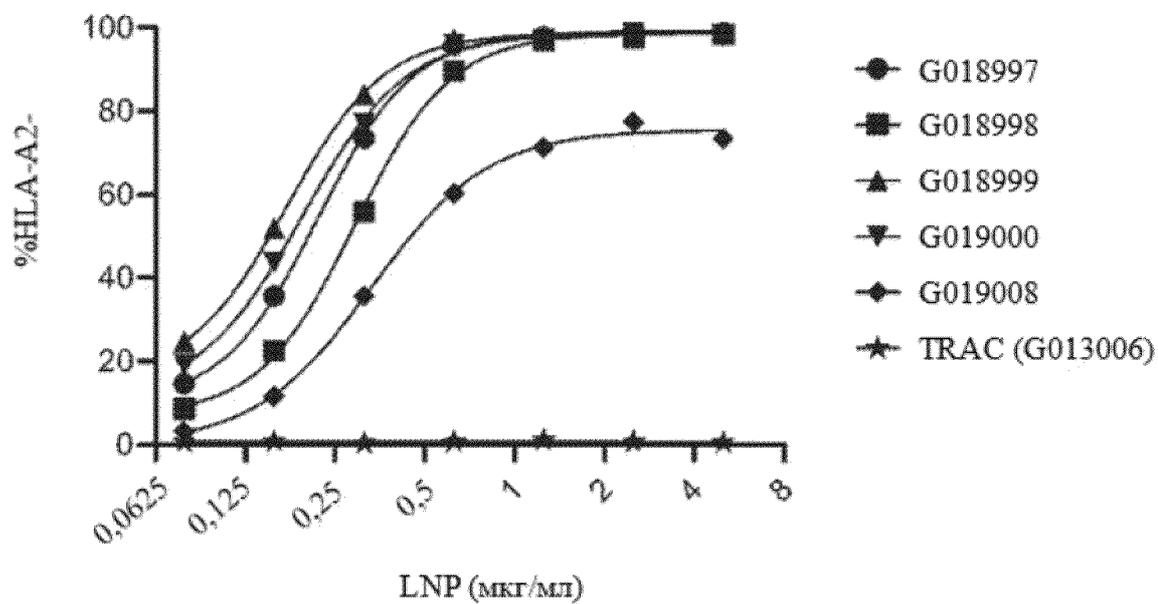
94. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 53-55, 87-88 и 91-93, отличающиеся тем, что сконструированная клетка или популяция клеток содержат аллели HLA-B и HLA-C, общие с субъектом.

95. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 53-55, 87-88 и 91-93, отличающиеся тем, что аллели HLA-B и HLA-C сконструированной клетки или популяции клеток содержат один или большее количество аллелей HLA-B и HLA-C субъекта.

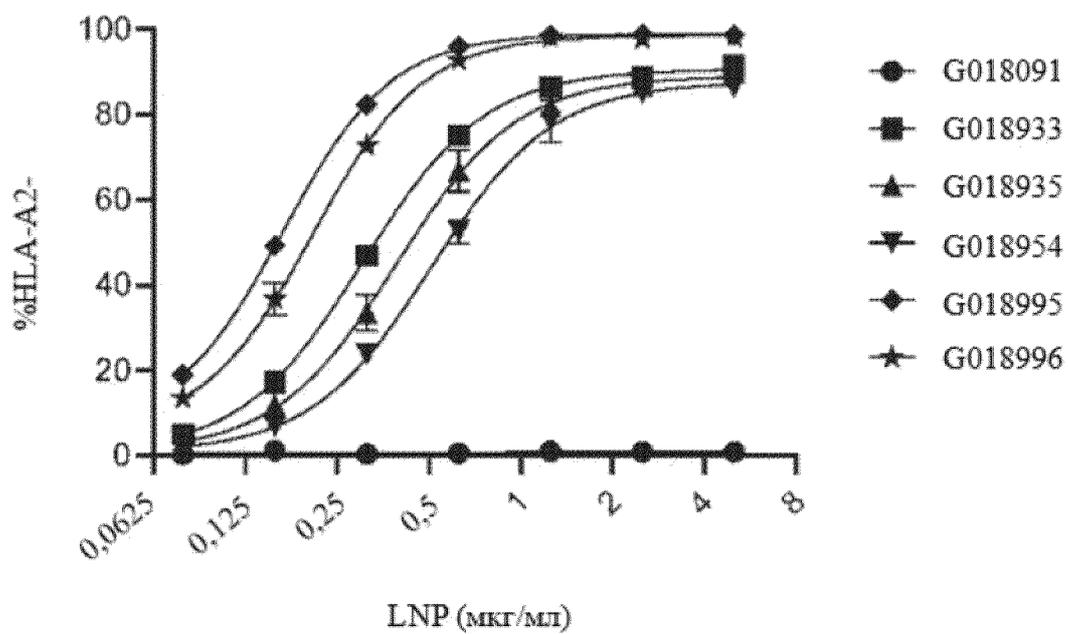
96. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из пп. 53-55, 87-88 и 91-93, отличающиеся тем, что аллели HLA-B и HLA-C сконструированной клетки или популяции клеток содержат один или оба аллеля HLA-B и/или один или оба аллеля HLA-C субъекта.

