

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047969**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.04**

(21) Номер заявки  
**202192265**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.02.14**

(51) Int. Cl. **C12N 5/0783** (2010.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

---

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЕСТЕСТВЕННЫЕ КЛЕТКИ-КИЛЛЕРЫ (НК) ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ**

---

(31) **62/806,457; 62/841,066; 62/841,684;  
62/943,649**

(32) **2019.02.15; 2019.04.30; 2019.05.01;  
2019.12.04**

(33) **US**

(43) **2021.11.19**

(86) **PCT/US2020/018443**

(87) **WO 2020/168300 2020.08.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭДИТАС МЕДИСИН, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Велстед Гордон Грант, Борджес  
Кристофер, Вонг Керри Каваи (US)**

(74) Представитель:  
**Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,  
Парамонова К.В. (RU)**

(56) **US-A1-2018171298  
US-A1-2018273903  
WO-A1-2017017184**

**LI YE ET AL.: "Human iPSC-Derived  
Natural Killer Cells Engineered with Chimeric  
Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity",  
CELL STEM CELL, vol. 23, no. 2, 28 June  
2018 (2018-06-28), pages 181-192.e5, XP055700643,  
ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2018.06.002,  
cited in the application**

**OBERSCHMIDT O ET AL.: "Redirected  
Primary Human Chimeric Antigen Receptor  
Natural Killer Cells As an "Off-the-Shelf  
Immunotherapy" for Improvement in Cancer  
Treatment", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 8,  
654, 9 June 2017 (2017-06-09), XP055438713, DOI:  
10.3389/fimmu.2017.00654, cited in the application,  
the whole document**

**WO-A2-2019112899  
WO-A1-2019217956**

---

(57) Настоящее изобретение направлено на получение НК-клеток (или других лимфоцитов) из индуцированных плюрипотентных клеток, которые происходили из клеток, например Т-клеток, созревших в процессе развития, и варианты их применения для иммунотерапии.

---

**B1**

**047969**

**047969 B1**

### Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/806457, поданной 15 февраля 2019 г.; предварительной заявке на патент США № 62/841066, поданной 30 апреля 2019 г.; предварительной заявке на патент США № 62/841684, поданной 1 мая 2019 г.; и предварительной заявке на патент США № 62/943649, поданной 4 декабря 2019 г., полное содержание каждой из которых явным образом включено в данный документ посредством ссылки.

### Предпосылки изобретения

НК-клетки являются применимыми для иммунотерапевтических подходов, например в контексте иммуноонкологии. НК-клетки представляют собой тип цитотоксических врожденных лимфоцитов. НК-клетки играют важную роль в опухолевом иммунитете, а цитотоксическая активность НК-клеток строго регулируется сетью активирующих и ингибирующих путей (см., например, Gras Navarro A, Bjorklund AT and Chekenya M (2015) *Front. Immunol.* 6:202; включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Сообщалось об использовании встречающихся в природе или модифицированных НК-клеток в иммунотерапевтических подходах, например, посредством аутологичного или аллогенного переноса НК-клеток, и хотя некоторый успех был достигнут, такие подходы обычно характеризуются субоптимальным ответом НК-клеток. В контексте иммуноонкологии считается, что такой субоптимальный ответ по меньшей мере частично связан с использованием опухолями ингибиторных путей НК-клеток для подавления активности цитотоксических НК-клеток, ограничения инвазии НК-клеток и/или ингибирования пролиферации и выживания НК-клеток. Таким образом, применение НК-клеток в терапии солидных опухолей имело ограниченный успех.

Был проведен начальный этап работы в попытке сфокусировать ответ НК-клеток на конкретных клетках, например, путем экспрессии химерного антигенного рецептора в НК-клетках, который нацеливает НК-клетки на опухолевые клетки, или путем модуляции активирующих или ингибирующих путей НК-клеток для достижения более сильного и/или более устойчивого ответа НК-клеток. См., например, Jing Y, et al. (2015) *PLoS ONE* 10(3):e0121788; и Oberschmidt O, Kloess S and Koehl U (2017) *Front. Immunol.* 8:654; включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В поисках готовой к использованию терапии аллогенными НК-клетками, которую можно было бы использовать в комбинации с терапевтическими антителами, была разработана линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в которой клетки экспрессируют усиленную версию CD16 (hCD16), и НК-клетки были получены из этой линии iPSC. См., например, Li et al., *Cell Stem Cell.* 2018 Aug 2;23(2):181-192.e5; включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Однако на сегодняшний день все эти подходы имеют ограниченный успех.

Следовательно, остается потребность в разработке более эффективных терапевтических подходов к иммунотерапии.

### Краткое описание изобретения

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены композиции, клетки, популяции клеток, способы, стратегии и методы лечения, которые являются применимыми в контексте иммунотерапевтических подходов, например терапевтических подходов в иммуноонкологии. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает модифицированные НК-клетки (или другие лимфоциты), которые можно использовать в терапии НК-клетками, например в контексте иммунотерапевтических подходов. В некоторых вариантах осуществления клетки и популяции клеток, предусмотренные в данном документе, характеризуются одной или несколькими модификациями, которые повышают их эффективность в иммунотерапевтических подходах. Например, в некоторых вариантах осуществления предусмотрены НК-клетки, которые содержат одну или несколько модификаций, которые влияют на потерю функции в гене или белке, связанных с ингибированием функции НК-клеток в терапевтическом контексте, и/или одну или несколько модификаций, которые влияют на экспрессию экзогенной нуклеиновой кислоты или белка, связанных с усиленной функцией НК-клеток в терапевтическом контексте. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены модифицированные НК-клетки, которые происходят из индуцированных плюрипотентных клеток (iPSC). НК-клетки, происходящие из iPSC, также называются в данном документе iNK-клетками. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены модифицированные iNK-клетки, которые происходят из соматической клетки, например без ограничения из фибробласта, клетки периферической крови или Т-клетки, созревшей в процессе развития (Т-клетки, которая подверглась селекции в тимусе). В некоторых вариантах осуществления НК- или iNK-клетки, предусмотренные в данном документе, содержат одно или несколько геномных изменений, например вставки/делеции или вставки экзогенных конструкций нуклеиновой кислоты, полученные в результате разрезания геномного локуса с помощью РНК-направляемой нуклеазы. Использование технологии РНК-направляемой нуклеазы в контексте получения модифицированных НК- или iNK-клеток позволяет конструировать сложные изменения с улучшенными характеристиками, актуальными для клинических применений.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены сложные стратегии редактирования и полученные в результате НК-клетки, имеющие сложные геномные изменения, которые обеспечивают возможность получения передовых продуктов на основе НК-клеток для клинических применений, на-

пример, для терапевтических подходов в иммуноонкологии. В некоторых вариантах осуществления модифицированные NK-клетки, предусмотренные в данном документе, могут служить в качестве готового к использованию клинического решения для пациентов, имеющих или которым диагностировали гиперпролиферативное заболевание, такое как, например, рак. В некоторых вариантах осуществления модифицированные NK-клетки демонстрируют повышенные выживаемость, пролиферацию, уровень ответа NK-клеток, продолжительность ответа NK-клеток, устойчивость к истощению NK-клеток и/или распознавание мишени по сравнению с немодифицированными NK-клетками. Например, модифицированные NK-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии представляющего интерес химерного антигенного рецептора (CAR), например, CAR, нацеленного на мезотелин, EGFR, HER2 и/или MICA/B; экспрессии варианта CD16, например, не встречающегося в природе варианта CD16, такого как, например, hnCD16 (см., например, Zhu et al., Blood 2017, 130:4452, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте); экспрессии продукта слияния IL15/IL15RA; потере функции рецептора 2 TGF-beta (TGFbetaR2) и/или экспрессии доминантно-негативного варианта TGFbetaR2; потере функции ADORA2A; потере функции B2M; экспрессии HLA-G; потере функции CИТА; потере функции PD1; потере функции TIGIT; и/или потере функции CISH; или к любой комбинации двух или более из них в модифицированной NK-клетке. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TGFbetaR2 и потере функции CISH. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TGFbetaR2 и потере функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TGFbetaR2 и потере функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TGFbetaR2 и потере функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции CISH и потере функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции CISH и потере функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции CISH и потере функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TIGIT и потере функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TIGIT и потере функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции ADORA2A и потере функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TGFbetaR2, потере функции CISH и потере функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TGFbetaR2, потере функции CISH и потере функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TGFbetaR2, потере функции CISH и потере функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TGFbetaR2, потере функции TIGIT и потере функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TGFbetaR2, потере функции TIGIT и потере функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции ADORA2A и потере функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции CISH, потере функции TIGIT и потере функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции CISH, потере функции TIGIT и потере функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции CISH, потере функции ADORA2A и потере функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная NK-клетка содержит геномные изменения, которые приводят к потере функции TIGIT, потере функции ADORA2A и потере функции NKG2A. В некоторых вариантах осуществления модифицированные NK-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии экзогенного варианта CD16, например, hnCD16, экспрессии экзогенного продукта слияния IL15/IL15RA, экспрессии экзогенного HLA-G, экспрессии экзогенного DN-TGFbetaR2, потере функции в TGFbetaR2, потере функции в B2M, потере функции PD1, потере функции TIGIT и/или потере функции ADORA2A. В некоторых вариантах осуществления модифицированные NK-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии экзогенного варианта CD16, например, hnCD16, экспрессии экзогенного продукта слияния IL15/IL15RA, экспрессии экзогенного HLA-G, экспрессии экзогенного DN-TGFbetaR2, экспрессии растворимого MICA и/или MICB, потере функции в TGFbetaR2, потере функции в B2M, потере функции PD1, потере функции TIGIT и/или потере функции

## ADORA2A.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии экзогенного варианта CD16, например, hnCD16, экспрессии экзогенного продукта слияния IL15/IL15RA, экспрессии экзогенного HLA-G, экспрессии экзогенного DN-TGFbetaR2, экспрессии растворимого MICA и/или MICB, экспрессии экзогенного IL-12, экспрессии экзогенного IL-18, потере функции в TGFbetaR2, потере функции в B2M, потере функции PD1, потере функции TIGIT и/или потере функции ADORA2A.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии экзогенного варианта CD16, например, hnCD16, экспрессии экзогенного продукта слияния IL15/IL15RA, экспрессии экзогенного HLA-G, экспрессии экзогенного DN-TGFbetaR2, экспрессии экзогенного IL-12, экспрессии экзогенного IL-18, потере функции в TGFbetaR2, потере функции в B2M, потере функции PD1, потере функции TIGIT и/или потере функции ADORA2A. В одном аспекте настоящее изобретение включает модифицированный лимфоцит, где модифицированный лимфоцит не экспрессирует эндогенные CD3, CD4 и/или CD8; и экспрессирует по меньшей мере один эндогенный ген, кодирующий (i) CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45; (ii) рецептор НК-клеток (кластер дифференцировки 16 (CD16)); (iii) представителя D группы 2 белков естественных киллеров, (NKG2D); (iv) CD69; (v) естественный рецептор цитотоксичности или любую комбинацию двух или более из них; где модифицированный лимфоцит дополнительно (1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую (i) химерный антигенный рецептор (CAR); (ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (FcγRIII, CD16); (iii) интерлейкин 15 (IL-15); (iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант; (v) интерлейкин 12 (IL-12); (vi) рецептор интерлейкина-12 (IL-12R) или его вариант; (vii) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G); (viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E); (ix) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47); или любую комбинацию двух или более из них; и/или (2) демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного из (i) рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGFβR2); (ii) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A); (iii) Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT); (iv) микроглобулина β-2 (B2M); (v) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1); (vi) цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH); (vii) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СIТА); (viii) рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров); (ix) двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II; (x) кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B); (xi) константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC); или любой комбинации двух или более из них. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFPR2 и потерю функции CISH. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции CISH и потерю функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции CISH и потерю функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции CISH и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции CISH и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH, потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH, потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH, потерю функции ADORA2A и потерю функ-

ции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TIGIT, потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A.

В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит не экспрессирует эндогенные CD3, CD4 и/или CD8; и экспрессирует по меньшей мере один эндогенный ген, кодирующий (i) CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45; (ii) рецептор NK-клеток (кластер дифференцировки 16 (CD16)); (iii) представителя D группы 2 белков естественных киллеров, (NKG2D); (iv) CD69; (v) естественный рецептор цитотоксичности или любую комбинацию двух или более из них; где модифицированный лимфоцит дополнительно (1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую (i) химерный антигенный рецептор (CAR); (ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (FcγRIII, CD16); (iii) интерлейкин 15 (IL-15); (iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант; (v) интерлейкин 12 (IL-12); (vi) рецептор интерлейкина-12 (IL-12R) или его вариант; (vii) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G); (viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E); (ix) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47); или любую комбинацию двух или более из них; и/или (2) демонстрирует потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGFβR2), цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH), или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой экспрессионную конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую продукт гена, указанный в пунктах (1)(i)-(1)(ix), или любую их комбинацию, функционально связанную с промотором, управляющим экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-мишени, например в модифицированном лимфоците, например в модифицированной NK-клетке, предусмотренной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор специфически экспрессируется в клетке-мишени, например, промотор представляет собой промотор, специфичный в отношении лимфоцитов или NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CD56 (NCAM). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CD49. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CD45. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор FcγRIII. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор NKG2D. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CD69.

В некоторых вариантах осуществления экзогенная конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая продукт гена, указанный в (1), встраивается в геномный локус, кодирующий продукт гена, указанный в (2), что приводит к потере функции продукта гена, указанного в (2) и экспрессии продукта гена, кодируемого экзогенной конструкцией нуклеиновой кислоты, управляемой либо гетерологичным промотором, либо эндогенным промотором геномного локуса, в который встраивается экзогенная конструкция нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления экзогенная конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая продукт гена, указанный в (1), встраивается в локус "безопасной гавани", например, локус ROSA26, локус коллагена или геномный локус AAVSI. В некоторых вариантах осуществления два или более гена альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II выбраны из HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-DQA2 и HLA-DOA. В некоторых вариантах осуществления два или более гена бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II выбраны из HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DQB3, HLA-DQB2, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 и HLA-DRB5.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит содержит перестроенный эндогенный локус T-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления перестроенный TCR содержит перестройки в частях VJ TCRα и/или V(D)J TCRβ и полные экзоны V-домена. В некоторых вариантах осуществления естественный рецептор цитотоксичности представляет собой NKp30, NKp44, NKp46 и/или CD158b. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15R представляет собой конститутивно активный вариант IL-15R. В некоторых вариантах осуществления конститутивно активный вариант IL-15R представляет собой продукт слияния IL-15R и агониста IL-15R, например, белка IL-15 или его фрагмента, связывающего IL-15R. В некоторых вариантах осуществления агонист IL-15R представляет собой IL-15 или его вариант, связывающий IL-15R. Иллюстративные подходящие варианты IL-15R включают без ограничения варианты, описанные, например, в Mortier E et al, 2006; The Journal of Biological Chemistry 2006 281: 1612-1619; или в Bessard-A et al., Mol Cancer Ther. 2009 Sep;8(9):2736-45, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные подходящие варианты будут очевидны специалистам в данной области техники на основе настоящего изобретения и знаний в данной области техники. Настоящее изобретение не ограничивается в этом отношении.

В некоторых вариантах осуществления TGFβR2 представляет собой доминантно-негативный вариант рецептора II TGFβ (DN-TGFβR2).

В некоторых вариантах осуществления CAR способен связывать мезотелин, EGFR, HER2, MICA/B, BCMA, CD19, CD22, CD20, CD33, CD123, андрогенный рецептор, PSMA, PSCA, Muc1, вирусные пепти-

ды HPV (т.е. E7), вирусные пептиды EBV, CD70, WT1, CEA, EGFRvIII, IL13R $\alpha$ 2, GD2, CA125, CD7, Ep-CAM, Muc16 и/или CD30.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит происходит из плюрипотентной или мультипотентной стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления мультипотентная стволовая клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (HSC). В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC). В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку (ESC).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит происходит из плюрипотентной или мультипотентной стволовой клетки, которая содержит по меньшей мере одну или несколько экзогенных конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих любой из (1)(i)-(1)(ix) или любую их комбинацию; и/или по меньшей мере одно геномное изменение, которое обуславливает потерю функции любого из (2)(i)-(2)(xi) или любой их комбинации в лимфоците.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит происходит из плюрипотентной или мультипотентной стволовой клетки, которая содержит по меньшей мере одно геномное изменение, которое обуславливает потерю функции любого из (2)(i)-(2)(xi) или любой их комбинации в лимфоците.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно геномное изменение, которое обуславливает потерю функции одного или нескольких из (2)(i)-(2)(xi) в лимфоците, включает вставку экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления экзогенная конструкция нуклеиновой кислоты кодирует любой из (1)(i)-(1)(ix) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции двух или более генов/белков, указанных в (2).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит содержит вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеотидной конструкции в геномный локус, несущий ген или кодирующий белок, указанные в (2).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит содержит вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеотидной конструкции в два или более геномных локуса, несущих ген или кодирующих белок, указанные в (2).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит был получен путем редактирования геномного локуса с помощью РНК-направляемой нуклеазы. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза выбрана из группы, состоящей из SpCas9, SaCas9, (KKH) SaCas9, AsCpf1 (AsCas12a), LbCpf1, (LbCas12a), CasX, CasY, Cas12h1, Cas12i1, Cas12c1, Cas12c2, eSpCas9, Cas9-HF1, HypaCas9, dCas9-Fok1, Sniper-Cas9, xCas9, AaCas12b, evoCas9, SpCas9-NG, VRQR, VRER, NmeCas9, CjCas9, BhCas12b и BhCas12b V4.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит получен путем редактирования двух или более геномных локусов, несущих гены, кодирующие любой из белков, указанных в (2). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из двух или более геномных локусов, несущих гены, кодирующие любой из белков, указанных в (2), были отредактированы другой РНК-направляемой нуклеазой.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из двух или более геномных локусов, несущих гены, кодирующие любой из белков, указанных в (2), был отредактирован с помощью Cas9, и где по меньшей мере один из локусов был отредактирован с помощью Cpf1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит экспрессирует эндогенные CD56, CD49 и CD45.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный лимфоцит представляет собой естественную клетку-киллера (NK).