По доверенности

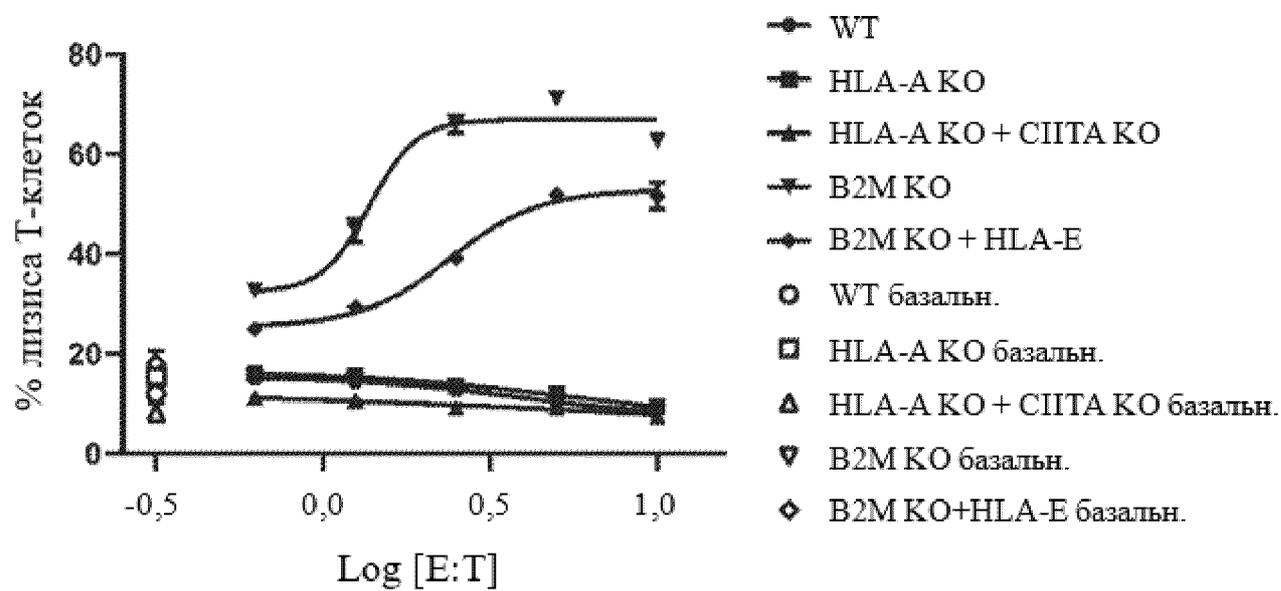
1/26



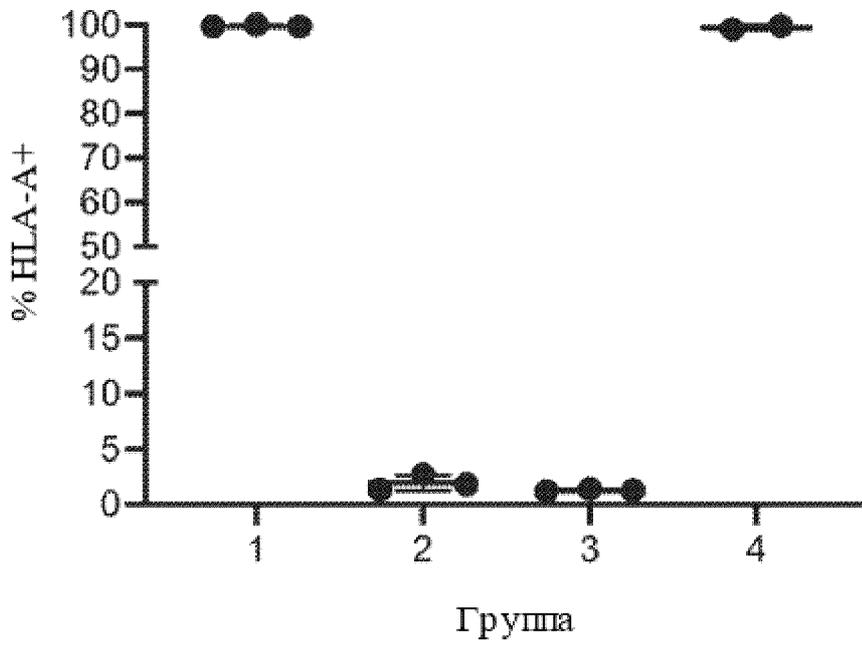
Фиг. 1А



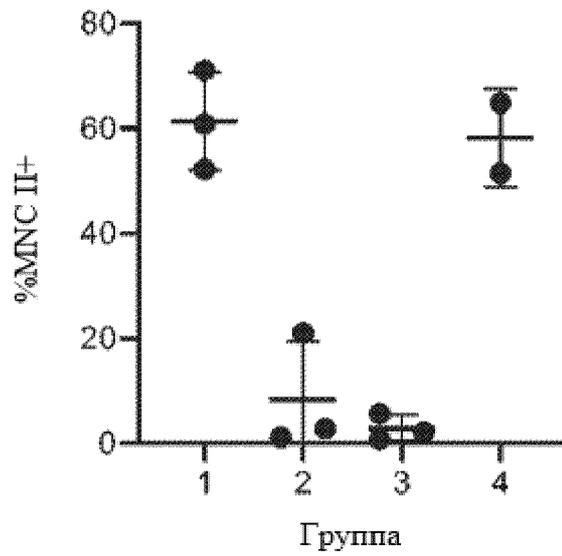
Фиг. 1В



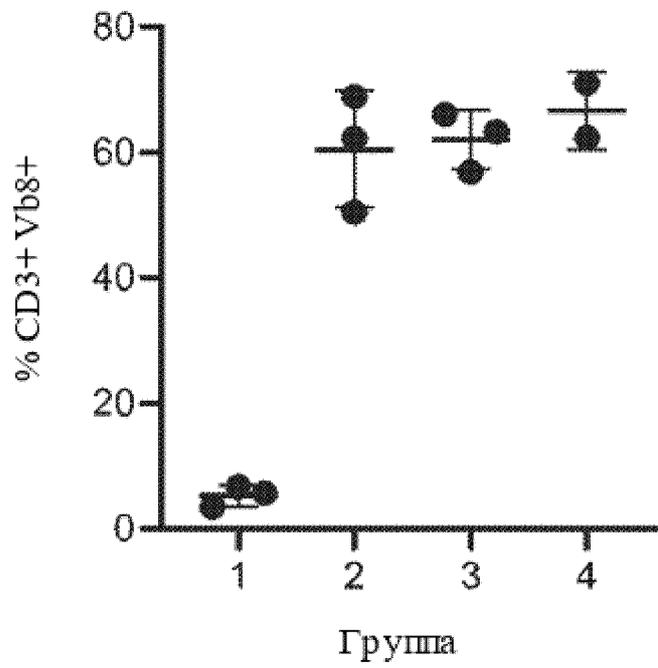
Фиг. 2



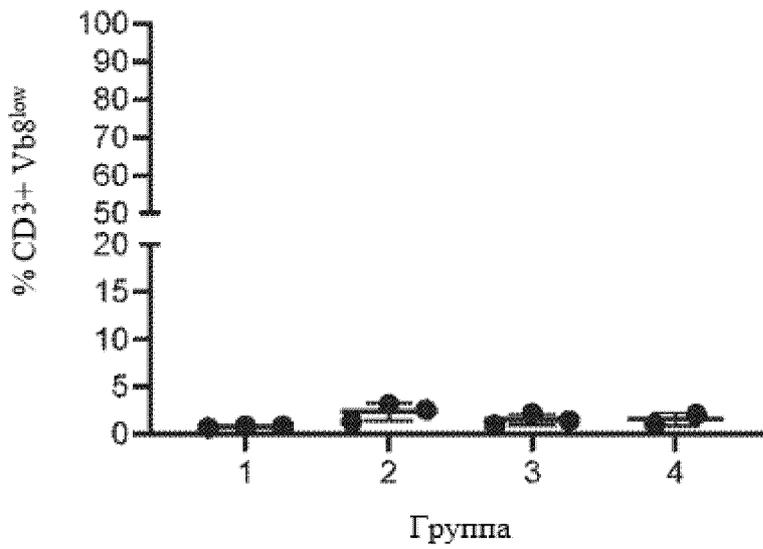
Фиг. 3А