В другом аспекте настоящее изобретение включает модифицированную клетку, где модифицированная клетка (1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую (i) химерный антигенный рецептор (CAR); (ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (Fc $\gamma$ RIII, кластер дифференцировки 16 (CD16)); (iii) интерлейкин 15 (IL-15); (iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант; (v) интерлейкин 12 (IL-12); (vi) рецептор IL-12 (IL-12R) или его вариант; (vii) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G); (viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E); (ix) поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47); или любую комбинацию двух или более из них; и/или (2) демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного из (i) рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ R2); (ii) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A); (iii) Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT); (iv) микроглобулина  $\beta$ -2 (B2M); (v) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1); (vi) цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH); (vii) трансактиватора главного комплекса

гистосовместимости класса II (СИТА); (viii) рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров); (ix) двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II; (x) кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B); (xi) константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC); или любой комбинации двух или более из них. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFβR2 и потерю функции CISH. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции CISH и потерю функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции CISH и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции CISH и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции CISH и потерю функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции CISH и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции CISH и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции CISH, потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции CISH, потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции CISH, потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированная клетка демонстрирует потерю функции TIGIT, потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A.

В одном варианте осуществления модифицированная клетка (1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую (i) химерный антигенный рецептор (CAR); (ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (FcγRIII, кластер дифференцировки 16 (CD16)); (iii) интерлейкин 15 (IL-15); (iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант; (v) интерлейкин 12 (IL-12); (vi) рецептор IL-12 (IL-12R) или его вариант; (vii) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G); (viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E); (ix) поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47); или любую комбинацию двух или более из них, и/или (2) демонстрирует потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGFβR2), цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH), или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления модифицированных клеток, содержащих экзогенные конструкции нуклеиновых кислот, например, модифицированных лимфоцитов, предусмотренных в данном документе, экзогенная конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой экспрессионную конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую продукт гена, указанный в пунктах (1)(i)-(1)(x), или любую их комбинацию, функционально связанную с промотором, управляющим экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-мишени, например, в модифицированном лимфоците, например, в модифицированной НК-клетке, предусмотренной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор специфически экспрессируется в клетке-мишени, например, промотор представляет собой промотор, специфичный в отношении лимфоцитов или НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CD56 (NCAM). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CD49. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CD45. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор FcγRIII. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор NKG2D. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CD69. В некоторых вариантах осуществления модифицированных клеток, например модифицированных лимфоцитов, предусмотренных в данном документе, экзогенная конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая продукт гена, указанный в (1), встраивается в геномный локус, кодирующий продукт гена, указанный в (2), что приводит к потере функции продукта гена, указанного в (2) и экспрессии продукта гена, кодируемого экзогенной конструкцией нуклеиновой кислоты, управляемой либо гетеро-

логичным промотором, либо эндогенным промотором геномного локуса, в который встраивается экзогенная конструкция нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления модифицированных клеток, например модифицированных лимфоцитов, предусмотренных в данном документе, содержащих потерю функции двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II, два или более гена альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II выбраны из HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-DQA2 и HLA-DOA. В некоторых вариантах осуществления два или более гена бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II выбраны из HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DQB3, HLA-DQB2, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 и HLA-DRB5.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой iNK-клетку.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка представляет собой мультипотентную или плюрипотентную стволовую клетку, например, iPS-клетку, или гемопоэтическую стволовую клетку, или дифференцированную клетку, происходящую из такой мультипотентной или плюрипотентной стволовой клетки, например, iNK-клетку.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка не экспрессирует эндогенный корецептор Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка содержит перестроенный эндогенный локус TCR, где перестроенный TCR содержит перестройки в частях VJ TCR $\alpha$  и/или V(D)J TCR $\beta$  и полные экзоны V-домена.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка экспрессирует по меньшей мере один эндогенный ген, кодирующий (i) CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45; (ii) рецептор NK-клеток (кластер дифференцировки 16 (CD16)); (iii) представителя D группы 2 белков естественных киллеров, (NKG2D); (iv) CD69; (v) естественный рецептор цитотоксичности или любую комбинацию двух или более из них.

В некоторых вариантах осуществления естественный рецептор цитотоксичности представляет собой NKp30, NKp44, NKp46 и/или CD158b.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка экспрессирует по меньшей мере один биомаркер NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления биомаркер NK-клеток представляет собой CD56, CD49 и/или CD45.

В одном аспекте в данном документе раскрыта популяция клеток, содержащая модифицированный лимфоцит, описанный в данном документе, или модифицированные клетки, описанные в данном документе.

В одном аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, описанную в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена выделенная популяция лимфоцитов, где популяция содержит по меньшей мере  $1 \times 10^3$ , по меньшей мере  $1 \times 10^4$ , по меньшей мере  $1 \times 10^5$ , по меньшей мере  $2 \times 10^5$ , по меньшей мере  $3 \times 10^5$ , по меньшей мере  $4 \times 10^5$ , по меньшей мере  $5 \times 10^5$ , по меньшей мере  $1 \times 10^6$ , по меньшей мере  $2 \times 10^6$ , по меньшей мере  $3 \times 10^6$ , по меньшей мере  $4 \times 10^6$ , по меньшей мере  $5 \times 10^6$ , по меньшей мере  $1 \times 10^7$ , по меньшей мере  $1 \times 10^7$ , по меньшей мере  $2 \times 10^7$ , по меньшей мере  $3 \times 10^7$ , по меньшей мере  $4 \times 10^7$ , по меньшей мере  $5 \times 10^7$ , по меньшей мере  $1 \times 10^8$ , по меньшей мере  $2 \times 10^8$ , по меньшей мере  $3 \times 10^8$ , по меньшей мере  $4 \times 10^8$ , по меньшей мере  $5 \times 10^8$ , по меньшей мере  $1 \times 10^9$ , по меньшей мере  $1 \times 10^9$ , по меньшей мере  $2 \times 10^9$ , по меньшей мере  $3 \times 10^9$ , по меньшей мере  $4 \times 10^9$ , по меньшей мере  $5 \times 10^9$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $2 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $3 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $4 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  или по меньшей мере  $1 \times 10^{12}$  клеток, и где по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,9%, по меньшей мере 99,99%, по меньшей мере 99,999% или практически 100% лимфоцитов в популяции (a) содержат перестроенный локус Т-клеточного рецептора (TCR); (b) не экспрессируют эндогенный CD3; (c) экспрессируют эндогенные CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45; и (d) экспрессируют по меньшей мере эндогенный ген, кодирующий (i) рецептор NK-клеток (кластер дифференцировки 16 (CD16)); (ii) член D группы 2 белков естественных киллеров, (NKG2D); (iii) CD69; (iv) естественный рецептор цитотоксичности; или любую комбинацию двух или более из них; и где модифицированный лимфоцит дополнительно (1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую (i) химерный антигенный рецептор (CAR); (ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (Fc $\gamma$ RIII, CD16); (iii) интерлейкин 15 (IL-15); (iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант; (v) интерлейкин 12 (IL-12); (vi) рецептор IL-12 (IL-12R) или его вариант; (vii) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G); (viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);



(ix) поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47); или любую комбинацию двух или более из них; и/или (2) демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного из (i) рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGFR2); (ii) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A); (iii) Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT); (iv) микроглобулина  $\beta$ -2 (B2M); (v) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1); (vi) цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH); (vii) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (CII-TA); (viii) рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров); (ix) двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II; (x) кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B); (xi) константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC); или любой комбинации двух или более из них. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGF $\beta$ R2 и потерю функции CISH. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2 и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH и потерю функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции CISH и потерю функции TIGIT. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции CISH и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции CISH и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TGFbetaR2, потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH, потерю функции TIGIT и потерю функции ADORA2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH, потерю функции TIGIT и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции CISH, потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A. В одном варианте осуществления модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции TIGIT, потерю функции ADORA2A и потерю функции NKG2A.

В одном варианте осуществления выделенная популяция лимфоцитов содержит по меньшей мере  $1 \times 10^3$ , по меньшей мере  $1 \times 10^4$ , по меньшей мере  $1 \times 10^5$ , по меньшей мере  $2 \times 10^5$ , по меньшей мере  $3 \times 10^5$ , по меньшей мере  $4 \times 10^5$ , по меньшей мере  $5 \times 10^5$ , по меньшей мере  $1 \times 10^6$ , по меньшей мере  $2 \times 10^6$ , по меньшей мере  $3 \times 10^6$ , по меньшей мере  $4 \times 10^6$ , по меньшей мере  $5 \times 10^6$ , по меньшей мере  $1 \times 10^7$ , по меньшей мере  $1 \times 10^7$ , по меньшей мере  $2 \times 10^7$ , по меньшей мере  $3 \times 10^7$ , по меньшей мере  $4 \times 10^7$ , по меньшей мере  $5 \times 10^7$ , по меньшей мере  $1 \times 10^8$ , по меньшей мере  $2 \times 10^8$ , по меньшей мере  $3 \times 10^8$ , по меньшей мере  $4 \times 10^8$ , по меньшей мере  $5 \times 10^8$ , по меньшей мере  $1 \times 10^9$ , по меньшей мере  $1 \times 10^9$ , по меньшей мере  $2 \times 10^9$ , по меньшей мере  $3 \times 10^9$ , по меньшей мере  $4 \times 10^9$ , по меньшей мере  $5 \times 10^9$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $2 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $3 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $4 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  или по меньшей мере  $1 \times 10^{12}$  клеток, и где по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,9%, по меньшей мере 99,99%, по меньшей мере 99,999% или практически 100% лимфоцитов в популяции (a) содержат перестроенный locus Т-клеточного рецептора (TCR); (b) не экспрессируют эндогенный CD3; (c) экспрессируют эндогенные CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45; и (d) экспрессируют по меньшей мере эндогенный ген, кодирующий (i) рецептор NK-клеток (кластер дифференцировки 16 (CD16)); (ii) член D группы 2 белков естественных киллеров, (NKG2D); (iii) CD69; (iv) естественный рецептор цитотоксичности; или любую комбинацию двух или более из них; и где модифицированный лимфоцит дополнительно (1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую (i) химерный антигенный рецептор (CAR); (ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (Fc $\gamma$ RIII, CD16); (iii) интерлейкин 15 (IL-15); (iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант; (v) интер-

лейкин 12 (IL-12); (vi) рецептор IL-12 (IL-12R) или его вариант; (vii) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G); (viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E); (ix) поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47); или любую комбинацию двух или более из них; и/или (2) демонстрирует потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ R2), цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH), или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления перестроенный локус TCR содержит перестройки в частях VJ TCR $\alpha$  и/или V(D)J TCR $\beta$  и полные экзоны V-домена. В некоторых вариантах осуществления перестроенный эндогенный локус TCR состоит не более чем из двух перестроенных аллелей.

В некоторых вариантах осуществления естественный рецептор цитотоксичности представляет собой NKp30, NKp44, NKp46 и/или CD158b.

В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов *in vitro* не содержит более чем 1%, более чем 0,1%, более чем 0,001%, более чем 0,0001%, более чем 0,00001%, более чем 0,000001%, более чем 0,0000001%, более чем 0,00000001%, более чем 0,000000001% или более чем 0,0000000001% клеток, экспрессирующих фактор репрограммирования из экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов *in vitro* не содержит клетку, экспрессирующую фактор репрограммирования из экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления фактор репрограммирования представляет собой Oct-4 и/или Sox-2.

В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов *in vitro* не содержит клетки, несущие эпизомные экспрессионные конструкции, кодирующие фактор репрограммирования.

В некоторых вариантах осуществления каждая клетка в популяции лимфоцитов *in vitro* содержит одну и ту же комбинацию экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты, указанной в (1), и потери функции, указанной в списке (2).

В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов *in vitro* содержит менее чем 0,001%, менее чем 0,002%, менее чем 0,003%, менее чем 0,004%, менее чем 0,005%, менее чем 0,006%, менее чем 0,007%, менее чем 0,008%, менее чем 0,009%, менее чем 0,01%, менее чем 0,02%, менее чем 0,03%, менее чем 0,04%, менее чем 0,05%, менее чем 0,06%, менее чем 0,07%, менее чем 0,08%, менее чем 0,09%, менее чем 0,1%, менее чем 0,2%, менее чем 0,3%, менее чем 0,4%, менее чем 0,5%, менее чем 0,6%, менее чем 0,7%, менее чем 0,8%, менее чем 0,9%, менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 6%, менее чем 7%, менее чем 8%, менее чем 9% или менее чем 10% клеток, несущих хромосомную транслокацию.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, включающий введение любого модифицированного лимфоцита, любой модифицированной клетки, любой фармацевтической композиции или выделенной популяции клеток *in vitro*, как описано в настоящем изобретении, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает пролиферативным заболеванием или это заболевание диагностировано у него. В некоторых вариантах осуществления пролиферативное заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, колоректальный рак, рак желудка, почечно-клеточную карциному (RCC) или немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), солидные опухоли, рак мочевого пузыря, гепатоцеллюлярную карциному, рак предстательной железы, рак яичников/матки, рак поджелудочной железы, мезотелиому, меланому, глиобластому, HPV-ассоциированные и/или HPV-положительные виды рака, такие как рак шейки матки и HPV+ рак головы и шеи, рак полости рта, рак глотки, рак щитовидной железы, рак желчного пузыря, виды саркомы мягких тканей и формы гематологического рака, такие как ALL, CLL, NHL, DLBCL, AML, CML, множественная миелома (MM). В некоторых вариантах осуществления способ получения модифицированного лимфоцита, модифицированной клетки, популяции клеток или выделенной популяции лимфоцитов *in vitro* по настоящему изобретению включает (a) получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC); (b) модификацию iPSC или ее недифференцированной или дифференцированной дочерней клетки для обеспечения экспрессии по меньшей мере одного экзогенного гена, указанного в (1), и/или обеспечения потери функции по меньшей мере одного гена, указанного в (2); (c) направление дифференцировки iPSC на клетки гемопоэтической линии дифференцировки, где клетки гемопоэтической линии дифференцировки сохраняют отредактированные генетические локусы, содержащиеся в iPSC. В некоторых вариантах осуществления направление дифференцировки включает (i) приведение iPSC в контакт с композицией, содержащей активатор пути BMP и необязательно bFGF, для получения мезодермальных клеток; и (ii) приведение мезодермальных клеток в контакт с композицией, содержащей активатор пути BMP, bFGF и активатор пути WNT, для получения мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный гемогенный эндотелий (HE), где мезодермальные клетки, обладающие потенциалом превращения в дефинитивный гемогенный эндотелий (HE) способны обеспечивать образование клеток гемопоэтической линии дифференцировки; где мезодермальные клетки и мезодермальные клетки, обладающие потенциалом превращения в дефинитивный HE, получают на стадиях (i) и (ii) без стадии образования эмбрионидных телец; где клетки гемопоэтической линии дифференцировки включают клетки дефинитивного гемогенного эндотелия, ге-

мопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSC), гемопоэтические мультипотентные клетки-предшественники (MPP), клетки-предшественники пре-Т-клеток, клетки-предшественники пре-НК-клеток, клетки-предшественники Т-клеток, клетки-предшественники НК-клеток, Т-клетки, НК-клетки, NKT-клетки или В-клетки.

В некоторых вариантах осуществления способ направления дифференцировки iPSC на клетки гемопоэтической линии дифференцировки дополнительно включает приведение мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, в контакт с композицией, содержащей bFGF и ингибитор ROCK, для получения клеток дефинитивного HE.

В некоторых вариантах осуществления способ направления дифференцировки дополнительно включает приведение клеток дефинитивный HE в контакт с композицией, содержащей активатор BMP, необязательно ингибитор ROCK и один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из TPO, IL3, GMCSF, EPO, bFGF, VEGF, SCF, IL6, Flt3L и IL11, для получения гемопоэтических мультипотентных клеток-предшественников (MPP). В некоторых вариантах осуществления способ направления дифференцировки дополнительно включает приведение клеток дефинитивный HE в контакт с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L и IL7; и необязательно один или несколько из активатора BMP, ингибитора ROCK, TPO, VEGF и bFGF для получения предшественников пре-Т-клеток, предшественников Т-клеток и/или Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ направления дифференцировки дополнительно включает приведение клеток дефинитивный HE в контакт с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L, TPO, IL7 и IL15; и необязательно один или несколько из активатора BMP, ингибитора ROCK, VEGF и bFGF, для получения предшественников пре-НК-клеток, предшественников НК-клеток и/или НК-клеток.

В некоторых вариантах осуществления способ получения модифицированного лимфоцита, модифицированной клетки, популяции клеток или выделенной популяции лимфоцитов *in vitro* по настоящему изобретению дополнительно включает перед стадией с) приведение плюрипотентных стволовых клеток в контакт с композицией, содержащей ингибитор MEK, ингибитор GSK3 и ингибитор ROCK, для посева и размножения клеток.