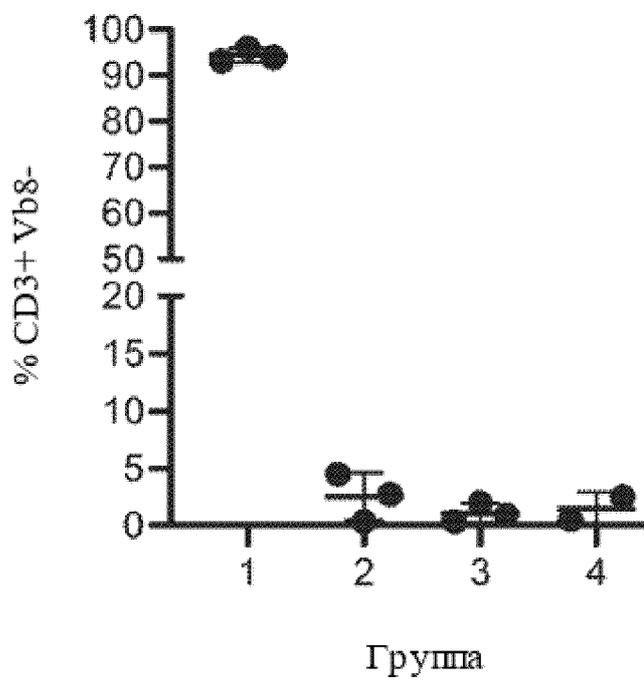
Фиг. 3В



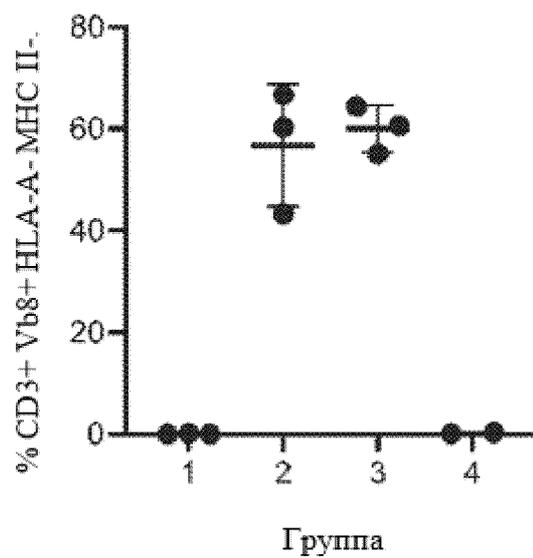
Фиг. 3С



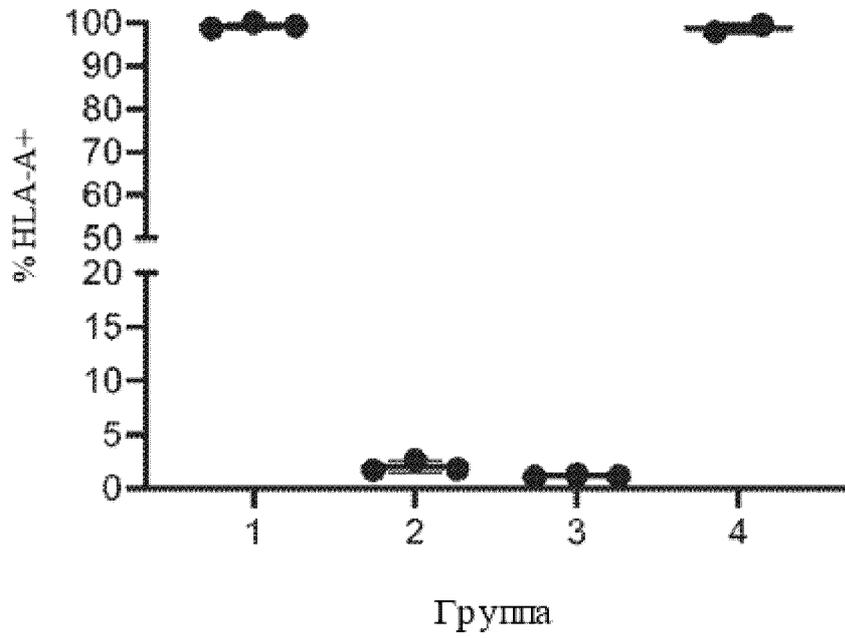
Фиг. 3D



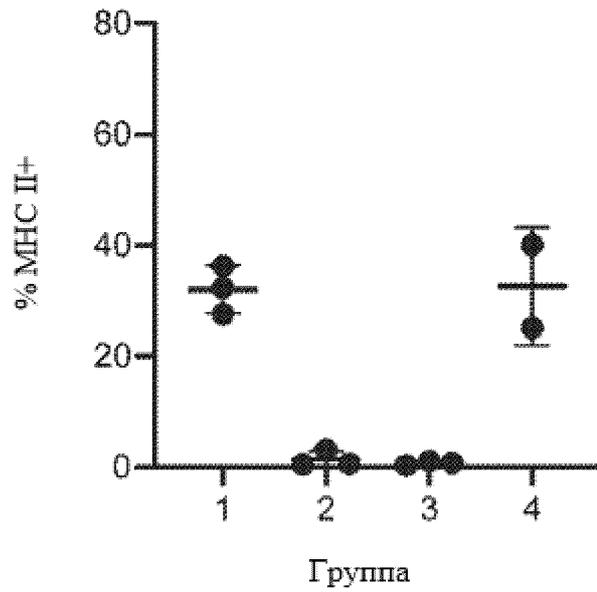
Фиг. 3Е



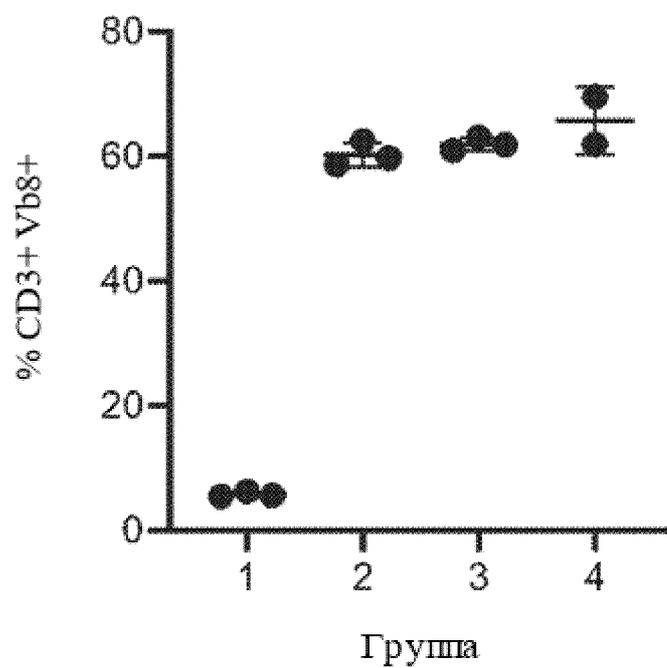
Фиг. 3F



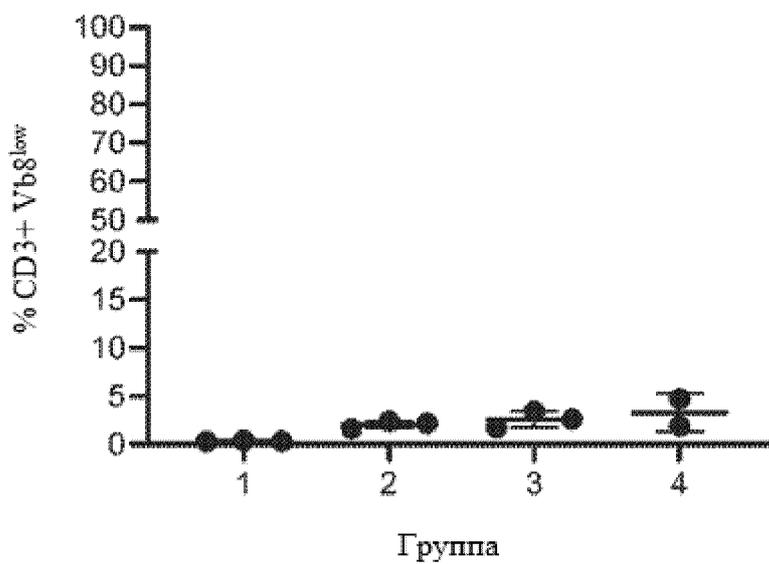
Фиг. 4А



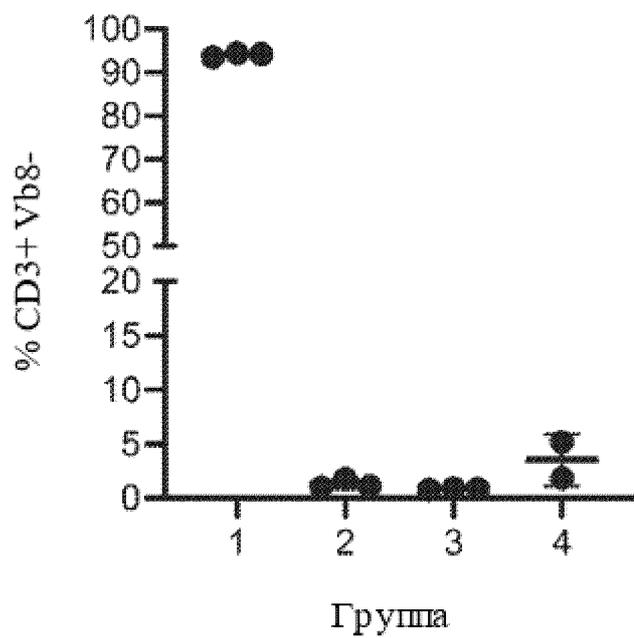
Фиг. 4В



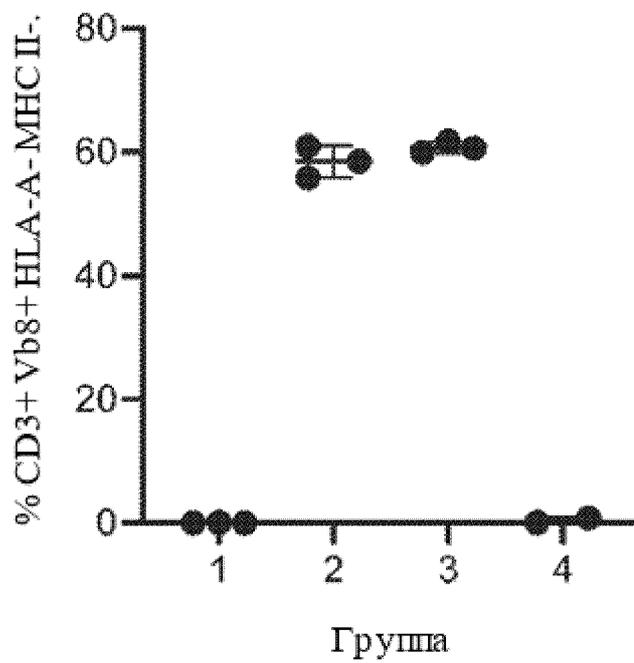
Фиг. 4С



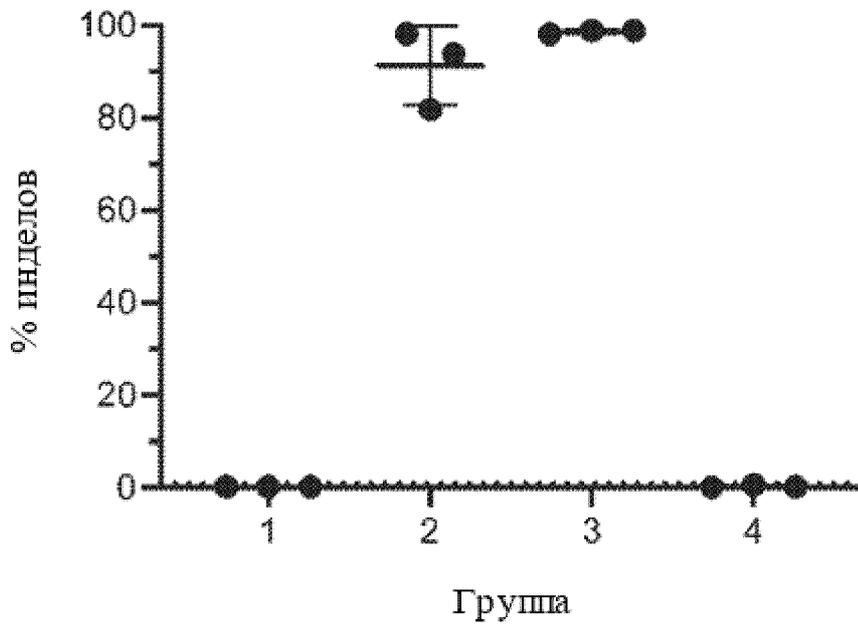
Фиг. 4D



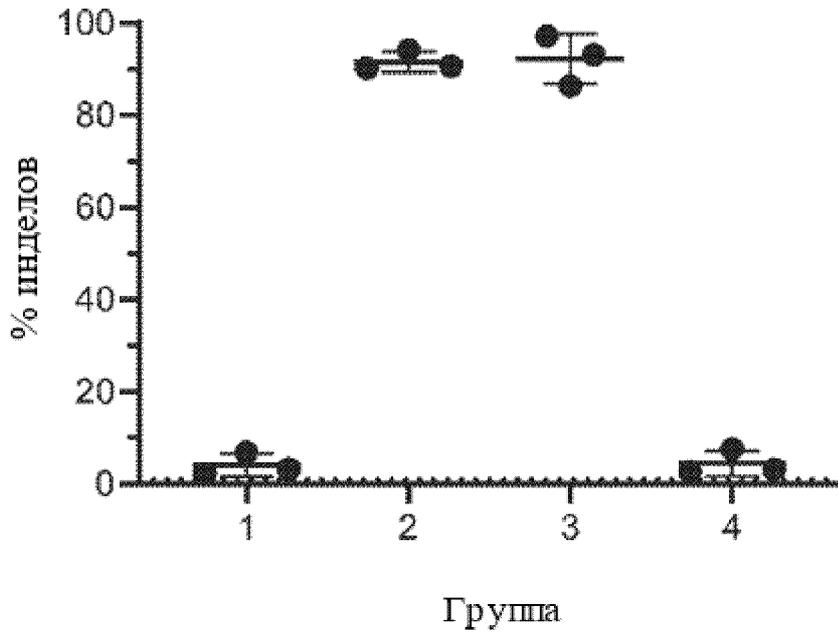
Фиг. 4Е



Фиг. 4F

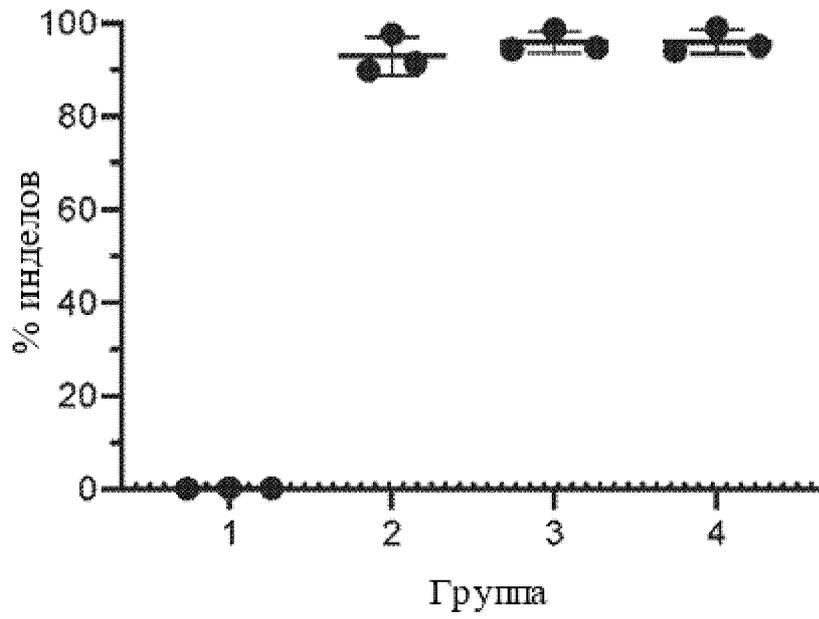


Фиг. 5А