В некоторых вариантах осуществления способ получения модифицированного лимфоцита, модифицированной клетки, популяции клеток или выделенной популяции лимфоцитов *in vitro* по настоящему изобретению дополнительно включает обнаружение перестроенного локуса Т-клеточного рецептора (TCR) в клетках гемопоэтической линии. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает отбор клеток гемопоэтической линии, содержащих перестроенный локус TCR на основе связывания представляющего интерес антигена с помощью TCR, кодируемого перестроенным локусом TCR. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес антиген представляет собой опухолевый антиген. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ, включающий репрограммирование донорской клетки до плюрипотентного состояния; редактирование целевого локуса в геноме донорской клетки и дифференцировку репрограммированной донорской клетки в лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления редактирование выполняется до или во время стадии репрограммирования донорской клетки до плюрипотентного состояния. В некоторых вариантах осуществления донорская клетка представляет собой фибробласт, клетку периферической крови, лимфоцит или Т-клетку.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ, включающий дифференцировку генетически модифицированной плюрипотентной стволовой клетки в лимфоцит, где генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка содержит (1) экзогенную нуклеиновую кислоту, содержащую (i) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR); (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (FcγRIII, CD16); (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую интерлейкин 15 (IL-15); (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант; (v) нуклеиновую кислоту, кодирующую интерлейкин 12 (IL-12); (vi) нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-12R или его вариант; (vii) нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G); (viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E); (ix) поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47); или любую комбинацию двух или более из них; и/или (2) вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты в один или несколько следующих генетических локусов: (i) рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGFβR2); (ii) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A); (iii) Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT); (iv) микроглобулина β-2 (B2M); (v) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1, CD279); (vi) цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH); (vii) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (SIITA); (viii) рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров); (ix) двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II; (x) кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B); (xi) константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC); или любой комбинации двух или более из них, где вставка/делеция или вставка приводят к потере функции продукта гена, коди-



стволовой клетки в лимфоцит, где генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка содержит вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты в TGF $\beta$ R2, TIGIT и NKG2A, где вставка/делеция или вставка приводят к потере функции продукта гена, кодируемого TGF $\beta$ R2, TIGIT и/или NKG2A. В одном варианте осуществления способ включает дифференцировку генетически модифицированной плюрипотентной стволовой клетки в лимфоцит, где генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка содержит вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты в TGF $\beta$ R2, ADORA2A и NKG2A, где вставка/делеция или вставка приводят к потере функции продукта гена, кодируемого TGF $\beta$ R2, ADORA2A и/или NKG2A. В одном варианте осуществления способ включает дифференцировку генетически модифицированной плюрипотентной стволовой клетки в лимфоцит, где генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка содержит вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты в CISH, TIGIT и ADORA2A, где вставка/делеция или вставка приводят к потере функции продукта гена, кодируемого CISH, TIGIT и/или ADORA2A. В одном варианте осуществления способ включает дифференцировку генетически модифицированной плюрипотентной стволовой клетки в лимфоцит, где генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка содержит вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты в CISH, TIGIT и NKG2A, где вставка/делеция или вставка приводят к потере функции продукта гена, кодируемого CISH, TIGIT и/или NKG2A. В одном варианте осуществления способ включает дифференцировку генетически модифицированной плюрипотентной стволовой клетки в лимфоцит, где генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка содержит вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты в TIGIT, ADORA2A и NKG2A, где вставка/делеция или вставка приводят к потере функции продукта гена, кодируемого TIGIT, ADORA2A и/или NKG2A. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота, указанная в (2), представляет собой экзогенную нуклеиновую кислоту, указанную в (1). В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой iPS-клетку. В некоторых вариантах осуществления дифференцировка включает приведение плюрипотентных стволовых клеток в контакт со средой для дифференцировки или последовательностью сред для дифференцировки.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1A и 1B показано, что в NK-клетках было достигнуто устойчивое редактирование одного и двух генов TGFBR2 и CISH. Как одиночное, так и одновременное нацеливание на TGFBR2 и CISH в NK-клетках с использованием CRISPR-Cpf1 приводило к вставкам/делециям в обеих мишенях в более чем 80% NK-клеток, при этом более 90% отредактированных NK-клеток были жизнеспособными через 72 часа после редактирования.

На фиг. 2A и 2B показано, что нормализация кривых сфероидов сохраняет те же модели эффективности, которые наблюдали при ненормализованных данных, как проанализировано на 3 уникальных донорах и в 5 независимых экспериментах. Каждая группа NK с одиночным нокаутом (SKO) была значительно более эффективной в уменьшении размера сфероида SK-OV-3, чем контрольная группа NK, а группа NK с двойным нокаутом (DKO) была значительно более эффективной в уменьшении размера сфероида SK-OV-3, чем группы NK SKO. На фиг. 2A показан анализ сфероида SK-OV-3 при E:T 10:1 с 10 нг/мл TGF $\beta$  (3 донора, 5 независимых экспериментов). На фиг. 2B показаны планки погрешностей, которые представляют собой SEM. Статистическая значимость является результатом 2-факторного анализа ANOVA. 2-факторный анализ ANOVA исключает временные точки, превышающие 104 часа, из-за пропущенных временных точек в некоторых экспериментах. Анализ смешанной модели показывает одинаковую или улучшенную статистическую значимость среди групп, когда учитываются все временные точки.

На фиг. 3A и 3B показано, что NK-клетки с двойным нокаутом CISH/TGFBR2 демонстрируют превосходящую эффекторную функцию по сравнению с NK-клетками с одиночным нокаутом или контрольными NK-клетками в анализе сфероидов SK-OV-3, даже при более низком соотношении эффекторных NK-клеток к клеткам-мишеням (E:T). На фиг. 3A показан анализ сфероидов SK-OV-3 при E:T 20:1 с 10 нг/мл TGF- $\beta$ , как проанализировано на 3 уникальных донорах и в 5 независимых экспериментах. На фиг. 3B показан анализ сфероидов SK-OV-3 при E:T 10:1 с 10 нг/мл TGF- $\beta$ , как проанализировано на 4 уникальных донорах и в 7 независимых экспериментах. Эти незначительные различия между разными соотношениями E:T при всех условиях позволяют предположить, что фенотип эффекторных клеток определяется скорее нокаутом, чем соотношением NK-клеток к мишени.

На фиг. 4A и 4B показано, что NK-клетки с двойным нокаутом CISH/TGFBR2 демонстрируют превосходящую эффекторную функцию по сравнению с NK-клетками с одиночным нокаутом или контрольными NK-клетками в анализе сфероидов PC-3, даже при более низком соотношении эффекторных NK-клеток к клеткам-мишеням (E:T). На фиг. 4A показан анализ сфероидов PC-3 при E:T 20:1 с 10 нг/мл TGF- $\beta$ , как проанализировано на 3 уникальных донорах и в 5 независимых экспериментах. На фиг. 4B

показан анализ сфероидов PC-3 при E:T 10:1 с 10 нг/мл TGF- $\beta$ , как проанализировано на 4 уникальных донорах и в 7 независимых экспериментах. Эти незначительные различия между разными соотношениями E:T при всех условиях позволяют предположить, что фенотип эффекторных клеток определяется скорее нокаутом, чем соотношением NK-клеток к мишени.

На фиг. 5A и 5B показано, что NK-клетки с двойным нокаутом CISH/TGFBR2 демонстрируют превосходящую эффекторную функцию по сравнению с NK-клетками с одиночным нокаутом или контрольными NK-клетками в анализах сфероидов SK-OV-3 и PC-3 в отсутствие какого-либо экзогенного цитокина. На фиг. 5A показан анализ сфероидов SK-OV-3 при E:T 10:1 в отсутствие какого-либо экзогенного цитокина, как проанализировано на 4 уникальных донорах и в 7 независимых экспериментах. На фиг. 5B показан анализ сфероидов PC-3 при E:T 10:1 в отсутствие какого-либо экзогенного цитокина, как проанализировано на 4 уникальных донорах и в 7 независимых экспериментах.

На фиг. 6A показано, что концентрации IFN- $\gamma$  коррелируют с эффективностью NK-клеток в анализе сфероидов. Анализ сфероидов SK-OV-3 выполняли при различных E:T с 10 нг/мл TGF- $\beta$  и 5 нг/мл IL-15. Анализ при E:T 5:1 и 10:1 был проведен на 4 уникальных донорах и в 7 независимых экспериментах. Анализ при E:T 20:1 был проведен на 3 уникальных донорах и в 5 независимых экспериментах. На фиг. 6B показано, что концентрации TNF- $\alpha$  коррелируют с эффективностью NK-клеток в анализе сфероидов. Анализ сфероидов SK-OV-3 выполняли при различных E:T с 10 нг/мл TGF- $\beta$  и 5 нг/мл IL-15. Анализ при E:T 5:1 и 10:1 был проведен на 4 уникальных донорах и в 7 независимых экспериментах. Анализ при E:T 20:1 был проведен на 3 уникальных донорах и в 5 независимых экспериментах. На фиг. 6C показана экспрессия маркера в NK-клетках с двойным нокаутом (DKO) CISH/TGFBR2. Контрольные (неотредактированные) NK-клетки и NK-клетки с двойным нокаутом собирали для окрашивания через 72 часа после редактирования. Количественно оценивали экспрессию маркеров активации NK CD25 и CD69. NK-клетки с двойным KO экспрессировали значительно более высокие уровни маркеров активации CD25 и CD69 по сравнению с контрольными NK-клетками. На фиг. 6D показана противоопухолевая активность NK-клеток, измеренная на модели *in vivo*. Мышам NSG внутрибрюшинно вводили 500000 опухолевых клеток SKOV3, меченых люциферазой. Через семь дней после имплантации опухоли 10 миллионов отредактированных (двойной нокаут CISH/TGFBR2) или неотредактированных (контроль) NK-клеток вводили в брюшную полость мышей, имеющих опухоль. Бремя опухоли контролировали еженедельно путем IP введения люциферина и визуализации IVIS. Двухфакторный анализ ANOVA проводили в день 34 для определения статистической значимости между контрольной группой и группами NK-клеток с DKO (\*\*\*\*,  $P < 0,0001$ )

На фиг. 7A показано устойчивое редактирование одного гена TIGIT, достигаемое в NK-клетках, в 2 независимых экспериментах и 3 уникальных донорах. На фиг. 7B показано устойчивое редактирование одного гена NKG2A, достигаемое в NK-клетках, в 2 независимых экспериментах и 3 уникальных донорах. На фиг. 7C показано устойчивое редактирование одного гена ADORA2A, достигаемое в NK-клетках, в 3 независимых экспериментах и 3 уникальных донорах. На фиг. 8A и 8B показано, что NK-клетки с одиночным нокаутом TIGIT демонстрируют превосходящую эффекторную функцию по сравнению с неотредактированными контрольными NK-клетками в анализе сфероидов *in vitro* при различных соотношениях эффекторных NK-клеток к клеткам-мишеням (E:T). На фиг. 8A показан анализ сфероидов опухоли при E:T 20:1, как проанализировано на 2 уникальных донорах и в 2 независимых экспериментах. Интенсивность красных объектов измерялась каждые два часа в течение 6 дней с помощью системы визуализации Incucyte. На фиг. 8B показан анализ сфероидов опухоли при соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням 1,25:1, 2,5:1, 5:1, 10:1 и 20:1, как проанализировано на 2 уникальных донорах и в 2 независимых экспериментах. Интенсивность красных объектов показана через 100 ч после добавления NK-клеток.

На фиг. 9A и 9B показано, что NK-клетки с одиночным нокаутом NKG2A демонстрируют превосходящую эффекторную функцию по сравнению с неотредактированными контрольными NK-клетками в анализе сфероидов *in vitro* при различных соотношениях эффекторных NK-клеток к клеткам-мишеням (E:T). На фиг. 9A показан анализ сфероидов опухоли при E:T 20:1, как проанализировано на 2 уникальных донорах и в 2 независимых экспериментах. Интенсивность красных объектов измерялась каждые два часа в течение 6 дней с помощью системы визуализации Incucyte. На фиг. 9B показан анализ сфероидов опухоли при E:T 1,25:1, 2,5:1, 5:1, 10:1 и 20:1, как проанализировано на 2 уникальных донорах и в 2 независимых экспериментах. Интенсивность красных объектов показана через 100 часов после добавления NK-клеток.

На фиг. 10A и 10B показано, что NK-клетки с одиночным нокаутом ADORA2A демонстрируют превосходящую эффекторную функцию по сравнению с неотредактированными контрольными NK-клетками в анализе сфероидов *in vitro* при различных соотношениях эффекторных NK-клеток к клеткам-мишеням (E:T). На фиг. 10A показан анализ сфероидов опухоли при E:T 20:1, как проанализировано на 2 уникальных донорах и в 2 независимых экспериментах. Интенсивность красных объектов измерялась каждые два часа в течение 6 дней с помощью системы визуализации Incucyte. На фиг. 10B показан анализ сфероидов опухоли при E:T 1,25:1, 2,5:1, 5:1, 10:1 и 20:1, как проанализировано на 2 уникальных до-

норах и в 2 независимых экспериментах. Интенсивность красных объектов показана через 100 часов после добавления НК-клеток.

На фиг. 11 показано тройное редактирование генов TGFbR2/CISH/TIGIT, достигнутое в НК-клетках.

На фиг. 12А и 12В показано, что НК-клетки с тройным нокаутом TGFbR2/CISH/TIGIT демонстрируют превосходящую эффекторную функцию по сравнению с неотредактированными контрольными НК-клетками в анализе сфероидов *in vitro* при различных соотношениях эффекторных НК-клеток к клеткам-мишеням (Е:Т). На фиг. 12А показан анализ сфероидов опухоли при Е:Т 20:1. Интенсивность красных объектов измерялась каждые два часа в течение 6 дней с помощью системы визуализации Incucyte. На фиг. 12В показан анализ сфероидов опухоли при Е:Т 5:1, 10:1 и 20:1. Интенсивность красных объектов показана через 100 ч после добавления НК-клеток.

#### Подробное описание

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены стратегии, композиции и способы, применимые для конструирования "готовых к использованию" аллогенных клеток, которые можно использовать в клинических применениях. В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены стратегии, композиции и способы, применимые для конструирования плюрипотентных или мультипотентных стволовых клеток (например, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) или гемопоэтических стволовых клеток (HSC), которые можно использовать для получения дифференцированных дочерних клеток, например модифицированных лимфоцитов, таких как iNK-клетки. Иммунореактивность, как трансплантат против хозяина, так и хозяин против трансплантата, является серьезной проблемой для клинического применения аллогенных клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены стратегии, композиции и способы конструирования клеток, которые обращаются к различным аспектам иммунореактивности, с которыми обычно сталкиваются немодифицированные клеточные трансплантаты в аллогенных условиях.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены стратегии, композиции и способы, применимые для преодоления иммунореактивности типа хозяин против трансплантата в отношении "чужеродного", например, путем удаления функциональных возможностей МНС классов I и II в клетках-мишенях для аллогенных клинических применений. Например, в некоторых вариантах осуществления удаление функциональных возможностей МНС классов I и II достигается за счет обеспечения потери функции В2М (класс I) и СИТА (класс II) и/или двух или более альфа- и/или бета-цепей МНС класса II, как более подробно описано в другом месте в настоящем документе.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены стратегии, композиции и способы, применимые для преодоления иммунореактивности типа хозяин против трансплантата в отношении "отсутствия своего", например путем введения экзогенной конструкции экспрессии, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую способ ингибирования НК, в клетки-мишени для аллогенных клинических применений. Например, в некоторых вариантах осуществления такая иммунореактивность в отношении "отсутствия своего" устраняется путем достижения трансгенной экспрессии HLA-G, HLA-E и/или CD47 в клетках-мишенях для аллогенных клинических применений. В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены стратегии, композиции и способы, применимые для преодоления аллореактивности типа трансплантат против Т-клеточного рецептора (TCR) хозяина путем удаления функциональных возможностей эндогенного TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены стратегии, композиции и способы, применимые для получения модифицированных клеток для аллогенных клинических применений мультипотентных или плюрипотентных стволовых клеток, которые включают конструирование стволовых клеток для включения иммуномодулирующих модификаций, описанных в данном документе, а затем дифференцировку стволовых клеток в тип клеток для введения нуждающемуся в этом пациенту, например в лимфоциты, такие как, например, iNK-клетки, для иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные или мультипотентные стволовые клетки происходят из клетки, экспрессирующей TCR или содержащей перестроенный локус TCR, например, из Т-клетки, и в некоторых таких вариантах осуществления дифференцированный лимфоцит, происходящий из таких сконструированных стволовых клеток, может экспрессировать TCR и быть мишенью аллореактивности в отношении TCR. В некоторых таких вариантах осуществления выгодно достичь потери функции продуктов экспрессии эндогенного TCR, и в настоящем изобретении предусмотрены стратегии, композиции и способы, применимые для достижения такой потери функции в соответствующих клетках, например, достигая потери функции TRAC, как более подробно описано в другом месте в данном документе. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к получению модифицированных НК-клеток (или других лимфоцитов), которые можно использовать в качестве терапевтических средств, например, в контексте иммуноонкологии. Например, по меньшей мере некоторые из модифицированных НК-клеток, предусмотренных в данном документе, демонстрируют улучшенные характеристики ответа НК-клеток по сравнению с немодифицированными НК-клетками, например, улучшенное распознавание мишени, повышенные уровень и/или продолжительность ответа НК-клеток, улучшенная выживаемость НК-клеток, отсроченное истощение НК-клеток, улучшенное распознавание мишени и/или распознавание мишени, обычно не распознаваемой немодифицированными

НК-клетками.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены композиции, способы и стратегии для получения модифицированных НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления такие модифицированные НК-клетки получают путем редактирования генома зрелых НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки получают путем редактирования генома клетки, из которой происходит НК-клетка, либо *in vitro*, либо *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка, из которой происходит НК-клетка, представляет собой стволовую клетку, например гемопоэтическую стволовую клетку (HSC), или плюрипотентные стволовые клетки, такие как, например, эмбриональная стволовая клетка (ES-клетка) или индуцированная плюрипотентная стволовая клетка (iPS-клетка). Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки получают путем редактирования генома ES-клетки, iPS-клетки или гемопоэтической стволовой клетки с последующей дифференцировкой отредактированной стволовой клетки в НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления, где получение модифицированных НК-клеток включает дифференцировку модифицированной НК-клетки из iPS-клетки, редактирование генома может происходить в любое подходящее время во время получения, поддержания или дифференцировки iPS-клетки. Например, если донорская клетка репрограммируется в iPS-клетку, донорская клетка, например, соматическая клетка, такая как, например, фибробластная клетка или Т-лимфоцит, может быть подвергнута подходам редактирования генов, описанным в данном документе, перед репрограммированием в iPS-клетку, во время процедуры репрограммирования или после того, как донорская клетка была репрограммирована в iPS-клетку. НК-клетки, происходящие из iPSC, также называются в данном документе iNK-клетками. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции, способы и стратегии для получения iNK-клеток, которые происходят из клеток, созревших в процессе развития, также называемых соматическими клетками, таких как, например, фибробласты или клетки периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции, способы и стратегии для получения iNK-клеток, которые происходят из Т-клеток, созревших в процессе развития (Т-клеток, которые подвергались селекции в тимусе). Отличительной чертой Т-клеток, созревших в процессе развития, является перестроенный локус Т-клеточного рецептора. Во время созревания Т-клеток локус TCR подвергается перестройкам V(D)J с образованием полных экзон V-домена. Эти перестройки сохраняются в ходе репрограммирования Т-клеток в индуцированную плюрипотентную стволовую (iPS) клетку и в ходе дифференцировки полученной iPS-клетки в соматическую клетку. Одним из преимуществ использования Т-клеток для получения iPS-клеток является то, что Т-клетки можно относительно легко редактировать, например, с помощью способов на основе CRISPR или других способов редактирования генов. Еще одно преимущество использования Т-клеток для получения iPS-клеток состоит в том, что перестроенный локус TCR обеспечивает возможность генетического отслеживания отдельных клеток и их дочерних клеток. Если стратегии репрограммирования, размножения, культивирования и/или дифференцировки вовлечены в получение НК-клеток, в клональной экспансии отдельной клетки можно использовать перестроенный локус TCR в качестве генетического маркера, однозначно идентифицирующего клетку и ее дочерние клетки. Это, в свою очередь, позволяет характеризовать клеточную популяцию как истинно клональную, или идентифицировать смешанные популяции или контаминирующие клетки в клональной популяции.