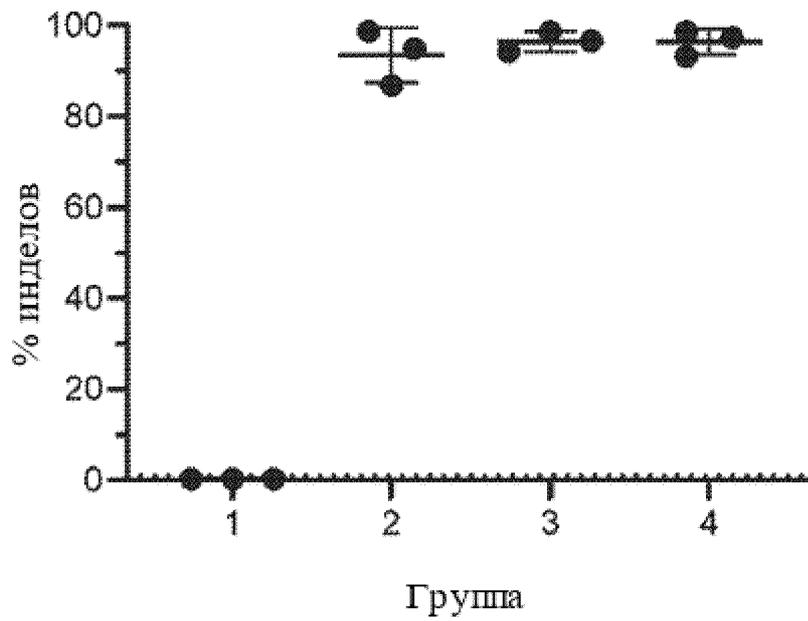


Фиг.5В

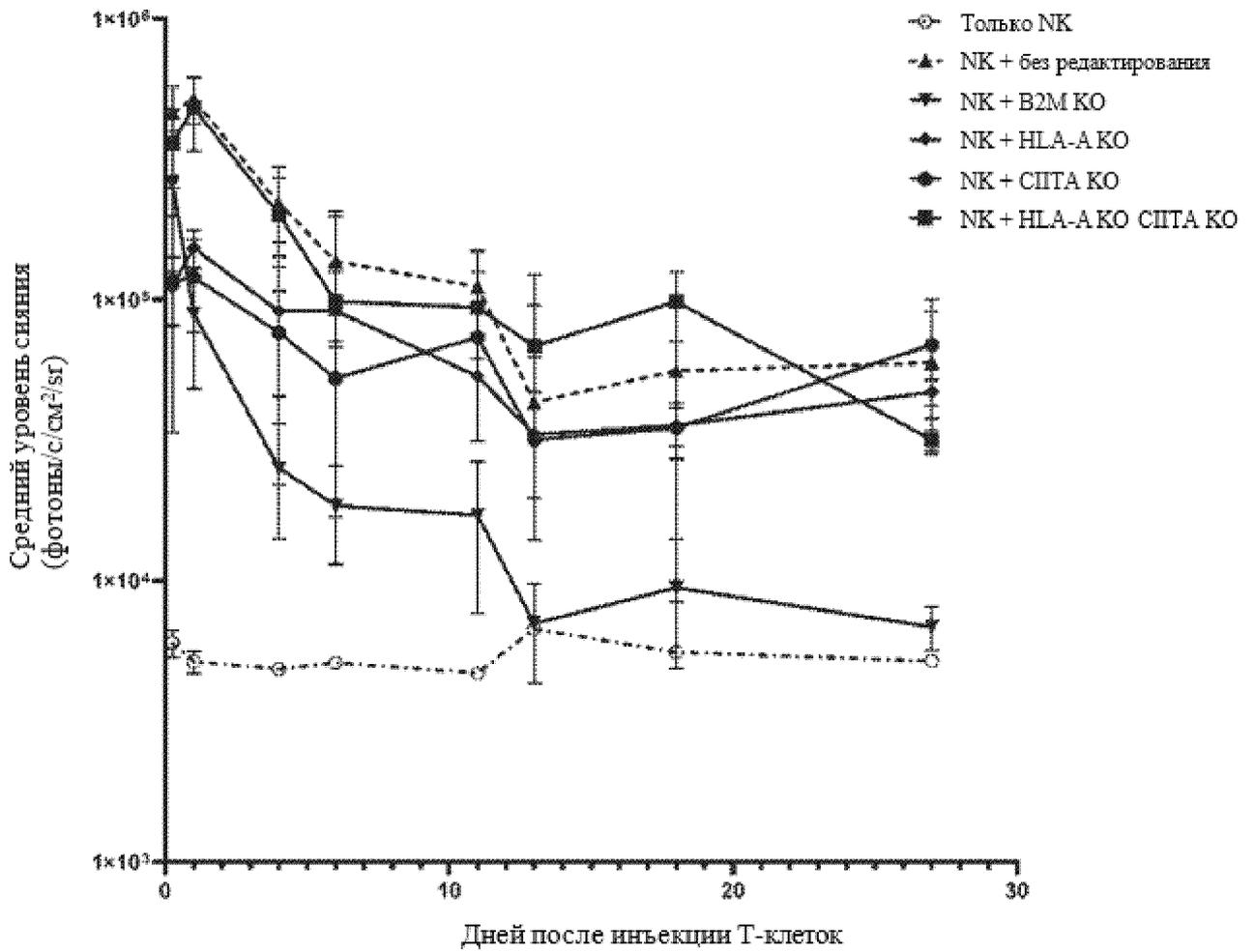
10/26



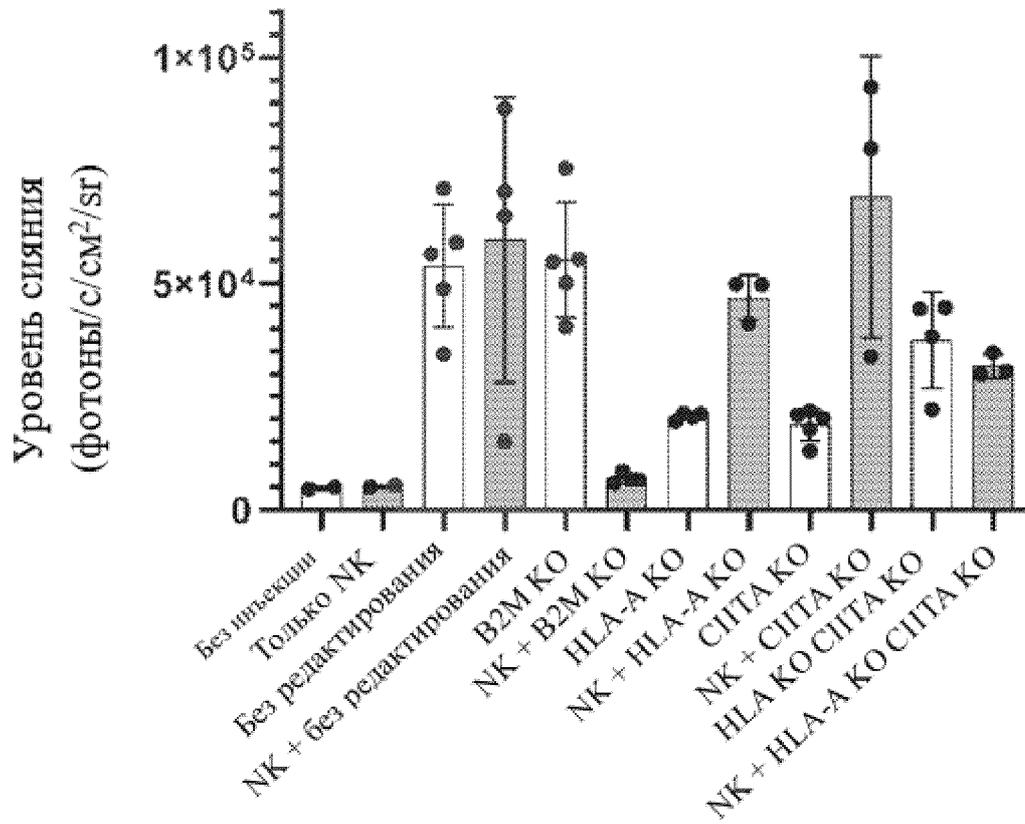
Фиг. 5С



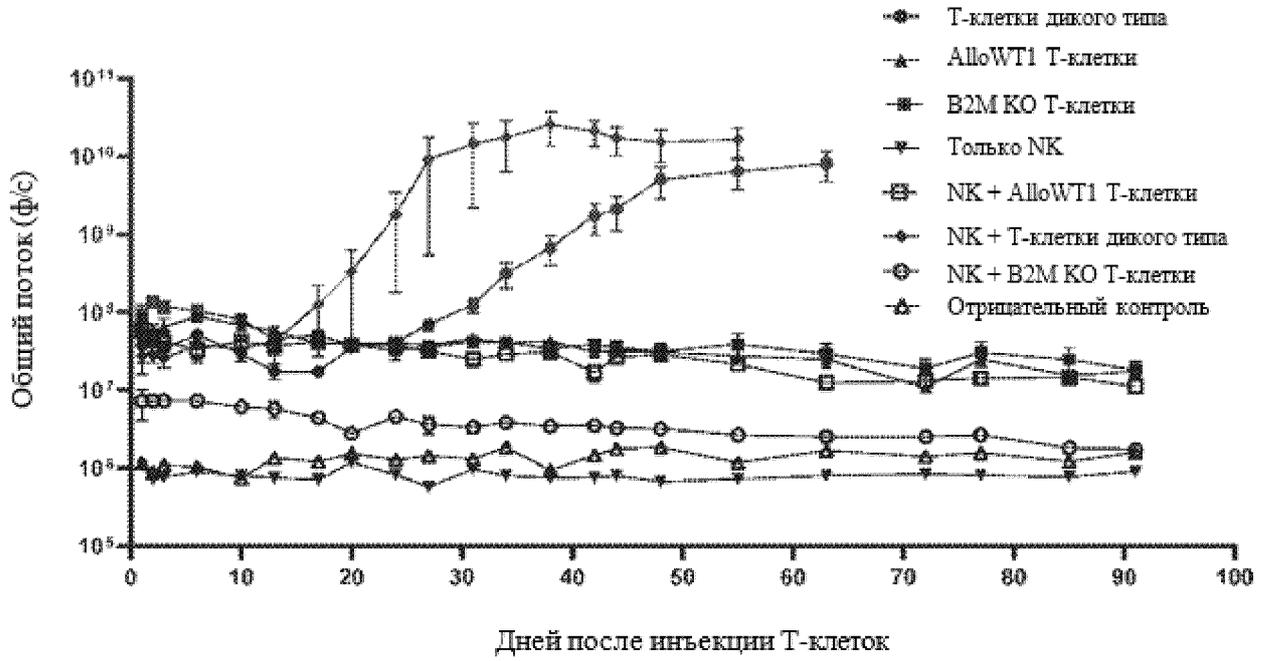
Фиг. 5D



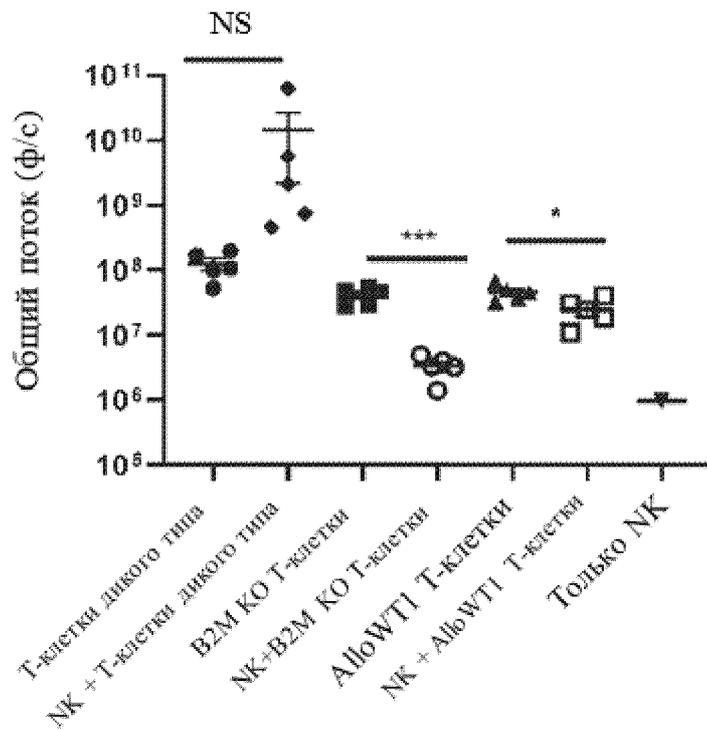
Фиг. 6А



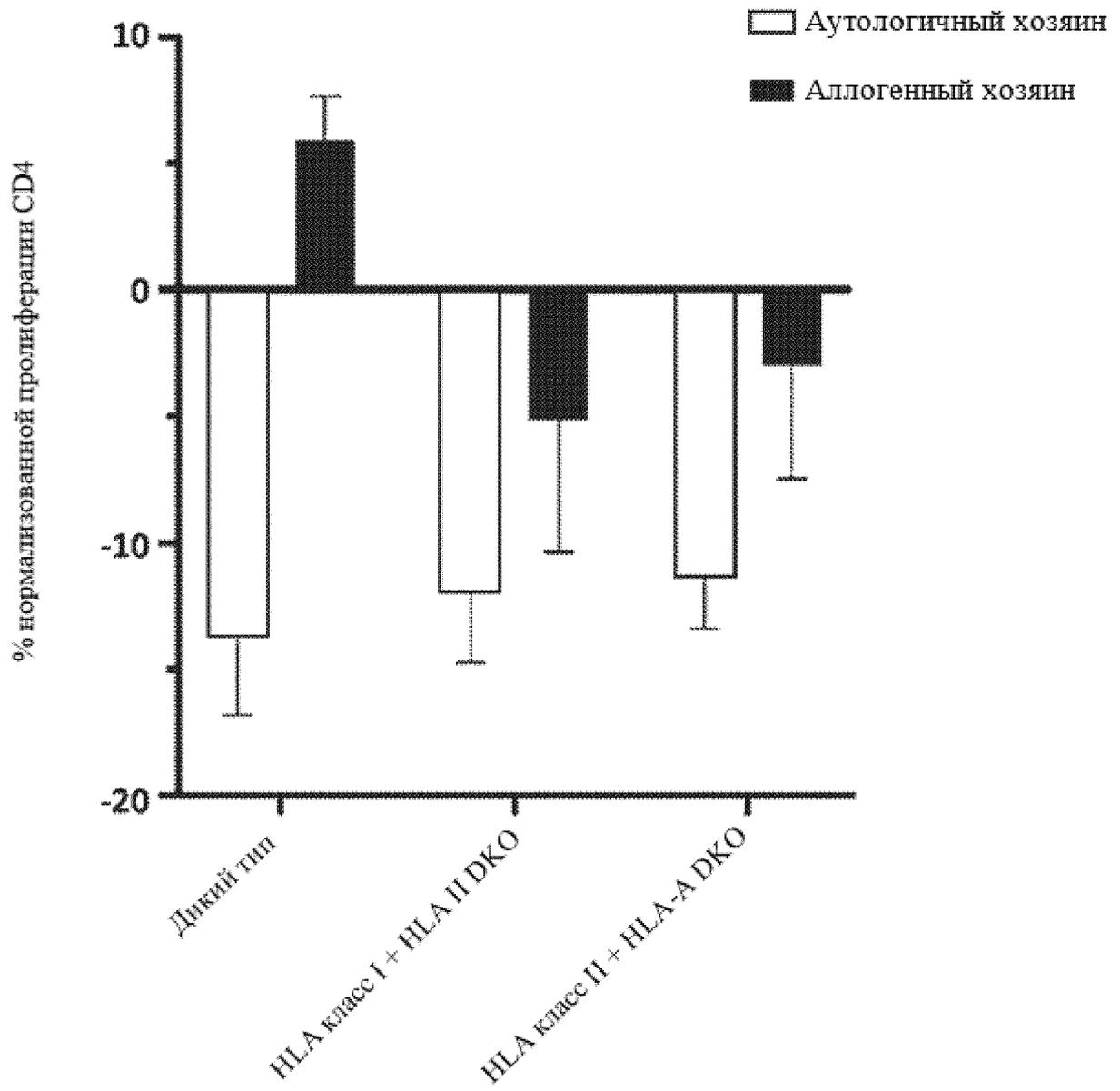
Фиг. 6В



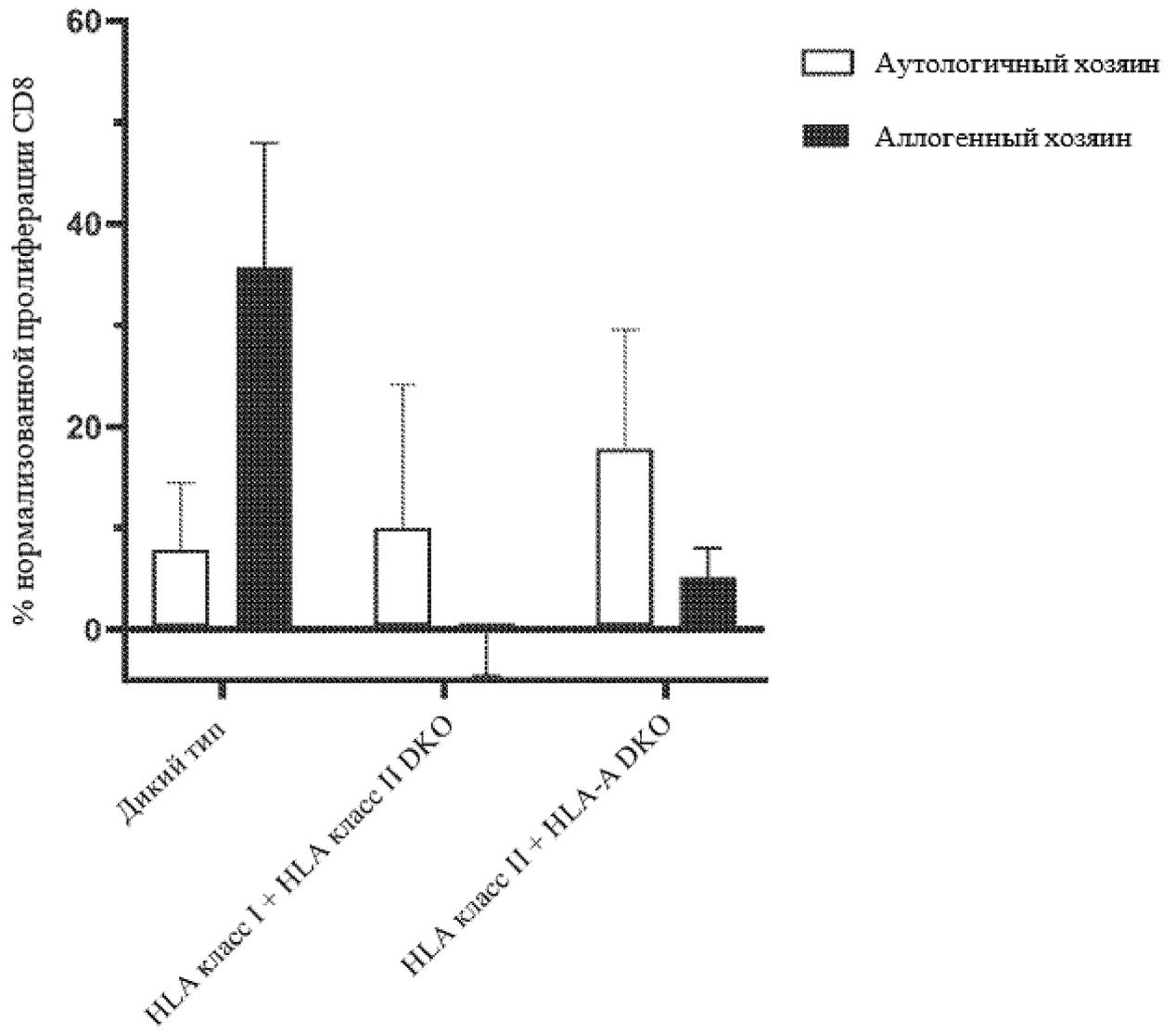
Фиг. 7А



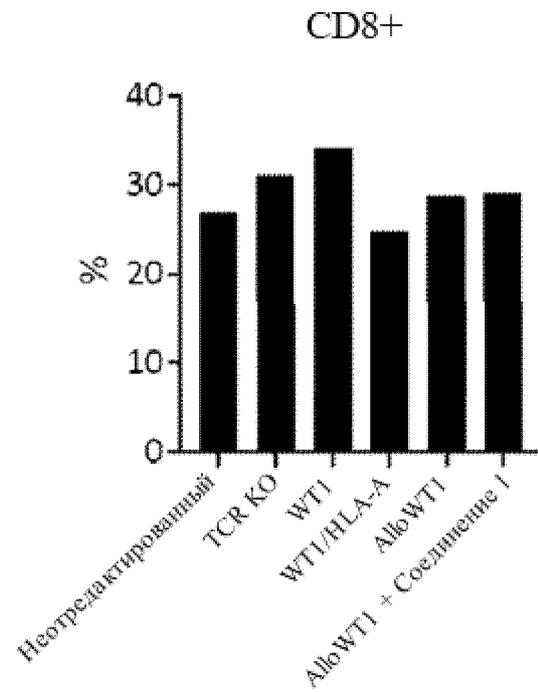
Фиг. 7В



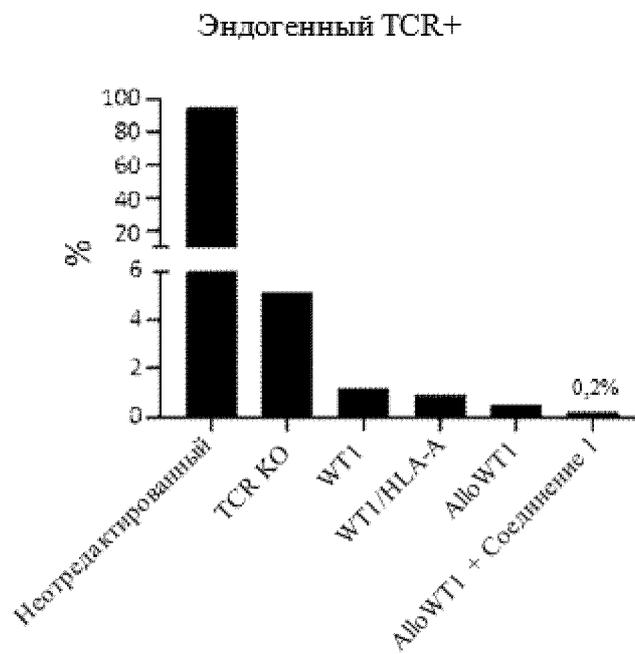
Фиг. 8А



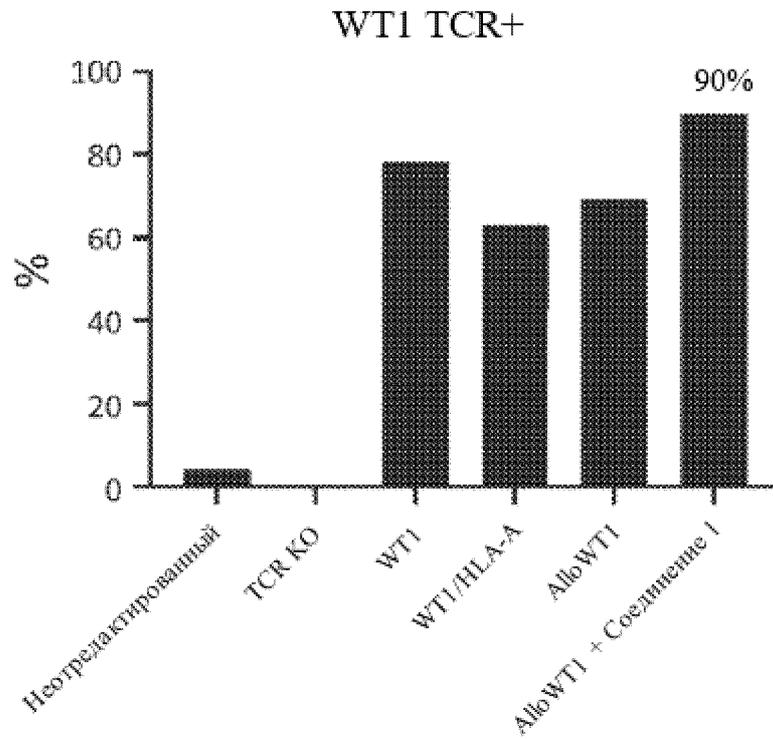
Фиг. 8B



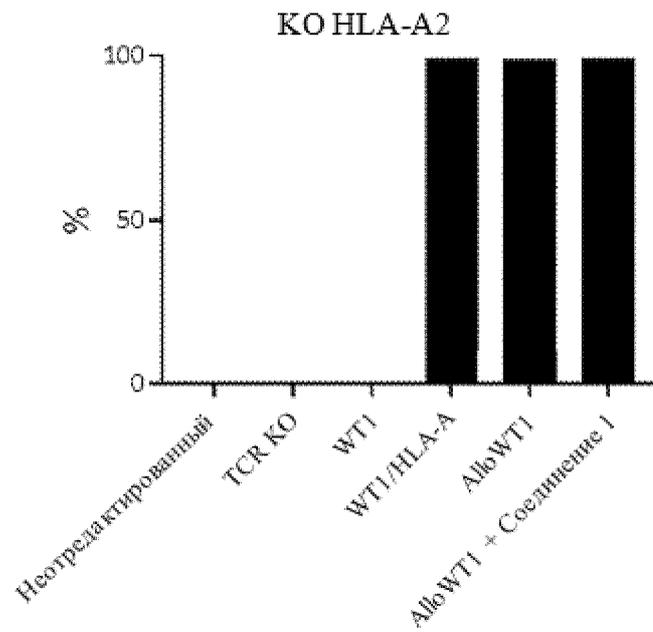
Фиг. 9А



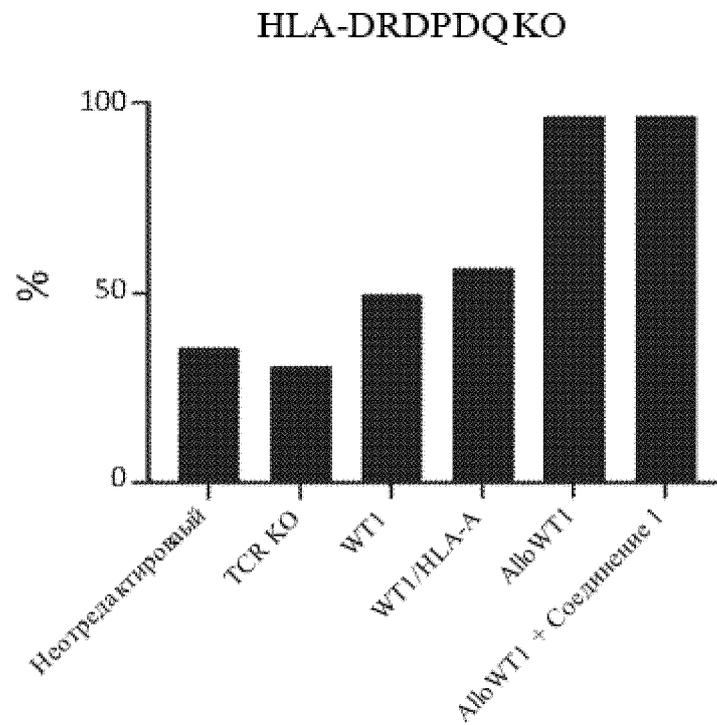