Третье преимущество использования Т-клеток для получения iNK-клеток, несущих множественные изменения, заключается в том, что культура Т-клеток отбирается против определенных кариотипических aberrаций, связанных с хромосомными транслокациями. Такие aberrации являются поводом для беспокойства при редактировании клеток с помощью технологии CRISPR и, в частности, при получении клеток с множественными изменениями.

Четвертое преимущество использования iPS-клеток, полученных из Т-клеток, в качестве отправной точки для получения терапевтических лимфоцитов заключается в том, что оно обеспечивает возможность экспрессии подвергшихся предварительному скринингу TCR в лимфоцитах, например, путем отбора Т-клеток на основании активности связывания в отношении специфического антигена, например опухолевого антигена, репрограммирования выбранных Т-клеток в iPS-клетки, а затем получения из этих iPS-клеток лимфоцитов, которые экспрессируют TCR (например, Т-клеток). Эта стратегия также позволит активировать TCR в других типах клеток, например, с помощью генетических или эпигенетических стратегий.

Пятое преимущество использования iPS-клеток, полученных из Т-клеток, в качестве отправной точки для дифференцировки iNK заключается в том, что Т-клетки сохраняют по меньшей мере часть своей "эпигенетической памяти" в ходе процесса репрограммирования и, таким образом, последующая дифференцировка в такой же тип клеток или близкородственный тип клеток, такой как iNK-клетки, будет более эффективной и/или приведет к более качественным популяциям клеток по сравнению с подходами, использующими неродственные клетки, такие как фибробласты, в качестве отправной точки для получения iNK.



### Определения и сокращения

Если не указано иное, каждый из следующих терминов имеет значение, указанное в данном разделе.

Формы единственного числа относятся по меньшей мере к одному из связанных существительных и используются взаимозаменяемо с формами единственного числа, перед которыми стоят термины "по меньшей мере один" и "один или несколько".

Союзы "или" и "и/или" используются взаимозаменяемо как нестрогие дизъюнкции.

"Субъект" означает человека или животное, отличное от человека. Субъект-человек может быть любого возраста (например, младенцем, ребенком, молодым взрослым или взрослым) и может страдать от заболевания или может нуждаться в изменении гена или комбинации определенных генов. Альтернативно субъект может представлять собой животное, что включает без ограничения млекопитающее и более конкретно примата, отличное от человека, грызуна (например, мышь, крысу, хомяка и т.д.), кролика, морскую свинку, собаку, кошку и так далее. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является домашний скот, например, корова, лошадь, овца или коза. В определенных вариантах осуществления субъектом является домашняя птица.

Термины "лечение", "лечить" и "осуществление лечения" относятся к клиническому вмешательству, направленному на то, чтобы обратить, облегчить, отсрочить начало или замедлить прогрессирование и/или предупредить или отсрочить рецидив заболевания или нарушения, или одного или нескольких его симптомов, как описано в данном документе. Лечение, например, в форме модифицированной НК-клетки или популяции модифицированных НК-клеток, как описано в данном документе, может быть назначено субъекту после того, как проявился один или несколько симптомов и/или после того, как было диагностировано заболевание. Лечение может проводиться при отсутствии симптомов, например, для предупреждения или отсрочки начала симптома или ингибирования начала или прогрессирования заболевания. Например, лечение может проводиться предрасположенному индивиду до начала симптомов (например, в свете генетических или других предрасполагающих факторов). Лечение также может быть продолжено после разрешения симптомов, например, для предупреждения или отсрочки их повторения.

"Предупреждать", "осуществление предупреждения" и "предупреждение" относятся к предупреждению заболевания у млекопитающего, например, у человека, включая (а) избегание или предотвращение заболевания; (б) воздействие на предрасположенность к заболеванию; или (с) предупреждение или отсрочку начала по меньшей мере одного симптома заболевания.

Термины "полинуклеотид", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "последовательность нуклеиновой кислоты" и "олигонуклеотид" относятся к серии нуклеотидных оснований (также называемых "нуклеотидами") в ДНК и РНК, и означают любую цепь из двух или более нуклеотидов. Полинуклеотиды, нуклеотидные последовательности, нуклеиновые кислоты и т. д. могут представлять собой химерные смеси или их производные или модифицированные версии, одноцепочечные или двухцепочечные. Они могут быть модифицированы по основному фрагменту, сахарному фрагменту или фосфатному остову, например, для улучшения стабильности молекулы, ее параметров гибридизации и т.д. Нуклеотидная последовательность обычно несет генетическую информацию, включая без ограничения информацию, используемую клеточными механизмами для производства белков и ферментов. Эти термины включают двух- или одноцепочечную геномную ДНК, РНК, любой синтетический и генетически измененный полинуклеотид, а также смысловые и бессмысловые полинуклеотиды. Эти термины также включают нуклеиновые кислоты, содержащие модифицированные основания.

В нуклеотидных последовательностях, представленных в данном документе, используются общепринятые обозначения по IUPAC, как показано в табл. 1 ниже (см. также Cornish-Bowden A, *Nucleic Acids Res.* 1985 May 10; 13(9):3021-30, включенную в данный документ посредством ссылки). Однако следует отметить, что "Т" обозначает "тимин или урацил" в тех случаях, когда последовательность может кодироваться либо ДНК, либо РНК, например, в нацеливающих доменах gRNA.

Таблица 1  
Обозначение нуклеиновых кислот по IUPAC

Символ	Основание
A	Аденин
T	Тимин или урацил
G	Гуанин
C	Цитозин
U	Урацил
K	G или T/U
M	A или C
R	A или G
Y	C или T/U
S	C или G
W	A или T/U
B	C, G или T/U
V	A, C или G
H	A, C или T/U
D	A, G или T/U
N	A, C, G или T/U

Термины "белок", "пептид" и "полипептид" используются взаимозаменяемо для обозначения последовательной цепи аминокислот, связанных между собой пептидными связями. Термины включают отдельные белки, группы или комплексы белков, которые связываются между собой, а также фрагменты или части, варианты, производные и аналоги таких белков. Пептидные последовательности представлены в данном документе с использованием общепринятых обозначений, начиная с amino-или N-конца слева и заканчивая карбокси- или C-концом справа. Могут использоваться стандартные однобуквенные или трехбуквенные сокращения.

Термин "вариант" относится к объекту, такому как полипептид, полинуклеотид или малая молекула, который демонстрирует значительную структурную идентичность с эталонным объектом, но структурно отличается от эталонного объекта в отношении наличия или уровня одного или нескольких химических фрагментов по сравнению с эталонным объектом. Во многих вариантах осуществления вариант также функционально отличается от своего эталонного объекта. В целом то, считается ли конкретный объект должным образом "вариантом" эталонного объекта, зависит от степени его структурной идентичности с эталонным объектом. Термин "эндогенный", используемый в данном документе в контексте нуклеиновых кислот (например, генов, кодирующих белок геномных областей, промоторов), относится к нативной нуклеиновой кислоте или белку в их естественном местоположении, например, в геноме клетки. Напротив, термин "экзогенный", используемый в данном документе в контексте нуклеиновых кислот, например, экспрессионных конструкций, cDNA, вставок/делеций и векторов на основе нуклеиновых кислот, относится к нуклеиновым кислотам, которые были искусственно введены в геном клетки с использованием, например, методик редактирования генов или геномной инженерии, например, методик редактирования на основе CRISPR. Термины "РНК-направляемая нуклеаза" и "РНК-направляемая молекула нуклеазы" используются в данном документе взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза представляет собой РНК-направляемый фермент, представляющий собой эндонуклеазу ДНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR. Неограничивающие примеры РНК-направляемых нуклеаз перечислены в табл. 2 ниже и в способах и композициях, раскрытых в данном документе, можно использовать любую комбинацию РНК-направляемых нуклеаз, раскрытых в данном документе или известных специалистам в данной области техники. Специалистам в данной области техники будут известны дополнительные нуклеазы и варианты нуклеаз, подходящие для использования в контексте настоящего изобретения, и будет понятно, что настоящее изобретение не ограничивается в этом отношении.

## РНК-направляемые нуклеазы

Нуклеаза	Длина (аминокислотный слот)	PAM	Ссылка
SpCas9	1368	NGG	Cong <i>et al.</i> , Science. 2013;339(6121):819-23
SaCas9	1053	NNGRRT	Ran <i>et al.</i> , Nature. 2015;520(7546):186-91.
(KKH) SaCas9	1067	NNNRRT	Kleinstiver <i>et al.</i> , Nat Biotechnol. 2015;33(12):1293-1298
AsCpf1 (AsCas12a)	1353	TTTV	Zetsche <i>et al.</i> , Nat Biotechnol. 2017;35(1):31-34.
LbCpf1 (LbCas12a)	1274	TTTV	Zetsche <i>et al.</i> , Cell. 2015; 163(3):759-71.
CasX	980	TTC	Burstein <i>et al.</i> , Nature. 2017; 542(7640):237-241.
CasY	1200	TA	Burstein <i>et al.</i> , Nature. 2017; 542(7640):237-241.
Cas12h1	870	RTR	Yan <i>et al.</i> , Science. 2019; 363(6422):88-91.
Cas12i1	1093	TTN	Yan <i>et al.</i> , Science. 2019; 363(6422):88-91.
Cas12c1	неизвестно	TG	Yan <i>et al.</i> , Science. 2019; 363(6422):88-91.
Cas12c2	неизвестно	TN	Yan <i>et al.</i> , Science. 2019; 363(6422):88-91.
eSpCas9	1423	NGG	Chen <i>et al.</i> , Nature. 2017; 550(7676):407-410.
Cas9-HF1	1367	NGG	Chen <i>et al.</i> , Nature. 2017; 550(7676):407-410.
HypaCas9	1404	NGG	Chen <i>et al.</i> , Nature. 2017; 550(7676):407-410.
dCas9-FokI	1623	NGG	Патент США № 9322037
Sniper-Cas9	1389	NGG	Lee <i>et al.</i> , Nat Commun. 2018; 9(1):3048.
xCas9	1786	NGG, NG, GAA, GAT	Wang <i>et al.</i> , Plant Biotechnol J. 2018; pbi.13053.
AaCas12b	1129	TTN	Teng <i>et al.</i> Cell Discov. 2018; 4:63.
evoCas9	1423	NGG	Casini <i>et al.</i> , Nat Biotechnol. 2018; 36(3):265-271.
SpCas9-NG	1423	NG	Nishimasu <i>et al.</i> , Science. 2018; 361(6408):1259-1262.
VRQR	1368	NGA	Li <i>et al.</i> , The CRISPR Journal, 2018; 01:01
VRER	1372	NGCG	Kleinstiver <i>et al.</i> , Nature. 2016; 529(7587):490-5.
NmeCas9	1082	NNNNGAT T	Amrani <i>et al.</i> , Genome Biol. 2018; 19(1):214.
CjCas9	984	NNNNRYA C	Kim <i>et al.</i> , Nat Commun. 2017; 8:14500.
BhCas12b	1108	ATTN	Strecker <i>et al.</i> , Nat Commun. 2019 Jan 22; 10(1):212.
BhCas12b V4	1108	ATTN	Strecker <i>et al.</i> , Nat Commun. 2019 Jan 22; 10(1):212.

Дополнительные подходящие РНК-направляемые нуклеазы, например нуклеазы Cas9 и Cas12, будут очевидны специалисту в данной области техники с учетом настоящего изобретения, и настоящее изобретение не ограничивается иллюстративными подходящими нуклеазами, предусмотренными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления подходящей нуклеазой является нуклеаза Cas9 или Cpf1 (Cas12a). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также охватывает варианты нуклеазы, например, варианты нуклеазы Cas9 или Cpf1. Вариант нуклеазы относится к нуклеазе, содержащей аминокислотную последовательность, характеризующуюся одной или несколькими аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с аминокислотной последовательностью нуклеазы дикого типа. Подходящие нуклеазы и варианты нуклеаз могут также включать метки очистки (например, полигистидиновые метки) и сигнальные пептиды, например, содержащие или состоящие

из сигнальной последовательности ядерной локализации. Некоторые неограничивающие примеры подходящих нуклеаз и вариантов нуклеаз описаны более подробно в другом месте в данном документе, а также включают те, которые описаны в заявке PCT/US2019/22374, поданной 14 марта 2019 г. и озаглавленной "Systems and Methods for the Treatment of Hemoglobinopathies", полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза представляет собой вариант Cpf1 *Acidaminococcus* sp. (вариант AsCpf1). Подходящие варианты нуклеазы Cpf1, включая подходящие варианты AsCpf1, будут известны или очевидны специалистам в данной области техники на основании настоящего изобретения и включают без ограничения варианты Cpf1, раскрытые в данном документе или иным образом известные в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза представляет собой вариант Cpf1 RR *Acidaminococcus* sp. (AsCpf1-RR). В другом варианте осуществления РНК-направляемая нуклеаза представляет собой вариант Cpf1 RVR. Например, подходящие варианты Cpf1 включают варианты, содержащие замену M537R, замену H800A и/или замену F870L или любую их комбинацию (схема нумерации в соответствии с последовательностью AsCpf1 дикого типа). Термин "гемопозитические стволовые клетки" или "дефинитивные гемопозитические стволовые клетки", используемый в данном документе, относится к CD34+ стволовым клеткам, способным давать начало как зрелым миелоидным, так и зрелым лимфоидным типам клеток, включая Т-клетки, естественные клетки-киллеры и В-клетки.

Используемые в данном документе термины "репрограммирование", или "дедифференцировка", или "повышение активности клетки", или "повышение способности к развитию" относятся к способу повышения активности клетки или дедифференцировки клетки до менее дифференцированного состояния. Например, клетка, которая характеризуется повышенной активностью клетки, имеет большую пластичность в развитии (т.е. может дифференцироваться в большее количество типов клеток) по сравнению с той же клеткой в нерепрограммированном состоянии. Другими словами, репрограммированная клетка представляет собой клетку, которая находится в менее дифференцированном состоянии, чем такая же клетка в нерепрограммированном состоянии. В некоторых вариантах осуществления термин "репрограммирование" относится к дедифференцировке соматической клетки или мультипотентной стволовой клетки в плюрипотентную стволовую клетку, также называемую индуцированной плюрипотентной стволовой клеткой или iPS-клеткой. Подходящие способы получения iPS-клеток из соматических или мультипотентных стволовых клеток хорошо известны специалистам в данной области техники.

Используемый в данном документе термин "дифференцировка" представляет собой способ, посредством которого неспециализированная ("некоммитированная") или менее специализированная клетка приобретает характеристики специализированной клетки, такой как, например, клетка крови или мышечная клетка. Дифференцированная или индуцированная дифференцировкой клетка представляет собой клетку, которая заняла более специализированное ("коммитированное") положение в линии дифференцировки клетки. Например, iPS-клетка может быть дифференцирована в различные более дифференцированные типы клеток, например, в нервную или гемопозитическую стволовую клетку, лимфоцит, кардиомиоцит и другие типы клеток, после обработки подходящими факторами дифференцировки в среде для культивирования клеток. Подходящие способы, факторы дифференцировки и среды для культивирования клеток для дифференцировки плюри- и мультипотентных типов клеток в более дифференцированные типы клеток хорошо известны специалистам в данной области техники. Термин "коммитированная", когда он применяется в отношении способа дифференцировки, относится к клетке, которая продвинулась по пути дифференцировки до точки, где при нормальных обстоятельствах она будет продолжать дифференцироваться в определенный тип клеток или определенное подмножество типов клеток, и при нормальных обстоятельствах не может дифференцироваться в другой тип клеток или вернуться к менее дифференцированному типу клеток.