Фиг.9В



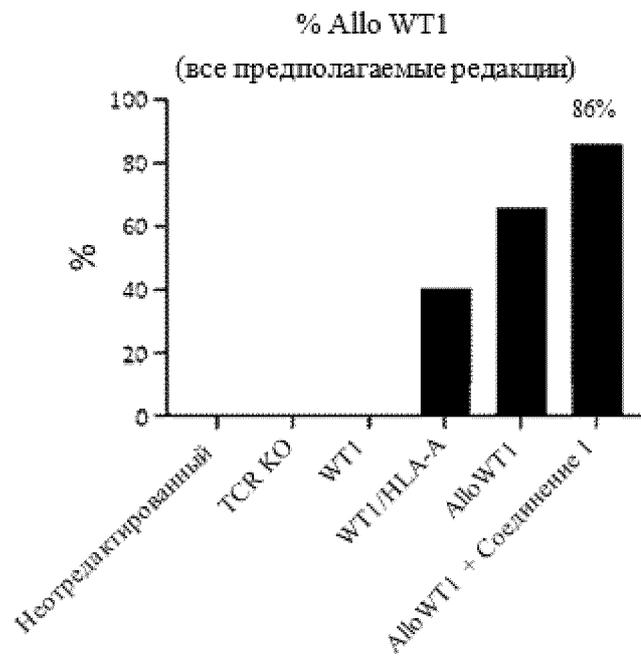
Фиг. 9C



Фиг. 9D



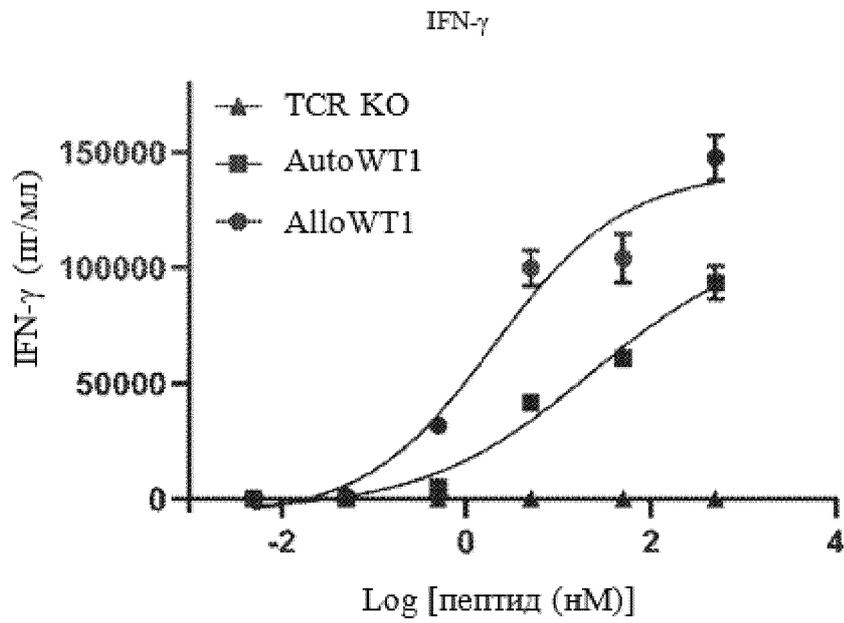
Фиг.9Е



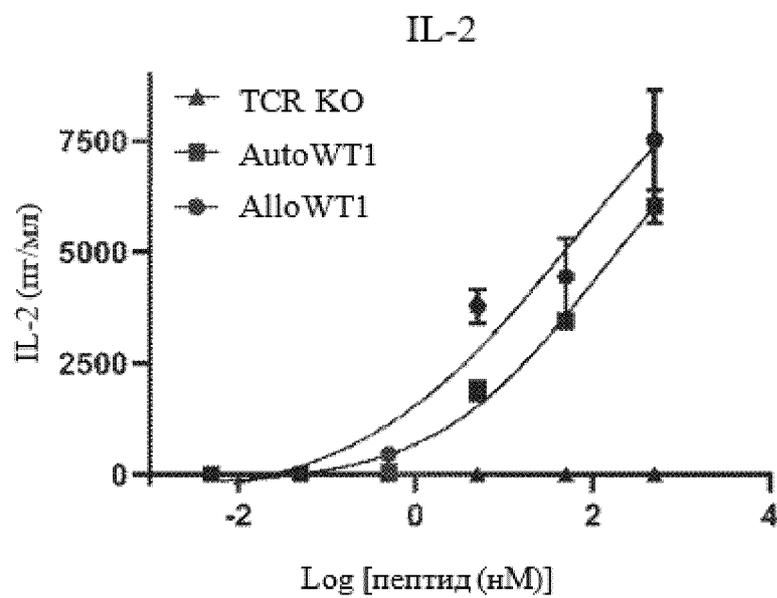
Фиг.9F



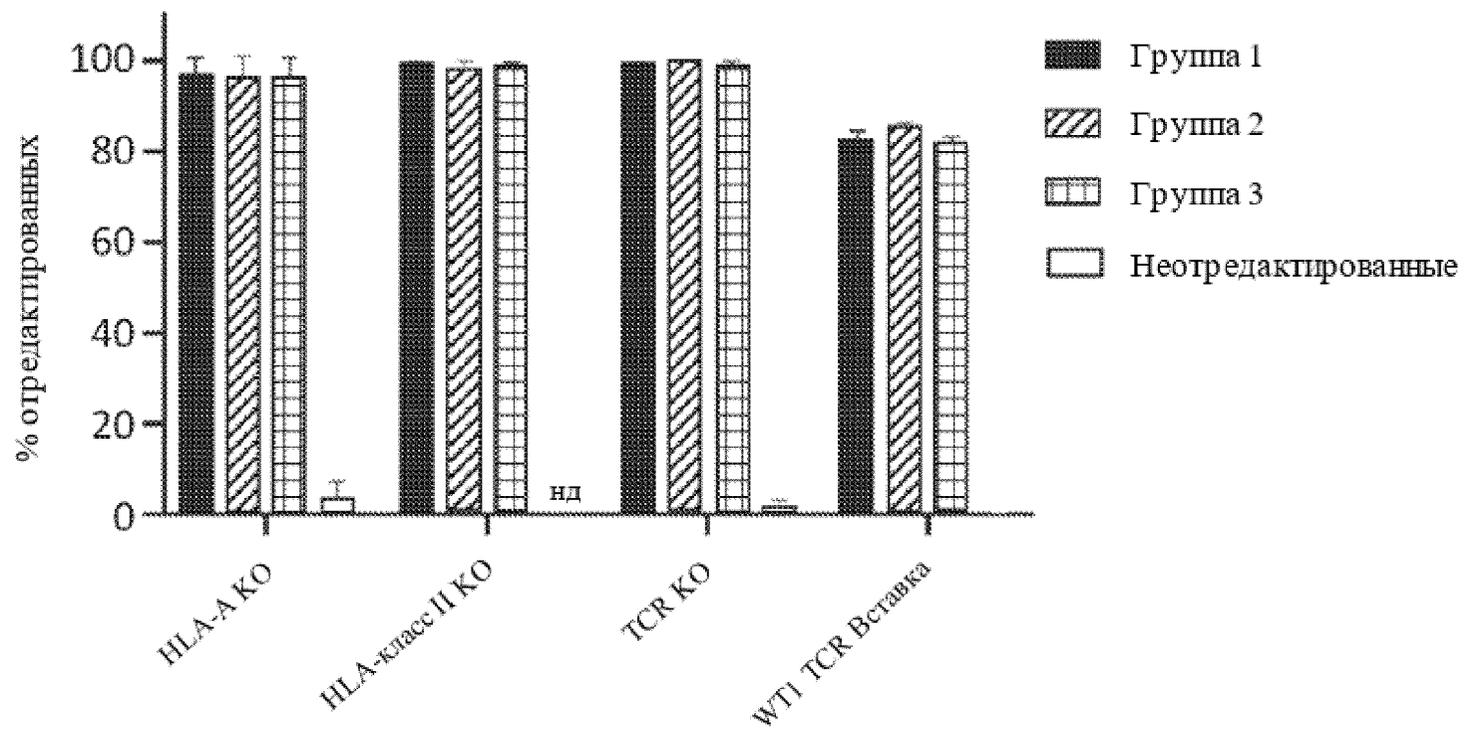
Фиг. 10



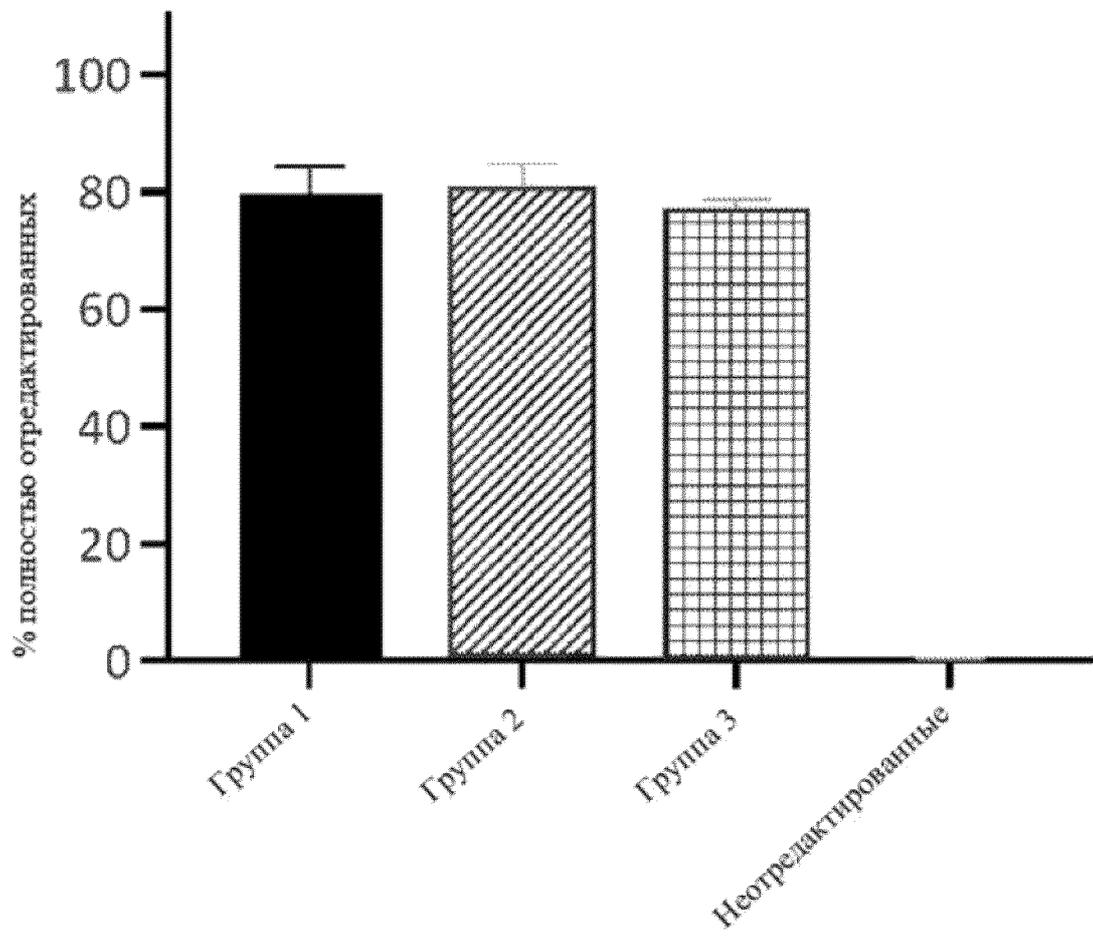
Фиг. 11А