Используемые в данном документе термины "маркер дифференцировки", "маркерный ген дифференцировки" или "ген дифференцировки" относятся к генам или белкам, экспрессия которых указывает на дифференцировку клеток, происходящую внутри клетки, такой как плюрипотентная клетка. Маркерные гены дифференцировки включают без ограничения следующие гены: CD34, CD4, CD8, CD3, CD56 (NCAM), CD49, CD45; рецептор NK-клеток (кластер дифференцировки 16 (CD16)), член D группы 2 белков естественных киллеров (NKG2D), CD69, NKp30, NKp44, NKp46, CD158b, FOXA2, FGF5, SOX17, XIST, NODAL, COL3A1, OTX2, DUSP6, EOMES, NR2F2, NR0B1, CXCR4, CYP2B6, GAT A3, GATA4, ERBB4, GATA6, HOXC6, INHA, SMAD6, RORA, NIPBL, TNFSF11, CDH11, ZIC4, GAL, SOX3, PITX2, APOA2, CXCL5, CER1, FOXQ1, MLL5, DPP10, GSC, PCDH10, CTCFL, PCDH20, TSHZ1, MEGF10, MYC, DKK1, BMP2, LEFTY2, HES1, CDX2, GNAS, EGR1, COL3A1, TCF4, HEPH, KDR, TOX, FOXA1, LCK, PCDH7, CD1D FOXG1, LEFTY1, TUJ1, ген Т (Brachyury), ZIC1, GATA1, GATA2, HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, PAX5, RBPJ, RUNX1, STAT1 и STAT3.

Используемый в данном документе термин "профиль маркерного гена дифференцировки" или "профиль гена дифференцировки", "профиль экспрессии гена дифференцировки", "сигнатура экспрессии гена дифференцировки", "панель экспрессии гена дифференцировки", "панель гена дифференцировки" или "сигнатура гена дифференцировки" относится к экспрессии или уровням экспрессии множества мар-

кernых генов дифференцировки.

Используемый в данном документе в контексте потенциала клеточного развития термин "активность" или "способность к развитию" относится к сумме всех вариантов развития, доступных для клетки (т.е. к способности к развитию). Континуум активности клетки включает без ограничения тотипотентные клетки, плюрипотентные клетки, мультипотентные клетки, олигопотентные клетки, унипотентные клетки и окончательно дифференцированные клетки. Используемый в данном документе термин "плюрипотентный" относится к способности клетки образовывать все линии дифференцировки тела или сомы (т.е. собственно эмбриона). Например, эмбриональные стволовые клетки представляют собой тип плюрипотентных стволовых клеток, которые способны образовывать клетки из каждого из трех зародышевых листков, эктодермы, мезодермы и энтодермы. Плюрипотентность представляет собой континуум способности к развитию, варьирующийся от не полностью или частично плюрипотентной клетки (например, стволовой клетки эпибласта или EpiSC), которая не способна дать начало полноценному организму, до более примитивной, более плюрипотентной клетки, которая способна дать начало полноценному организму (например, эмбриональной стволовой клетки или индуцированной плюрипотентной стволовой клетки). Используемый в данном документе термин "индуцированная плюрипотентная стволовая клетка" или iPS-клетка относится к стволовым клеткам, полученным из дифференцированной соматической клетки, например, клетки взрослого, новорожденного или плода, с помощью процесса, называемого репрограммированием в клетки, способные дифференцироваться в ткани всех трех зародышевых или дермальных листков: мезодермы, энтодермы и эктодермы. IPS-клетки не встречаются в природе.

Используемый в данном документе термин "эмбриональная стволовая клетка" относится к плюрипотентным стволовым клеткам, полученным из внутренней клеточной массы эмбриональной бластоцисты. Эмбриональные стволовые клетки плюрипотентны и в процессе развития дают начало всем производным трех первичных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы. Они не вносят вклад во внеэмбриональные мембраны или плаценту, т.е. не являются тотипотентными. Используемый в данном документе термин "мультипотентная стволовая клетка" относится к клетке, которая имеет потенциал развития для дифференцировки в клетки одного или нескольких зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы), но не всех трех. Таким образом, мультипотентную клетку также можно назвать "частично дифференцированной клеткой". Мультипотентные клетки хорошо известны в данной области техники и примеры мультипотентных клеток включают стволовые клетки взрослых, такие как, например, гемопоэтические стволовые клетки и нервные стволовые клетки. "Мультипотентность" указывает на то, что клетка может образовывать многие типы клеток данной линии дифференцировки, но не клетки других линий дифференцировки. Например, мультипотентная гемопоэтическая клетка может образовывать множество различных типов клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты и т.д.), но не может образовывать нейроны. Соответственно, термин "мультипотентность" относится к состоянию клетки со степенью потенциала развития ниже тотипотентного и плюрипотентного.

Отчасти плюрипотентность можно определить путем оценки характеристик плюрипотентности клеток. Характеристики плюрипотентности включают без ограничения (i) морфологию плюрипотентных стволовых клеток; (ii) потенциал неограниченного самообновления; (iii) экспрессию маркеров плюрипотентных стволовых клеток, включая без ограничения SSEA1 (только мыши), SSEA3/4, SSEA5, TRA1-60/81, TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD133/проминин, CD140a, CD56, CD73, CD90, CD105, OCT4, NANOG, SOX2, CD30 и/или CD50; (iv) способность дифференцироваться во все три соматические линии дифференцировки (эктодерму, мезодерму и энтодерму); (v) образование тератомы, состоящей из трех соматических линий дифференцировки; и (vi) образование эмбрионных тел, состоящих из клеток трех соматических линий дифференцировки. Используемый в данном документе термин "морфология плюрипотентных стволовых клеток" относится к классическим морфологическим признакам эмбриональных стволовых клеток. Нормальная морфология эмбриональных стволовых клеток характеризуется округлой и маленькой формой, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, заметным присутствием ядрышек и типичным межклеточным расстоянием.

#### Системы редактирования генома

Настоящее изобретение относится к получению модифицированных НК-клеток, например, НК-клеток, геном которых был модифицирован, или которые происходят из мультипотентных или плюрипотентных стволовых клеток, например, HSC, ES-клеток или iPS-клеток, геном которых был модифицирован. Предусмотренные в данном документе НК-клетки и стволовые клетки могут быть модифицированы с использованием любой технологии редактирования генов, известной специалистам в данной области техники, включая, например, использование систем редактирования генома, например, CRISPR.

Термин "система редактирования генома" относится к любой системе, обладающей активностью РНК-направляемого редактирования ДНК. Системы редактирования генома по настоящему изобретению включают по меньшей мере два компонента, адаптированных из встречающихся в природе систем CRISPR: направляющую РНК (gRNA) и РНК-направляемую нуклеазу. Эти два компонента образуют комплекс, который способен связываться с определенной последовательностью нуклеиновой кислоты и редактировать ДНК в этой последовательности нуклеиновой кислоты или вокруг нее, например, путем создания одного или нескольких одноцепочечных разрывов (SSB или "ник"), двухцепочечных разрывов

(DSB) и/или точечных мутаций.

Встречающиеся в природе системы CRISPR эволюционно разделены на два класса и пять типов (Makarova et al. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Jun; 9(6): 467-477 (Makarova), включенная в данный документ посредством ссылки), и хотя системы редактирования генома по настоящему изобретению могут адаптировать компоненты любого типа или класса встречающейся в природе системы CRISPR, представленные в данном документе варианты осуществления обычно адаптированы из класса 2 и типа II или V системы CRISPR. Системы класса 2, которые охватывают типы II и V, характеризуются относительно большими мультидоменными РНК-направляемыми нуклеазными белками (например, Cas9 или Cpf1) и одной или несколькими направляющими РНК (например, crRNA и необязательно tracrRNA), которые образуют комплексы рибонуклеопротеидов (RNP), которые связываются с (т.е. нацеливаются на) и расщепляют специфические локусы, комплементарные нацеливающей (или спейсерной) последовательности crRNA. Системы редактирования генома в соответствии с настоящим изобретением аналогичным образом нацеливаются на и редактируют последовательности клеточной ДНК, но значительно отличаются от систем CRISPR, встречающихся в природе. Например, описанные в данном документе одномолекулярные направляющие РНК не встречаются в природе, и как направляющие РНК, так и РНК-направляемые нуклеазы в соответствии с настоящим изобретением могут включать любое количество не встречающихся в природе модификаций.

Системы редактирования генома могут быть реализованы (например, введены или доставлены в клетку или субъекту) различными путями, и разные реализации могут быть подходящими для различных применений. Например, система редактирования генома реализована в определенных вариантах осуществления в виде комплекса белок/РНК (рибонуклеопротеин или RNP), который может быть включен в фармацевтическую композицию, которая необязательно включает фармацевтически приемлемый носитель и/или инкапсулирующее средство, такие как липидные или полимерные микро- или наночастицы, мицеллы, липосомы и т.д. В определенных вариантах осуществления система редактирования генома реализована в виде одной или нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты, представляющие собой РНК-направляемую нуклеазу и направляющую РНК, описанные выше (необязательно с одним или несколькими дополнительными компонентами); в определенных вариантах осуществления система редактирования генома реализована в виде одного или нескольких векторов, содержащих такие нуклеиновые кислоты, например, вирусного вектора, такого как аденоассоциированный вирус; и в определенных вариантах осуществления система редактирования генома реализована в виде комбинации любого из вышеизложенного. Дополнительные или модифицированные реализации, которые действуют в соответствии с изложенными в данном документе принципами, будут очевидны специалисту в данной области техники и находятся в пределах объема настоящего изобретения. Следует отметить, что системы редактирования генома в соответствии с настоящим изобретением могут быть нацелены на одну конкретную нуклеотидную последовательность или могут быть нацелены на, и могут быть способны редактировать параллельно, две или более конкретных нуклеотидных последовательностей с помощью двух или более направляющих РНК. Использование нескольких gRNA упоминается как "мультиплексирование" в настоящем изобретении, и может применяться для нацеливания на множество несвязанных целевых представляющих интерес последовательностей, или для образования нескольких SSB или DSB в одном целевом домене и, в некоторых случаях, для образования конкретных изменений в таком целевом домене. Например, в международной патентной публикации № WO 2015/138510 Maeder et al. (Maeder), которая включена в данный документ посредством ссылки, описана система редактирования генома для исправления точечной мутации (C.2991+1655A на G) в гене CEP290 человека, которая приводит к созданию скрытого сайта сплайсинга, что, в свою очередь, снижает или устраняет функцию гена. В системе редактирования генома Maeder используются две направляющие РНК, нацеленные на последовательности по обе стороны (т.е. фланкирующие) от точечной мутации, и формируются DSB, фланкирующие мутацию. Это, в свою очередь, способствует делеции промежуточной последовательности, включая мутацию, тем самым устраняя скрытый сайт сплайсинга и восстанавливая нормальную функцию гена.

В качестве другого примера, в WO 2016/073990 Cotta-Ramusino, et al. ("Cotta-Ramusino"), включенной в данный документ посредством ссылки, описана система редактирования генома, в которой используются две gRNA в сочетании с Cas9-никазой (Cas9, который образует одноцепочечный разрыв, такой как D10A S. pyogenes), конфигурация, называемая "двойная никазная система". Двойная никазная система Cotta-Ramusino сконфигурирована так, чтобы образовать два одноцепочечных разрыва на противоположных цепях представляющей интерес последовательности со сдвигом на один или несколько нуклеотидов, где одноцепочечные разрывы объединяются, чтобы образовать двухцепочечный разрыв с выступающим концом (5' в случае Cotta-Ramusino, хотя 3' выступающие концы также возможны). Выступающий конец, в свою очередь, при некоторых обстоятельствах может способствовать событиям репарации, направленной гомологией. И, в качестве другого примера, в WO 2015/070083 Palestrant et al. ("Palestrant"), включенная в данный документ посредством ссылки) описана gRNA, нацеленная на нуклеотидную последовательность, кодирующую Cas9 (именуемая "направляющей РНК"), которая может быть включена в систему редактирования генома, содержащую одну или несколько дополнительных gRNA для обеспечения временной экспрессии Cas9, который в противном случае мог бы экспрессироваться конститутив-

но, например, в некоторых клетках, трансдуцированных вирусом. Подразумевается, что эти применения мультиплексирования являются иллюстративными, а не ограничивающими, и специалист в данной области техники поймет, что другие применения мультиплексирования в целом совместимы с описанными в данном документе системами редактирования генома. В некоторых случаях системы редактирования генома могут образовывать двухцепочечные разрывы, которые восстанавливаются посредством механизмов репарации двухцепочечных разрывов клеточной ДНК, таких как NHEJ или HDR. Эти механизмы описаны в литературе, например, Davis & Maizels, *PNAS*, 111(10):E924-932, March 11, 2014 (Davis) (где описывается Alt-HDR); Frit et al. *DNA Repair* 17(2014) 81-97 (Frit) (где описывается Alt-NHEJ) и Iyama and Wilson III, *DNA Repair (Amst.)* 2013-Aug; 12(8): 620-636 (Iyama) (где описываются канонические пути HDR и NHEJ в целом).

В случаях, когда системы редактирования генома действуют путем образования DSB, такие системы необязательно включают один или несколько компонентов, которые способствуют или облегчают определенный способ репарации двухцепочечного разрыва или определенный исход репарации. Например, Cotta-Ramusino также описывает системы редактирования генома, где добавляется одноцепочечная олигонуклеотидная "донорная матрица"; донорная матрица включается в целевую область клеточной ДНК, которая расщепляется системой редактирования генома, и может привести к изменению целевой последовательности. В определенных вариантах осуществления системы редактирования генома модифицируют целевую последовательность или модифицируют экспрессию гена в целевой последовательности или рядом с ней, не вызывая одно- или двухцепочечных разрывов. Например, система редактирования генома может включать РНК-направляемую нуклеазу, слитую с функциональным доменом, который действует на ДНК, тем самым модифицируя целевую последовательность или ее экспрессию. В качестве одного примера РНК-направляемая нуклеаза может быть связана с (например, слита с) функциональным доменом, представляющим собой цитидин деаминазу, и может действовать путем образования целевой замены С на А. Иллюстративные продукты слияния нуклеаза/деаминаза описаны в Komor et al. *Nature* 533, 420-424 (19 May 2016) ("Komor"), которая включена посредством ссылки. Альтернативным образом, система редактирования генома может использовать инактивированную расщеплением (т.е. "мертвую") нуклеазу, такую как мертвый Cas9 (dCas9), и может действовать путем образования стабильных комплексов на одной или нескольких целевых областях клеточной ДНК, тем самым препятствуя функциям, связанным с целевой(целевыми) областью(областями), включая без ограничения транскрипцию мРНК, ремоделирование хроматина и т.д.

#### Молекулы направляющей РНК (gRNA)

Термины "направляющая РНК" и "gRNA" относятся к любой нуклеиновой кислоте, которая способствует специфическому связыванию (или "нацеливанию") РНК-направляемой нуклеазы, такой как Cas9 или Cpf1, с последовательностью-мишенью, такой как геномная или эписомальная последовательность в клетке. gRNA могут быть одномолекулярными (содержащими одну молекулу РНК, и могут упоминаться в качестве альтернативы, как химерные), или модульные (содержащие более чем одну, а обычно две отдельные молекулы РНК, такие как crRNA и tracrRNA, которые обычно связаны друг с другом, например посредством образования дуплекса).

gRNA и их составные части описаны в литературе, например, в Briner et al. (*Molecular Cell* 56(2), 333-339, October 23, 2014 (Briner), которая включена посредством ссылки), а также в Cotta-Ramusino.

У бактерий и архей системы CRISPR типа II обычно включают РНК-направляемый нуклеазный белок, такой как Cas9, РНК CRISPR (crRNA), которая включает 5'-область, комплементарную чужеродной последовательности, и транс-активирующую crRNA (tracrRNA), которая включает 5'-область, которая комплементарна 3'-области crRNA и образует дуплекс с ней. Без ограничения какой-либо теорией считается, что данный дуплекс облегчает образование комплекса Cas9/gRNA и необходим для его активности. Поскольку системы CRISPR типа II были адаптированы для использования при редактировании генов, было обнаружено, что crRNA и tracrRNA могут быть объединены в единую одномолекулярную или химерную направляющую РНК в одном неограничивающем примере с помощью "тетрапетлевой" или "линкерной" последовательности из четырех нуклеотидов (например, GAAA), соединяющей комплементарные области crRNA (на ее 3'-конце) и tracrRNA (на ее 5'-конце). (Mali et al. *Science*. 2013 Feb 15; 339(6121): 823-826 ("Mali"); Jiang et al. *Nat Biotechnol.* 2013 Mar; 31(3): 233-239 ("Jiang"); и Jinek et al, 2012 *Science* Aug. 17; 337(6096): 816-821 ("Jinek"), все из которых включены в данный документ посредством ссылки).

Направляющие РНК, одномолекулярные или модульные включают "нацеливающий домен", который полностью или частично комплементарен домену-мишени в последовательности-мишени, такой как последовательность ДНК в геноме клетки, редактирование которого требуется. Нацеливающие домены упоминаются в литературе под разными названиями, включая без ограничения "направляющие последовательности" (Hsu et al, *Nat Biotechnol.* 2013 Sep; 31(9): 827-832, ("Hsu"), включенная в данный документ посредством ссылки), "области комплементарности" (Cotta-Ramusino), "спейсеры" (Briner) и, в общем, "crRNA" (Jiang). Независимо от названий, нацеливающие домены обычно имеют длину 10-30 нуклеотидов, а в определенных вариантах осуществления имеют длину 16-24 нуклеотида (например, имеют длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида), а также находятся на 5'-конце или вблизи него в случае

gRNA Cas9, и на 3'-конце или вблизи него в случае gRNA Cpf1.

Помимо нацеливающих доменов gRNA обычно (но не обязательно, например, как обсуждается ниже) включают множество доменов, которые могут влиять на образование или активность комплексов gRNA/Cas9. Например, как упоминалось выше, дуплексная структура, образованная первым и вторым доменами комплементарности gRNA (также называемая дуплексом типа "повтор:анти-повтор"), взаимодействует с долей распознавания (REC) Cas9 и может опосредовать образование комплексов Cas9/gRNA. (Nishimasu et al., Cell 156, 935-949, February 27, 2014 (Nishimasu 2014) и Nishimasu et al., Cell 162, 1113-1126, August 27, 2015 (Nishimasu 2015), обе включены в данный документ посредством ссылки). Следует отметить, что первый и/или второй домены комплементарности могут содержать один или несколько участков поли-А, которые могут распознаваться РНК-полимеразами как сигнал терминации. Последовательность первого и второго доменов комплементарности, таким образом, необязательно модифицируется для устранения этих участков и обеспечения полной транскрипции gRNA *in vitro*, например, посредством замен А-Г, как описано в Briner, или замен А-У. Эти и другие аналогичные модификации первого и второго доменов комплементарности находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Наряду с первым и вторым доменами комплементарности gRNA Cas9 обычно включают две или более дополнительных дуплексных областей, которые участвуют в нуклеазной активности *in vivo*, но не обязательно *in vitro*. (Nishimasu 2015). Первую область типа "стебель-петля" вблизи 3'-части второго домена комплементарности называют "проксимальным доменом" (Cotta-Ramusino) "стеблем-петлей 1" (Nishimasu 2014 и 2015) и "нексусом" (Брайнер). Одна или несколько дополнительных структур типа "стебель-петля" обычно присутствуют вблизи 3'-конца gRNA, причем их количество варьируется в зависимости от вида: gRNA *S. pyogenes* обычно включают две 3' структуры типа "стебель-петля" (всего четыре структуры типа "стебель-петля", включая дуплекс типа "повтор:анти-повтор"), тогда как *S. aureus* и другие виды имеют только такую одну структуру (всего три структуры типа "стебель-петля"). Описание консервативных структур типа "стебель-петля" (и структур gRNA в более общем смысле), организованных по видам, представлено в Briner.

Хотя вышеприведенное описание сосредоточено на gRNA для применения с Cas9, следует понимать, что были (или могут быть в будущем) открыты или изобретены другие РНК-направляемые нуклеазы, которые используют gRNA, которые в некоторой степени отличаются от тех, что описаны до сих пор. Например, Cpf1 ("CRISPR от *Prevotella* и *Franciscella* 1") представляет собой недавно обнаруженную РНК-направляемую нуклеазу, для функционирования которой не требуется tracrRNA.

(Zetsche et al., 2015, Cell 163, 759-771 October 22, 2015 (Zetsche I), включенная в данный документ посредством ссылки). gRNA для использования в системе редактирования генома Cpf1 обычно включает нацеливающий домен и домен комплементарности (альтернативным образом упоминается как "ручка"). Следует также отметить, что в gRNA для применения с Cpf1 нацеливающий домен обычно находится на 3'-конце или вблизи него, а не на 5'-конце, как описано выше в связи с gRNA Cas9 (ручка находится на 5'-конце или вблизи него в случае gRNA Cpf1). Специалистам в данной области техники будет понятно, что, хотя структурные различия могут существовать между gRNA от различных прокариотических видов, или между gRNA Cpf1 и Cas9, принципы, согласно которым gRNA действуют, обычно постоянны. Благодаря такому постоянству деятельности gRNA могут быть определены в общих чертах по их последовательностям нацеливающих доменов, и специалисты в данной области техники поймут, что данная последовательность нацеливающего домена может быть включена в любую подходящую gRNA, включая одномолекулярную или химерную gRNA, или gRNA, которая включает одну или несколько химических модификаций и/или модификаций последовательности (замены, дополнительные нуклеотиды, усечения и т.д.). Таким образом, для экономии изложения в настоящем изобретении, gRNA могут быть описаны исключительно в отношении их последовательностей нацеливающих доменов.

В более общем плане специалистам в данной области техники будет понятно, что некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к системам, способам и композициям, которые могут быть реализованы с использованием множества РНК-направляемых нуклеаз. По этой причине, если не указано иное, термин gRNA следует понимать как охватывающий любую подходящую gRNA, которая может использоваться с любой РНК-направляемой нуклеазой, а не только с теми gRNA, которые совместимы с конкретными видами Cas9 или Cpf1. В качестве иллюстрации термин gRNA в определенных вариантах осуществления может включать gRNA для применения с любой РНК-направляемой нуклеазой, встречающейся в системе CRISPR класса 2, такой как система CRISPR типа II или типа V, или с РНК-направляемой нуклеазой, производной или адаптированной из такой системы. В некоторых вариантах осуществления используемая направляющая РНК содержит модификацию по сравнению со стандартной каркасной структурой gRNA. Такие модификации могут включать, например, химические модификации части gRNA, например, нуклеотидного основания или фрагмента остова. В некоторых вариантах осуществления такая модификация может также включать присутствие нуклеотида ДНК внутри gRNA, например, внутри или за пределами нацеливающего домена. В некоторых вариантах осуществления модификация может включать удлинение каркасной структуры gRNA, например, путем добавления 1-100 нуклеотидов, включая нуклеотиды РНК и/или ДНК на 3'- или 5'-конце направляющей РНК, например на конце, дистальном от нацеливающего домена. Как правило, gRNA включают сахарную группу в виде



рибозы, которая представляет собой 5-членное кольцо с кислородом. Иллюстративные модифицированные gRNA могут включать без ограничения замену кислорода в рибозе (например, серой (S), селеном (Se) или алкиленом, таким как, например, метилен или этилен); добавление двойной связи (например, для замены рибозы циклопентенилом или циклогексенилом); сокращение кольца рибозы (например, с образованием 4-членного кольца циклобутана или оксетана); расширение кольца рибозы (например, с образованием 6- или 7-членного кольца, имеющего дополнительный углерод или гетероатом, такого как, например, ангидрогекситол, альтритол, маннит, циклогексанол, циклогексенит и морфолин, который также имеет фосфорамидатный остов). Хотя большинство изменений аналога сахара локализовано в положении 2', другие сайты могут быть модифицированы, включая положение 4'. В определенных вариантах осуществления gRNA содержит модификацию 4'-S, 4'-Se или 4'-C-аминометил-2'-O-Me. В определенных вариантах осуществления дезануклеотиды, например, 7-дезааденозин, могут быть включены в gRNA. В определенных вариантах осуществления O- и N-алкилированные нуклеотиды, например, N6-метиладенозин, могут быть включены в gRNA. В определенных вариантах осуществления один, или несколько, или все нуклеотиды в gRNA являются дезоксинуклеотидами. В определенных вариантах осуществления gRNA, как используется в данном документе, могут представлять собой модифицированные или немодифицированные gRNA. В определенных вариантах осуществления gRNA может включать одну или несколько модификаций. В определенных вариантах осуществления одна или несколько модификаций могут включать модификацию фосфоротиоатной связи, модификацию фосфородитиоатной (PS2) связи, 2'-O-метильную модификацию или их комбинации. В определенных вариантах осуществления одна или несколько модификаций могут находиться на 5'-конце gRNA, на 3'-конце gRNA или их комбинации.

В определенных вариантах осуществления gRNA может включать одну или несколько модификаций фосфородитиоатной (PS2) связи. В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, включает один или несколько отрезков оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), также называемых в данном документе "удлинениями ДНК". В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, включает удлинение ДНК на 5'-конце gRNA, 3'-конце gRNA или их комбинации. В определенных вариантах осуществления удлинение ДНК может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 оснований ДНК. Например, в определенных вариантах осуществления удлинение ДНК может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 оснований ДНК. В определенных вариантах осуществления удлинение ДНК может включать одно или несколько оснований ДНК, выбранных из аденина (A), гуанина (G), цитозина (C) или тимина (T). В определенных вариантах осуществления удлинение ДНК включает одинаковые основания ДНК. Например, удлинение ДНК может включать отрезок оснований аденина (A). В определенных вариантах осуществления удлинение ДНК может включать отрезок оснований тимина (T). В определенных вариантах осуществления удлинение ДНК включает комбинацию различных оснований ДНК. В определенных вариантах осуществления удлинение ДНК может содержать последовательность, представленную в табл. 3. В определенных вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, включает удлинение ДНК, а также одну или несколько модификаций фосфоротиоатной связи, одну или несколько модификаций фосфородитиоатной (PS2) связи, одну или несколько 2'-O-метильных модификаций или их комбинации. В определенных вариантах осуществления одна или несколько модификаций могут находиться на 5'-конце gRNA, на 3'-конце gRNA или их комбинации. В определенных вариантах осуществления gRNA, включающая удлинение ДНК, может содержать последовательность, представленную в табл. 3, которая включает удлинение ДНК. Не желая быть связанными теорией предполагается, что в данном документе можно использовать любое удлинение ДНК, при условии, что оно не гибридизуется с нуклеиновой кислотой-мишенью, на которую нацелена gRNA, а также демонстрирует повышение редактирования сайта нуклеиновой кислоты-мишени по сравнению с gRNA, которая не включает такое удлинение ДНК.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, включает один или несколько отрезков оснований рибонуклеиновой кислоты (РНК), также называемых в данном документе "удлинениями РНК". В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, включает удлинение РНК на 5'-конце gRNA, 3'-конце gRNA или их комбинации. В определенных вариантах осуществления удлинение РНК может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 оснований РНК. Например, в определенных вариантах осуществления удлинение РНК может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 оснований РНК. В определенных вариантах осуществления удлинение РНК может включать одно или несколько оснований РНК, выбранных из аденина (rA), гуанина (rG), цитозина (rC) или урацила (rU), в которых "r" представляет собой РНК, 2'-гидрокси-группу. В определенных вариантах осуществления удлинение РНК включает одинаковые основания РНК. Например, удлинение РНК может включать отрезок оснований аденина (rA). В определенных вариантах осуществления удлинение РНК

включает комбинацию различных оснований РНК. В определенных вариантах осуществления удлинение РНК может содержать последовательность, представленную в табл. 3. В определенных вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, включает удлинение РНК, а также одну или несколько модификаций фосфоротиоатной связи, одну или несколько модификаций фосфородитиоатной (PS2) связи, одну или несколько 2'-О-метильных модификаций или их комбинации. В определенных вариантах осуществления одна или несколько модификаций могут находиться на 5'-конце gRNA, на 3'-конце gRNA или их комбинации. В определенных вариантах осуществления gRNA, включающая удлинение РНК, может содержать последовательность, представленную в табл. 3, которая включает удлинение РНК. gRNA, включающие удлинение РНК на 5'-конце gRNA, могут содержать последовательность, раскрытую в данном документе. gRNA, включающие удлинение РНК на 3'-конце gRNA, могут содержать последовательность, раскрытую в данном документе.

Предполагается, что используемые в данном документе gRNA могут также включать удлинение РНК и удлинение ДНК. В определенных вариантах осуществления как удлинение РНК, так и удлинение ДНК могут находиться на 5'-конце gRNA, 3'-конце gRNA или их комбинации. В определенных вариантах осуществления удлинение РНК находится на 5'-конце gRNA, а удлинение ДНК находится на 3'-конце gRNA. В определенных вариантах осуществления удлинение РНК находится на 3'-конце gRNA, а удлинение ДНК находится на 5'-конце gRNA.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, которая включает модификацию, например, удлинение ДНК на 5'-конце, образует комплекс с РНК-направляемой нуклеазой, например нуклеазой AsCpf1, с образованием RNP, который затем используют для редактирования клетки-мишени, например, НК-клетки.

Примеры подходящих 5'-удлинений для направляющих РНК Cpf1 представлены в таблице ниже.

Таблица 3

## 5'-удлинения gRNA

Идентификационный номер последовательности 5'-удлинения	Последовательность 5'-удлинения	5'-модификация
	rCrUrUrUrU	+5 РНК
	rArArGrArCrUrUrUrU	+10 РНК
	rArUrGrUrGrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+25 РНК
	rArGrGrCrCrArGrCrUrUrGrCrCrGrUrUrUrUrUrArGrUrCrGrUrGrCrUrUrCrArUrGrUrGrUrUrUrUrGrUrCrArArArGrArCrCrUrUrUrU	+60 РНК
	CTTTT	+5 ДНК
	AAGACCTTTT	+10 ДНК
	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+25 ДНК
	AGGCCAGCTTGCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+60 ДНК
	TTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+20 ДНК
	GCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+30 ДНК
	GCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+50 ДНК
	TAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+40 ДНК
	C*C*GAAGTTTTCTTCGGTTTT	+20 ДНК + 2xPS
	T*T*TTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+25 ДНК + 2xPS
	A*A*CGTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+30 ДНК + 2xPS

G*C*GTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCG GTTTT	+41 ДНК + 2xPS
G*G*CTTCTTTTGAAGCCTTTTTGCGTTGTTTTCAACG CTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+62 ДНК + 2xPS
A*T*GTGTTTTTGTCAAAAAGACCTTTT	+25 ДНК + 2xPS
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	+25 A
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	+25 T
mA*mU*rGrUrGrUrUrUrUrUrGrArArArGrArCrCr UrUrUrU	+25 РНК + 2xPS
mA*mA*rArArArArArArArArArArArArArArArAr ArArArA	Поли-А РНК + 2xPS
mU*mU*rUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUr UrUrUrU	Поли-У РНК+ 2xPS
<p>Все основания указаны в верхнем регистре          Строчная буква "r" представляет РНК, 2'-гидрокси-группу; основания, не          модифицированные буквой "r", представляют собой основания ДНК          Все основания связаны стандартными фосфодиэфирными связями, за исключением          случаев, указанных ниже          "*" представляет фосфоротиоатную модификацию          "PS" представляет фосфоротиоатную модификацию</p>	

Дополнительные подходящие модификации gRNA будут очевидны специалистам в данной области техники на основе настоящего изобретения. Подходящие модификации gRNA включают, например, те, которые описаны в заявке PCT/US2018/054027, поданной 2 октября 2018 г. и озаглавленной "MODIFIED CPF1 GUIDE RNA"; в заявке PCT/US2015/000143, поданной 3 декабря 2015 г. и озаглавленной "GUIDE RNA WITH CHEMICAL MODIFICATIONS"; в заявке PCT/US2016/026028, поданной 5 апреля 2016 г., и озаглавленной "CHEMICALLY MODIFIED GUIDE RNAs FOR CRISPR/CAS-MEDIATED GENE REGULATION" и в заявке PCT/US2016/053344, поданной 23 сентября 2016 г. и озаглавленной "NUCLEASE-MEDIATED GENOME EDITING OF PRIMARY CELLS AND ENRICHMENT THEREOF"; полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

#### Конструкция gRNA

Способы выбора и валидации последовательностей-мишеней, а также анализы нецелевой активности были описаны ранее, например, в Mali; Hsu; Fu et al., 2014 Nat biotechnol 32(3): 279-84, Heigwer et al., 2014 Nat methods 11(2): 122-3; Bae et al. (2014) Bioinformatics 30(10): 1473-5 и Xiao A et al. (2014) Bioinformatics 30(8): 1180-1182. Каждая из этих ссылок включена в данный документ посредством ссылки. В качестве неограничивающего примера конструкция gRNA может включать использование инструмента программного обеспечения для оптимизации выбора потенциальных последовательностей-мишеней, соответствующих последовательности-мишени пользователя, например, для минимизации общей нецелевой активности по геному. Хотя нецелевая активность не ограничивается расщеплением, эффективность расщепления для каждой нецелевой последовательности может быть предсказана, например, с использованием экспериментально полученной схемы взвешивания. Эти и другие способы выбора направляющей последовательности подробно описаны в Maeder и Cotta-Ramusino.

В определенных вариантах осуществления один, или несколько, или все нуклеотиды в gRNA являются модифицированными. Стратегии модификации gRNA описаны в WO 2019/152519, опубликованной 8 августа 2019 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры направляющих РНК, подходящих для определенных вариантов осуществления, охватываемых настоящим изобретением, представлены в данном документе, например, в таблицах ниже. Специалисты в данной области техники смогут представить себе подходящие направляющие последовательности РНК для конкретной нуклеазы, например нуклеазы Cas9 или Cpf1, из раскрытия последовательности нацеливающего домена либо в виде последовательности ДНК, либо в виде последовательности РНК. Например, направляющая РНК, содержащая нацеливающую последовательность, состоящую из нуклеотидов РНК, включало бы последовательность РНК, соответствующую последовательности нацеливающего домена, представленной в виде последовательности ДНК, и она будет содержать нуклеотиды урацила вместо нуклеотидов тимидина. Например, направляющая РНК, содержащая последовательность нацеливающего домена, состоящую из нуклеотидов РНК и описываемую последовательностью ДНК

TCTGCAGAAATGTTCCCCGT (SEQ ID NO: \_\_),

будет иметь нацеливающий домен соответствующей последовательности РНК

UCUGCAGAAAUGUCCCCGU (SEQ ID NO: \_\_).

Как будет очевидно специалисту в данной области техники, такая направляющая последовательность будет связана с подходящей каркасной структурой направляющей РНК, например, с последовательностью каркасной структуры crRNA или химерной последовательностью каркасной структуры crRNA/tracerRNA. Подходящие последовательности каркасных структур gRNA известны специалистам в данной области техники. Для AsCpf1, например, подходящая последовательность каркасной структуры

включает последовательность

UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: \_),

добавленную к 5'-концу нацеливающего домена. В приведенном выше примере это приведет к образованию направляющей РНК Cpf1 с последовательностью

UAAUUUCUACUCUUGUAGAUUCUGCAGAAAUGUCCCCCGU (SEQ ID NO: \_).

Специалисты в данной области техники также поймут, как модифицировать такую направляющую РНК, например путем добавления удлинения ДНК (например, в приведенном выше примере добавление 25-мерного удлинения ДНК, как описано в данном документе, приведет, например, к образованию последовательности направляющей РНК

ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArU rUr-CrUrGrCrArGrArArArUrGrUrUrCrCrCrCrGrU (SEQ ID NO: \_).