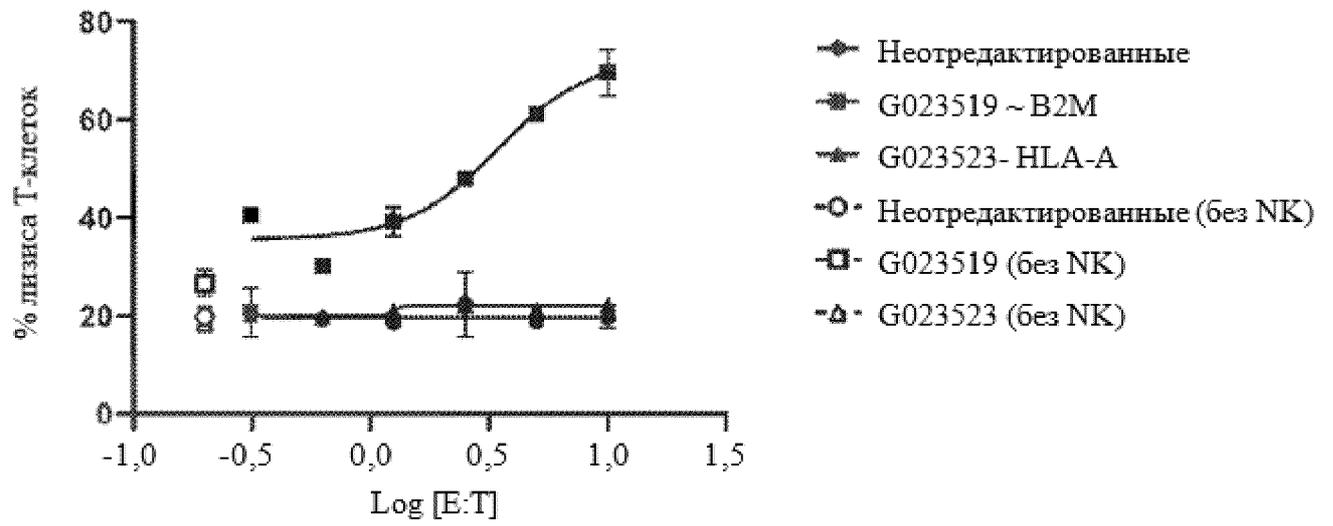
Фиг. 11В



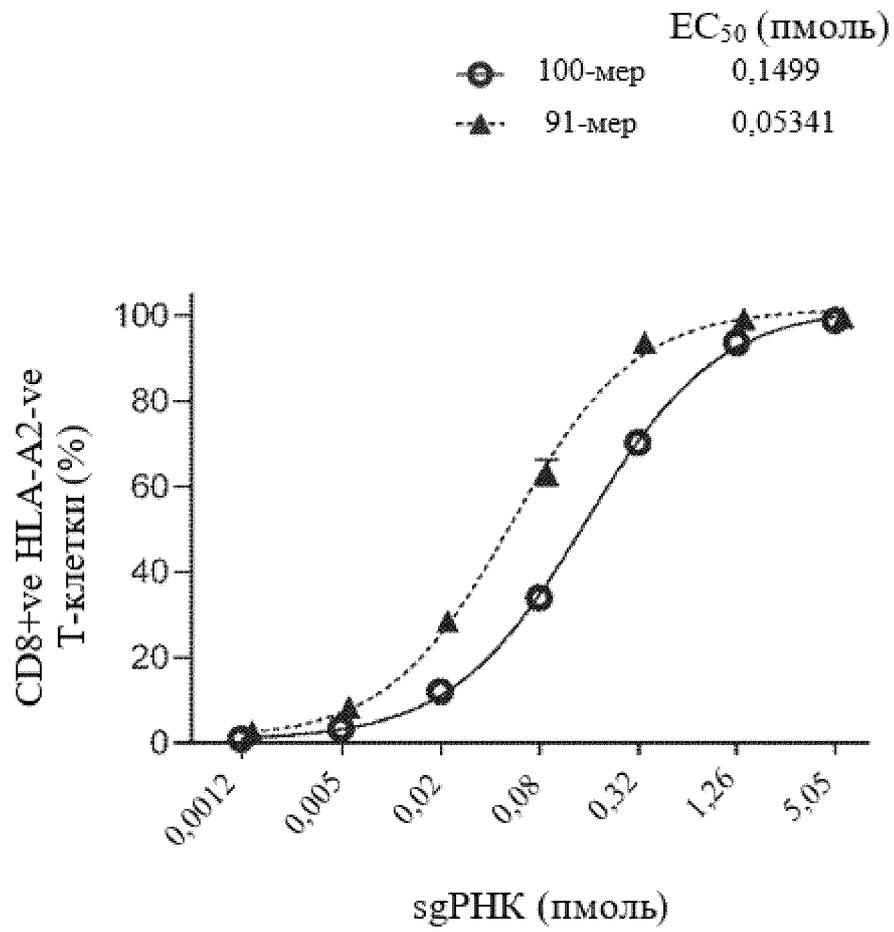
Фиг. 12А



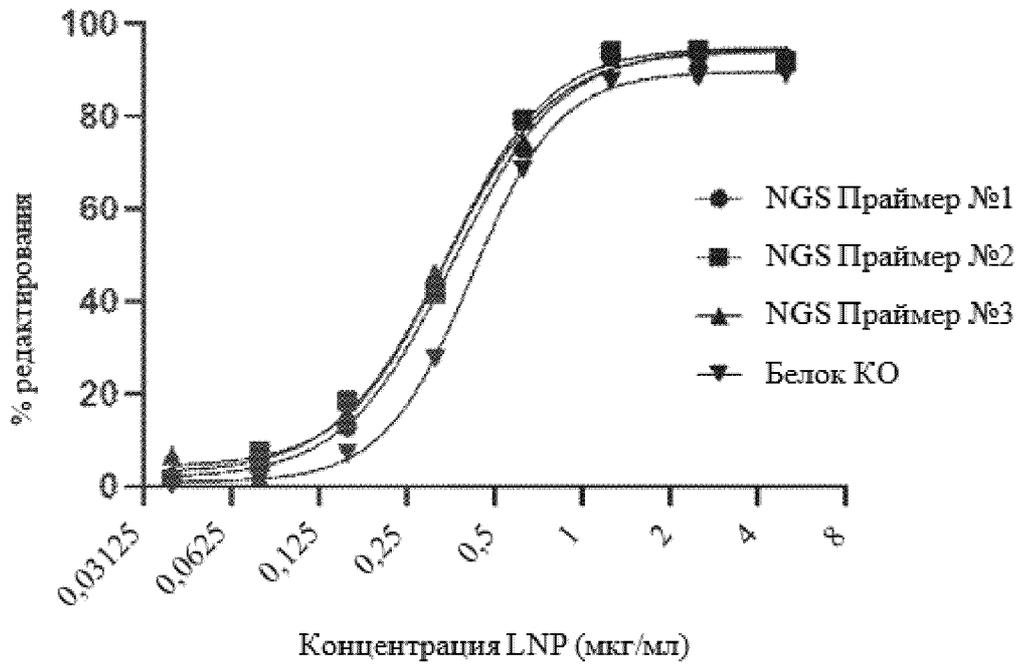
Фиг.12В



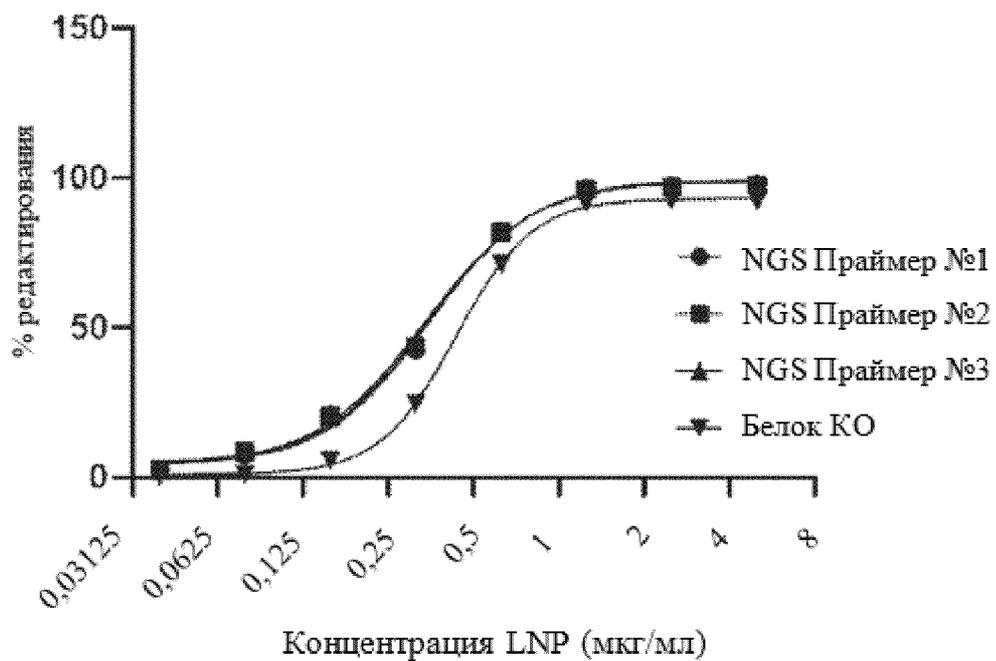
Фиг. 13



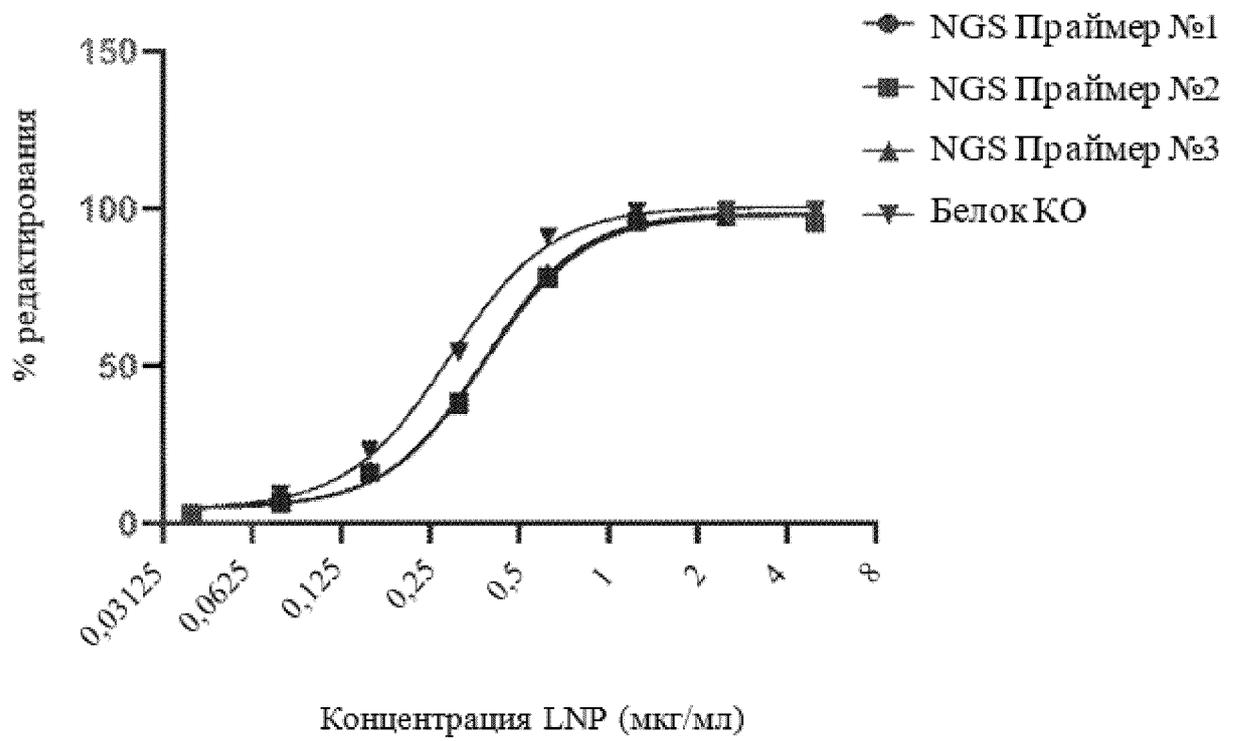
Фиг. 14



Фиг. 15А



Фиг. 15В



Фиг. 15С