Будет понятно, что иллюстративные нацеливающие последовательности, предусмотренные в данном документе, не являются ограничивающими, и дополнительные подходящие последовательности, например, варианты конкретных последовательностей, раскрытых в данном документе, будут очевидны специалисту в данной области техники на основе настоящего изобретения с учетом общеизвестных знаний в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения в настоящем изобретении представляет собой gRNA, которая нацеливается на TIGIT (gRNA TIGIT). В некоторых вариантах осуществления gRNA, которая нацеливается на TIGIT, представляет собой одну или несколько из gRNA, описанных в табл. 4.

Таблица 4

gRNA TIGIT

Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (ДНК)	Длина	Фермент
TIGIT4170	TCTGCAGAAATGTTCCCCGT	20	AsCpf1
TIGIT4171	TGCAGAGAAAGGTGGCTCTA	20	AsCpf1
TIGIT4172	TAATGCTGACTTGGGGTGGC	20	AsCpf1
TIGIT4173	TAGGACCTCCAGGAAGATTC	20	AsCpf1
TIGIT4174	TAGTCAACGCGACCACCACG	20	AsCpf1
TIGIT4175	TCCTGAGGTCACCTTCCACA	20	AsCpf1
TIGIT4176	TATTGTGCCTGTCATCATTC	20	AsCpf1
TIGIT4177	TGACAGGCACAATAGAAACAA	21	SauCas9
TIGIT4178	GACAGGCACAATAGAAACAAC	21	SauCas9
TIGIT4179	AAACAACGGGGAACATTTCTG	21	SauCas9
TIGIT4180	ACAACGGGGAACATTTCTGCA	21	SauCas9
TIGIT4181	TGATAGAGCCACCTTTCTCTG	21	SauCas9

TIGIT4182	GGGTCACTTGTGCCGTGGTGG	21	SauCas9
TIGIT4183	GGCACAAGTGACCCAGGTCAA	21	SauCas9
TIGIT4184	GTCCTGCTGCTCCCAGTTGAC	21	SauCas9
TIGIT4185	TGGCCATTTGTAATGCTGACT	21	SauCas9
TIGIT4186	TGGCACATCTCCCCATCCTTC	21	SauCas9
TIGIT4187	CATCTCCCCATCCTTCAAGGA	21	SauCas9
TIGIT4188	CCACTCGATCCTTGAAGGATG	21	SauCas9
TIGIT4189	GGCCACTCGATCCTTGAAGGA	21	SauCas9
TIGIT4190	CCTGGGGCCACTCGATCCTTG	21	SauCas9
TIGIT4191	GACTGGAGGGTGAGGCCCAGG	21	SauCas9
TIGIT4192	ATCGTTCACGGTCAGCGACTG	21	SauCas9
TIGIT4193	GTCGCTGACCGTGAACGATAC	21	SauCas9
TIGIT4194	CGCTGACCGTGAACGATACAG	21	SauCas9
TIGIT4195	GCATCTATCACACCTACCCTG	21	SauCas9
TIGIT4196	CCTACCCTGATGGGACGTACA	21	SauCas9
TIGIT4197	TACCCTGATGGGACGTACTACT	21	SauCas9
TIGIT4198	CCCTGATGGGACGTACTACTGG	21	SauCas9
TIGIT4199	TTCTCCCAGTGACGTCCCAT	21	SauCas9
TIGIT4200	GGAGAATCTTCTGGAGGTCC	21	SauCas9
TIGIT4201	CATGGCTCCAAGCAATGGAAT	21	SauCas9
TIGIT4202	CGCGGCCATGGCTCCAAGCAA	21	SauCas9
TIGIT4203	TCGCGGCCATGGCTCCAAGCA	21	SauCas9
TIGIT4204	CATCGTGGTGGTCGCGTTGAC	21	SauCas9
TIGIT4205	AAAGCCCTCAGAATCCATTCT	21	SauCas9
TIGIT4206	CATTCTGTGGAAGGTGACCTC	21	SauCas9
TIGIT4207	TTCTGTGGAAGGTGACCTCAG	21	SauCas9
TIGIT4208	CCTGAGGTCACCTTCCACAGA	21	SauCas9
TIGIT4209	TTCTCCTGAGGTCACCTTCCA	21	SauCas9
TIGIT4210	AGGAGAAAATCAGCTGGACAG	21	SauCas9
TIGIT4211	GGAGAAAATCAGCTGGACAGG	21	SauCas9
TIGIT4212	GCCCCAGTGCTCCCTCACCCC	21	SauCas9
TIGIT4213	TGGACACAGCTTCTGGGGGT	21	SauCas9
TIGIT4214	TCTGCCTGGACACAGCTTCTC	21	SauCas9
TIGIT4215	AGCTGCACCTGCTGGGCTCTG	21	SauCas9
TIGIT4216	GCTGGGCTCTGTGGAGAGCAG	21	SauCas9
TIGIT4217	TGGGCTCTGTGGAGAGCAGCG	21	SauCas9
TIGIT4218	CTGCATGACTACTTCAATGTC	21	SauCas9
TIGIT4219	AATGTCCTGAGTTACAGAAGC	21	SauCas9
TIGIT4220	TGGGTAAGTGCAGCTTCTTCA	21	SauCas9
TIGIT4221	GACAGGCACAATAGAAACAA	20	SpyCas9
TIGIT4222	ACAGGCACAATAGAAACAAC	20	SpyCas9
TIGIT4223	CAGGCACAATAGAAACAACG	20	SpyCas9
TIGIT4224	GGGAACATTTCTGCAGAGAA	20	SpyCas9
TIGIT4225	AACATTTCTGCAGAGAAAGG	20	SpyCas9

TIGIT4226	ATGTCACCTCTCCTCCACCA	20	SpyCas9
TIGIT4227	CTTGTGCCGTGGTGGAGGAG	20	SpyCas9
TIGIT4228	GGTCACTTGTGCCGTGGTGG	20	SpyCas9
TIGIT4229	CACCACGGCACAAGTGACCC	20	SpyCas9
TIGIT4230	CTGGGTCACTTGTGCCGTGG	20	SpyCas9
TIGIT4231	GACCTGGGTCACTTGTGCCG	20	SpyCas9
TIGIT4232	CACAAGTGACCCAGGTCAAC	20	SpyCas9
TIGIT4233	ACAAGTGACCCAGGTCAACT	20	SpyCas9
TIGIT4234	CCAGGTCAACTGGGAGCAGC	20	SpyCas9
TIGIT4235	CTGCTGCTCCCAGTTGACCT	20	SpyCas9
TIGIT4236	CCTGCTGCTCCCAGTTGACC	20	SpyCas9
TIGIT4237	GGAGCAGCAGGACCAGCTTC	20	SpyCas9
TIGIT4238	CATTACAAATGGCCAGAAGC	20	SpyCas9
TIGIT4239	GGCCATTTGTAATGCTGACT	20	SpyCas9
TIGIT4240	GCCATTTGTAATGCTGACTT	20	SpyCas9
TIGIT4241	CCATTTGTAATGCTGACTTG	20	SpyCas9
TIGIT4242	TTTGTAATGCTGACTTGGGG	20	SpyCas9
TIGIT4243	CCCCAAGTCAGCATTACAAA	20	SpyCas9
TIGIT4244	GCACATCTCCCCATCCTTCA	20	SpyCas9
TIGIT4245	CCCATCCTTCAAGGATCGAG	20	SpyCas9
TIGIT4246	CACTCGATCCTTGAAGGATG	20	SpyCas9
TIGIT4247	CCACTCGATCCTTGAAGGAT	20	SpyCas9
TIGIT4248	GCCACTCGATCCTTGAAGGA	20	SpyCas9
TIGIT4249	TTCAAGGATCGAGTGGCCCC	20	SpyCas9
TIGIT4250	TGGGGCCACTCGATCCTTGA	20	SpyCas9
TIGIT4251	GATCGAGTGGCCCCAGGTCC	20	SpyCas9
TIGIT4252	AGTGGCCCCAGGTCCCGGCC	20	SpyCas9
TIGIT4253	GTGGCCCCAGGTCCCGGCCT	20	SpyCas9
TIGIT4254	GAGGCCCCAGGCCGGGACCTG	20	SpyCas9
TIGIT4255	TGAGGCCCCAGGCCGGGACCT	20	SpyCas9
TIGIT4256	GTGAGGCCCCAGGCCGGGACC	20	SpyCas9
TIGIT4257	TGGAGGGTGAGGCCAGGCC	20	SpyCas9
TIGIT4258	CTGGAGGGTGAGGCCAGGC	20	SpyCas9
TIGIT4259	GCGACTGGAGGGTGAGGCC	20	SpyCas9
TIGIT4260	CGGTCAGCGACTGGAGGGTG	20	SpyCas9
TIGIT4261	GTTACGGTCAGCGACTGGA	20	SpyCas9
TIGIT4262	CGTTCAGGTCAGCGACTGG	20	SpyCas9
TIGIT4263	TATCGTTCAGGTCAGCGAC	20	SpyCas9
TIGIT4264	TCGCTGACCGTGAACGATAC	20	SpyCas9
TIGIT4265	CGCTGACCGTGAACGATACA	20	SpyCas9
TIGIT4266	GCTGACCGTGAACGATACAG	20	SpyCas9
TIGIT4267	GTACTCCCCTGTATCGTTCA	20	SpyCas9
TIGIT4268	ATCTATCACACCTACCCTGA	20	SpyCas9
TIGIT4269	TCTATCACACCTACCCTGAT	20	SpyCas9

TIGIT4270	TACCCTGATGGGACGTACAC	20	SpyCas9
TIGIT4271	ACCCTGATGGGACGTACACT	20	SpyCas9
TIGIT4272	AGTGTACGTCCCATCAGGGT	20	SpyCas9
TIGIT4273	TCCCAGTGTACGTCCCATCA	20	SpyCas9
TIGIT4274	CTCCCAGTGTACGTCCCATC	20	SpyCas9
TIGIT4275	GTACACTGGGAGAATCTTCC	20	SpyCas9
TIGIT4276	CACTGGGAGAATCTTCTGG	20	SpyCas9
TIGIT4277	CTGAGCTTTCTAGGACCTCC	20	SpyCas9
TIGIT4278	AGGTTCCAGATTCCATTGCT	20	SpyCas9
TIGIT4279	AAGCAATGGAATCTGGAACC	20	SpyCas9
TIGIT4280	GATTCCATTGCTTGGAGCCA	20	SpyCas9
TIGIT4281	TGGCTCCAAGCAATGGAATC	20	SpyCas9
TIGIT4282	GCGGCCATGGCTCCAAGCAA	20	SpyCas9
TIGIT4283	TGGAGCCATGGCCGCGACGC	20	SpyCas9
TIGIT4284	AGCCATGGCCGCGACGCTGG	20	SpyCas9
TIGIT4285	GACCACCAGCGTCGCGGCCA	20	SpyCas9
TIGIT4286	GCAGATGACCACCAGCGTCG	20	SpyCas9
TIGIT4287	CATCTGCACAGCAGTCATCG	20	SpyCas9
TIGIT4288	CTGCACAGCAGTCATCGTGG	20	SpyCas9
TIGIT4289	AGCCCTCAGAATCCATTCTG	20	SpyCas9
TIGIT4290	CTCAGAATCCATTCTGTGGA	20	SpyCas9
TIGIT4291	TTCCACAGAATGGATTCTGA	20	SpyCas9
TIGIT4292	CTTCCACAGAATGGATTCTG	20	SpyCas9
TIGIT4293	ATTCTGTGGAAGGTGACCTC	20	SpyCas9
TIGIT4294	TGAGGTCACCTTCCACAGAA	20	SpyCas9
TIGIT4295	GACCTCAGGAGAAAATCAGC	20	SpyCas9
TIGIT4296	CAGGAGAAAATCAGCTGGAC	20	SpyCas9
TIGIT4297	GTCCAGCTGATTTTCTCCTG	20	SpyCas9
TIGIT4298	GAGAAAATCAGCTGGACAGG	20	SpyCas9
TIGIT4299	AATCAGCTGGACAGGAGGAA	20	SpyCas9
TIGIT4300	CCCAGTGCTCCCTCACCCCC	20	SpyCas9
TIGIT4301	CTGGGGGTGAGGGAGCACTG	20	SpyCas9
TIGIT4302	CCTGGGGGTGAGGGAGCACT	20	SpyCas9
TIGIT4303	TCCTGGGGGTGAGGGAGCAC	20	SpyCas9
TIGIT4304	ACACAGCTTCTGGGGGTGA	20	SpyCas9
TIGIT4305	GACACAGCTTCTGGGGGTG	20	SpyCas9
TIGIT4306	ACCCCCAGGAAGCTGTGTCC	20	SpyCas9
TIGIT4307	GCCTGGACACAGCTTCTGG	20	SpyCas9
TIGIT4308	TGCCTGGACACAGCTTCTG	20	SpyCas9
TIGIT4309	CTGCCTGGACACAGCTTCTT	20	SpyCas9
TIGIT4310	TCTGCCTGGACACAGCTTCC	20	SpyCas9
TIGIT4311	CAGGCAGAAGCTGCACCTGC	20	SpyCas9
TIGIT4312	AGGCAGAAGCTGCACCTGCT	20	SpyCas9
TIGIT4313	CAGCAGGTGCAGCTTCTGCC	20	SpyCas9

TIGIT4314	GCTGCACCTGCTGGGCTCTG	20	SpyCas9
TIGIT4315	TGCTCTCCACAGAGCCCAGC	20	SpyCas9
TIGIT4316	CTGGGCTCTGTGGAGAGCAG	20	SpyCas9
TIGIT4317	TGGGCTCTGTGGAGAGCAGC	20	SpyCas9
TIGIT4318	GGGCTCTGTGGAGAGCAGCG	20	SpyCas9
TIGIT4319	CTGTGGAGAGCAGCGGGGAG	20	SpyCas9
TIGIT4320	ATTGAAGTAGTCATGCAGCT	20	SpyCas9
TIGIT4321	TGTCCTGAGTTACAGAAGCC	20	SpyCas9
TIGIT4322	GTCCTGAGTTACAGAAGCCT	20	SpyCas9
TIGIT4323	TACCCAGGCTTCTGTAACTC	20	SpyCas9
TIGIT4324	TGAAGAAGCTGCAGTTACCC	20	SpyCas9
TIGIT4325	TGCAGCTTCTCACAGAGAC	20	SpyCas9
TIGIT5053	GTTGTTTCTATTGTGCCTGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5054	CGTTGTTTCTATTGTGCCTG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5055	CCGTTGTTTCTATTGTGCCT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5056	CCACGGCACAAGTGACCCAG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5057	AGTTGACCTGGGTCACCTTGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5058	AAGTCAGCATTACAAATGGC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5059	CATCCTCAAGGATCGAGTG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5060	ATCCTCAAGGATCGAGTGG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5061	AGGATCGAGTGGCCCCAGGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5062	AGGTCCCGGCCTGGGCCTCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5063	GGCCTGGGCCTCACCTCCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5064	CGGTCAGCGACTGGAGGGTG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5065	GTCGCTGACCGTGAACGATA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5066	TGTATCGTTCACGGTCAGCG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5067	CTGTATCGTTCACGGTCAGC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5068	ATCAGGGTAGGTGTGATAGA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5069	AGTGTACGTCCCATCAGGGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5070	GGAAGATTCTCCCAGTGTAC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5071	TGGAGGTCTTAGAAAGCTCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5072	AGCAATGGAATCTGGAACCT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5073	AGATTCCATTGCTTGGAGCC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5074	GATTCCATTGCTTGGAGCCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5075	ATTGCTTGGAGCCATGGCCG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5076	TTGCTTGGAGCCATGGCCGC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5077	CAGAATGGATTCTGAGGGCT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5078	ACAGAATGGATTCTGAGGGC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5079	TTCTGTGGAAGGTGACCTCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5080	GCTGATTTTCTCCTGAGGTC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5081	TCCTGTCCAGCTGATTTTCT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5082	TTCTCCTGTCCAGCTGATT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5083	TGGGGGTGAGGGAGCACTGG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5084	AGTGCTCCCTCACCCCAGG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5085	TCACCCCCAGGAAGCTGTGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5086	CAGGAAGCTGTGTCCAGGCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5087	AGGAAGCTGTGTCCAGGCAG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5088	GGCAGAAGCTGCACCTGCTG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5089	CAGAGCCCAGCAGGTGCAGC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5090	GCTGCTCTCCACAGAGCCCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5091	CGCTGCTCTCCACAGAGCCC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5092	ATGTCCTGAGTTACAGAAGC	20	AsCpf1 RR

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения в настоящем изобретении представляет собой gRNA, которая нацеливается на ADORA2a (gRNA ADORA2a). В некоторых вариантах осуществления gRNA, которая нацеливается на ADORA2a, представляет собой одну или несколько из gRNA, описанных в табл. 5.



## gRNA ADORA2a

Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (ДНК)	Длина	Фермент
ADORA2A337	GAGCACACCCACTGCGATGT	20	SpyCas9
ADORA2A338	GATGGCCAGGAGACTGAAGA	20	SpyCas9
ADORA2A339	CTGCTACCGGAGCGGGATG	20	SpyCas9
ADORA2A340	GTCTGTGGCCATGCCCATCA	20	SpyCas9
ADORA2A341	TCACCGGAGCGGGATGCGGA	20	SpyCas9
ADORA2A342	GTGGCAGGCAGCGCAGAACC	20	SpyCas9
ADORA2A343	AGCACACCAGCACATTGCC	20	SpyCas9
ADORA2A344	CAGGTTGCTGTTGAGCCACA	20	SpyCas9
ADORA2A345	CTTCATTGCCTGCTTCGTCC	20	SpyCas9
ADORA2A346	GTACACCGAGGAGCCCATGA	20	SpyCas9
ADORA2A347	GATGGCAATGTAGCGGTCAA	20	SpyCas9
ADORA2A348	CTCCTCGGTGTACATCACGG	20	SpyCas9
ADORA2A349	CGAGGAGCCCATGATGGGCA	20	SpyCas9
ADORA2A350	GGGCTCCTCGGTGTACATCA	20	SpyCas9
ADORA2A351	CTTTGTGGTGTCACTGGCGG	20	SpyCas9
ADORA2A352	CCGCTCCGGTGAGCAGGGCC	20	SpyCas9
ADORA2A353	GGGTTCTGCGCTGCCTGCCA	20	SpyCas9
ADORA2A354	GGACGAAGCAGGCAATGAAG	20	SpyCas9
ADORA2A355	GTGCTGATGGTGATGGCAAA	20	SpyCas9
ADORA2A356	AGCGCAGAACCCGGTGTGA	20	SpyCas9
ADORA2A357	GAGCTCCATCTTCAGTCTCC	20	SpyCas9
ADORA2A358	TGCTGATGGTGATGGCAAAG	20	SpyCas9
ADORA2A359	GGCGGCGCCGACATCGCAG	20	SpyCas9
ADORA2A360	AATGAAGAGGCAGCCGTGGC	20	SpyCas9
ADORA2A361	GGGCAATGTGCTGGTGTGCT	20	SpyCas9

ADORA2A362	CATGCCCATCATGGGCTCCT	20	SpyCas9
ADORA2A363	AATGTAGCGGTCAATGGCGA	20	SpyCas9
ADORA2A364	AGTAGTTGGTGACGTTCTGC	20	SpyCas9
ADORA2A365	AGCGGTCAATGGCGATGGCC	20	SpyCas9
ADORA2A366	CGCATCCCCGCTCCGGTGAGC	20	SpyCas9
ADORA2A367	GCATCCCGCTCCGGTGAGCA	20	SpyCas9
ADORA2A368	TGGGCAATGTGCTGGTGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A369	CAACTACTTTGTGGTGTAC	20	SpyCas9
ADORA2A370	CGCTCCGGTGAGCAGGGCCG	20	SpyCas9
ADORA2A371	GATGGTGATGGCAAAGGGGA	20	SpyCas9
ADORA2A372	GGTGACATCACGGTGGAGC	20	SpyCas9
ADORA2A373	GAACGTCACCAACTACTTTG	20	SpyCas9
ADORA2A374	CAGTGACACCACAAAGTAGT	20	SpyCas9
ADORA2A375	GGCCATCCTGGGCAATGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A376	CCCGGCCCTGCTCACCGGAG	20	SpyCas9
ADORA2A377	CACCAGCACATTGCCAGGA	20	SpyCas9
ADORA2A378	TTTGCCATCACCATCAGCAC	20	SpyCas9
ADORA2A379	CTCCACCGTGATGTACCCG	20	SpyCas9
ADORA2A380	GGAGCTGGCCATTGCTGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A381	CAGGATGGCCAGCACAGCAA	20	SpyCas9
ADORA2A382	GAACCCGGTGCTGATGGTGA	20	SpyCas9
ADORA2A383	TGGAGCTCTGCGTGAGGACC	20	SpyCas9
ADORA2A384	CCCGCTCCGGTGAGCAGGGC	20	SpyCas9
ADORA2A385	AGGCAATGAAGAGGCAGCCG	20	SpyCas9
ADORA2A386	CCGGCCCTGCTCACCGGAGC	20	SpyCas9
ADORA2A387	GCGGCGGCCGACATCGCAGT	20	SpyCas9
ADORA2A388	GGTGCTGATGGTGATGGCAA	20	SpyCas9
ADORA2A389	CTACTTTGTGGTGTCACTGG	20	SpyCas9
ADORA2A390	TACACCGAGGAGCCATGAT	20	SpyCas9
ADORA2A391	TCTGTGGCCATGCCATCAT	20	SpyCas9
ADORA2A392	ATTGCTGTGCTGGCCATCCT	20	SpyCas9
ADORA2A393	CGTGAGGACCAGGACGAAGC	20	SpyCas9
ADORA2A394	TTGCCATCACCATCAGCACC	20	SpyCas9
ADORA2A395	GGATGCGGATGGCAATGTAG	20	SpyCas9
ADORA2A396	TTGCCATCCGCATCCCCGCTC	20	SpyCas9
ADORA2A397	TGAAGATGGAGCTCTGCGTG	20	SpyCas9
ADORA2A398	CATTGCTGTGCTGGCCATCC	20	SpyCas9
ADORA2A399	TGCTGGTGTGCTGGGCCGTG	20	SpyCas9
ADORA2A820	GGCTCCTCGGTGTACATCACG	21	SauCas9
ADORA2A821	GAGCTCTGCGTGAGGACCAGG	21	SauCas9
ADORA2A822	GATGGAGCTCTGCGTGAGGAC	21	SauCas9
ADORA2A823	CCAGCACACCAGCACATTGCC	21	SauCas9
ADORA2A824	AGGACCAGGACGAAGCAGGCA	21	SauCas9
ADORA2A825	TGCCATCCGCATCCCCGCTCCG	21	SauCas9

ADORA2A826	GTGTGGCTCAACAGCAACCTG	21	SauCas9
ADORA2A827	AGCTCCACCGTGATGTACACC	21	SauCas9
ADORA2A828	GTAGCGGTCAATGGCGATGGC	21	SauCas9
ADORA2A829	CGGTGCTGATGGTGATGGCAA	21	SauCas9
ADORA2A830	CCCTGCTCACCGGAGCGGGAT	21	SauCas9
ADORA2A831	GTGACGTTCTGCAGGTTGCTG	21	SauCas9
ADORA2A832	GCTCCACCGTGATGTACACCG	21	SauCas9
ADORA2A833	ACTGAAGATGGAGCTCTGCGT	21	SauCas9
ADORA2A834	CCAGCTCCACCGTGATGTACA	21	SauCas9
ADORA2A835	CCTTTGCCATCACCATCAGCA	21	SauCas9
ADORA2A836	CCGGTGCTGATGGTGATGGCA	21	SauCas9
ADORA2A837	CCTGGGCAATGTGCTGGTGTG	21	SauCas9
ADORA2A838	AGGCAGCCGTGGCAGGCAGCG	21	SauCas9
ADORA2A839	GCGATGGCCAGGAGACTGAAG	21	SauCas9
ADORA2A840	CGATGGCCAGGAGACTGAAGA	21	SauCas9
ADORA2A841	TCCCGCTCCGGTGAGCAGGGC	21	SauCas9
ADORA2A842	TGCTTCGTCTGGTCTCACC	21	SauCas9
ADORA2A843	ACCAGGACGAAGCAGGCAATG	21	SauCas9
ADORA2A844	ATGTACACCGAGGAGCCCATG	21	SauCas9
ADORA2A845	TCGTCTGTGGCCATGCCATC	21	SauCas9
ADORA2A846	TCAATGGCGATGGCCAGGAGA	21	SauCas9
ADORA2A847	GGTGCTGATGGTGATGGCAAA	21	SauCas9
ADORA2A848	TAGCGGTCAATGGCGATGGCC	21	SauCas9
ADORA2A849	TCCGCATCCCGCTCCGGTGAG	21	SauCas9
ADORA2A850	CTGGCGGGCCGACATCGCA	21	SauCas9
ADORA2A851	GCCATTGCTGTGCTGGCCATC	21	SauCas9
ADORA2A852	ATCCCGCTCCGGTGAGCAGGG	21	SauCas9
ADORA2A853	AGACTGAAGATGGAGCTCTGC	21	SauCas9
ADORA2A854	CCCCGGCCCTGCTCACCGGAG	21	SauCas9
ADORA2A855	ATGGTGATGGCAAAGGGGATG	21	SauCas9
ADORA2A856	GCTCCTCGGTGTACATCACGG	21	SauCas9
ADORA2A248	TGTCGATGGCAATAGCCAAG	20	SpyCas9
ADORA2A249	AGAAGTTGGTGACGTTCTGC	20	SpyCas9
ADORA2A250	TTCGCCATCACCATCAGCAC	20	SpyCas9
ADORA2A251	GAAGAAGAGGCAGCCATGGC	20	SpyCas9
ADORA2A252	CACAAGCACGTTACCCAGGA	20	SpyCas9
ADORA2A253	CAACTTCTTCGTGGTATCTC	20	SpyCas9
ADORA2A254	CAGGATGGCCAGCACAGCAA	20	SpyCas9
ADORA2A255	AATTCCACTCCGGTGAGCCA	20	SpyCas9
ADORA2A256	AGCGCAGAAGCCAGTGCTGA	20	SpyCas9
ADORA2A257	GTGCTGATGGTGATGGCGAA	20	SpyCas9
ADORA2A258	GGAGCTGGCCATTGCTGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A259	AATAGCCAAGAGGCTGAAGA	20	SpyCas9
ADORA2A260	CTCCTCGGTGTACATCATGG	20	SpyCas9

ADORA2A261	GGACAAAGCAGGCGAAGAAG	20	SpyCas9
ADORA2A262	TCTGGCGGGCGGCTGACATCG	20	SpyCas9
ADORA2A263	TGGGTAACGTGCTTGTGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A264	GATGTACACCGAGGAGCCCA	20	SpyCas9
ADORA2A265	TAACCCCTGGCTCACCGGAG	20	SpyCas9
ADORA2A266	TCACCGGAGTGGAATTCGGA	20	SpyCas9
ADORA2A267	GCGGCGGCTGACATCGCGGT	20	SpyCas9
ADORA2A268	GATGGTGATGGCGAATGGGA	20	SpyCas9
ADORA2A269	GGCTTCTGCGCTGCCTGCCA	20	SpyCas9
ADORA2A270	ATTCCACTCCGGTGAGCCAG	20	SpyCas9
ADORA2A271	GGTGATCATCATGGTGGAGC	20	SpyCas9
ADORA2A272	ATTGCTGTGCTGGCCATCCT	20	SpyCas9
ADORA2A273	CTCCACCATGATGTACACCG	20	SpyCas9
ADORA2A274	GGCGGCGGCTGACATCGCGG	20	SpyCas9
ADORA2A275	TACACCGAGGAGCCCATGGC	20	SpyCas9
ADORA2A276	GGGTAACGTGCTTGTGTGCT	20	SpyCas9
ADORA2A277	CAGGTTGCTGTTGATCCACA	20	SpyCas9
ADORA2A278	TGAAGATGGAACCTGCGTG	20	SpyCas9
ADORA2A279	GATGGCGATGTATCTGTCTGA	20	SpyCas9
ADORA2A280	CTTCTTCGCCTGCTTTGTCC	20	SpyCas9
ADORA2A281	AGGCGAAGAAGAGGCAGCCA	20	SpyCas9
ADORA2A282	TGCTTGTGTGCTGGGCCGTG	20	SpyCas9
ADORA2A283	GAAGCCAGTGCTGATGGTGA	20	SpyCas9
ADORA2A284	CGTGAGGACCAGGACAAAGC	20	SpyCas9
ADORA2A285	TGGAACCTGCGTGAGGACC	20	SpyCas9
ADORA2A286	CATTGCTGTGCTGGCCATCC	20	SpyCas9
ADORA2A287	TTCTCCCGCCATGGGCTCCT	20	SpyCas9
ADORA2A288	TGGCTCACCGGAGTGGAATT	20	SpyCas9
ADORA2A289	TGCTGATGGTGATGGCGAAT	20	SpyCas9
ADORA2A290	CTTCGTGGTATCTCTGGCGG	20	SpyCas9
ADORA2A291	AGCACACAAGCACGTTACCC	20	SpyCas9
ADORA2A292	GGGCTCCTCGGTGTACATCA	20	SpyCas9
ADORA2A293	GTACACCGAGGAGCCCATGG	20	SpyCas9
ADORA2A294	GAACGTCACCAACTTCTTCG	20	SpyCas9
ADORA2A295	TCGCCATCCGAATTCCACTC	20	SpyCas9
ADORA2A296	GAGTTCCATCTTCAGCCTCT	20	SpyCas9
ADORA2A297	GAATTCCACTCCGGTGAGCC	20	SpyCas9
ADORA2A298	CAGAGATACCACGAAGAAGT	20	SpyCas9
ADORA2A299	CTTCTTCGTGGTATCTCTGG	20	SpyCas9
ADORA2A695	CAGTGCTGATGGTGATGGCGA	21	SauCas9
ADORA2A696	CGAATTCCACTCCGGTGAGCC	21	SauCas9
ADORA2A697	CCGAATTCCACTCCGGTGAGC	21	SauCas9
ADORA2A698	GCTGAAGATGGAACCTGCGT	21	SauCas9
ADORA2A699	CGTGCTTGTGTGCTGGGCCGT	21	SauCas9

ADORA2A700	GTGAGGACCAGGACAAAGCAG	21	SauCas9
ADORA2A701	TCGATGGCAATAGCCAAGAGG	21	SauCas9
ADORA2A702	CATCGACAGATACATCGCCAT	21	SauCas9
ADORA2A703	GTACACCGAGGAGCCCATGGC	21	SauCas9
ADORA2A704	GCTCCACCATGATGTACACCG	21	SauCas9
ADORA2A705	AAGCCAGTGCTGATGGTGATG	21	SauCas9
ADORA2A706	CACCGCGATGTCAGCCGCCGC	21	SauCas9
ADORA2A707	AGGCTGAAGATGGAACTCTGC	21	SauCas9
ADORA2A708	GCCGCCGCCAGAGATACCACG	21	SauCas9
ADORA2A709	AGCTCCACCATGATGTACACC	21	SauCas9
ADORA2A710	AGGCAGCCATGGCAGGCAGCG	21	SauCas9
ADORA2A711	CCTGGCTCACCGGAGTGGAAT	21	SauCas9
ADORA2A712	CCAGCTCCACCATGATGTACA	21	SauCas9
ADORA2A713	ACCAGGACAAAGCAGGCGAAG	21	SauCas9
ADORA2A714	CCTGGGTAACGTGCTTGTGTG	21	SauCas9
ADORA2A715	AGGACCAGGACAAAGCAGGCG	21	SauCas9
ADORA2A716	TCAGCCGCCGCCAGAGATACC	21	SauCas9
ADORA2A717	GGCTCCTCGGTGTACATCATG	21	SauCas9
ADORA2A718	CTGGCGGGCTGACATCGCG	21	SauCas9
ADORA2A719	GATGGAACTCTGCGTGAGGAC	21	SauCas9
ADORA2A720	GCTCCTCGGTGTACATCATGG	21	SauCas9
ADORA2A721	TGTACACCGAGGAGCCCATGG	21	SauCas9
ADORA2A722	GCCATTGCTGTGCTGGCCATC	21	SauCas9
ADORA2A723	CAATAGCCAAGAGGCTGAAGA	21	SauCas9
ADORA2A724	ATGGTGATGGCGAATGGGATG	21	SauCas9
ADORA2A725	ATGTACACCGAGGAGCCCATG	21	SauCas9
ADORA2A726	GTGTGGATCAACAGCAACCTG	21	SauCas9
ADORA2A727	TGCTTTGTCCTGGTCCTCACG	21	SauCas9
ADORA2A728	GTAACCCCTGGCTCACCGGAG	21	SauCas9
ADORA2A729	CCAGCACACAAGCACGTTACC	21	SauCas9
ADORA2A730	TATCTGTTCGATGGCAATAGCC	21	SauCas9
ADORA2A731	GCAATAGCCAAGAGGCTGAAG	21	SauCas9
ADORA2A732	AGTGCTGATGGTGATGGCGAA	21	SauCas9
ADORA2A733	ACACCGAGGAGCCCATGGCGG	21	SauCas9
ADORA2A734	CGCCATCCGAATTCCTACTCCG	21	SauCas9
ADORA2A4111	TGGTGCTACTGGCGGGGCC	20	AsCpf1
ADORA2A4112	CCATCACCATCAGCACCGGG	20	AsCpf1
ADORA2A4113	CCATCGGCCTGACTCCCATG	20	AsCpf1
ADORA2A4114	GCTGACCGCAGTTGTTCAA	20	AsCpf1
ADORA2A4115	AGGATGTGGTCCCCATGAAC	20	AsCpf1
ADORA2A4116	CCTGTGTGCTGGTGCCCTG	20	AsCpf1
ADORA2A4117	CGGATCTTCTGGCGGCGCG	20	AsCpf1
ADORA2A4118	CCCTCTGCTGGCTGCCCTA	20	AsCpf1
ADORA2A4119	TTCTGCCCCGACTGCAGCCA	20	AsCpf1

ADORA2A4120	AAGGCAGCTGGCACCAGTGC	20	AsCpfl
ADORA2A4121	TAAGGGCATCATTGCCATCTG	21	SauCas9
ADORA2A4122	CGGCCTGACTCCCATGCTAGG	21	SauCas9
ADORA2A4123	GCAGTTGTTCCAACCTAGCAT	21	SauCas9
ADORA2A4124	CCGCAGTTGTTCCAACCTAGC	21	SauCas9
ADORA2A4125	CAAGAACCCTCCAGGGCTG	21	SauCas9
ADORA2A4126	CTTGGCCCTCCCCGAGCCCT	21	SauCas9
ADORA2A4127	CACTTGGCCCTCCCCGAGCC	21	SauCas9
ADORA2A4128	GGCCAAGTGGCCTGTCTCTTT	21	SauCas9
ADORA2A4129	TTCATGGGGACCACATCCTCA	21	SauCas9
ADORA2A4130	TGAAGTACACCATGTAGTTCA	21	SauCas9
ADORA2A4131	CTGGTGCCCTGCTGCTCATG	21	SauCas9
ADORA2A4132	GCTCATGCTGGGTGTCTATTT	21	SauCas9
ADORA2A4133	CTTCAGCTGTCGTGCGCCGC	21	SauCas9
ADORA2A4134	CGCGACGACAGCTGAAGCAGA	21	SauCas9
ADORA2A4135	GATGGAGAGCCAGCCTCTGCC	21	SauCas9
ADORA2A4136	GCGTGGCTGCAGTCGGGGCAG	21	SauCas9
ADORA2A4137	ACGATGGCCAGGTACATGAGC	21	SauCas9
ADORA2A4138	CTCTCCCACACCAATTCGGTT	21	SauCas9
ADORA2A4139	GATTCACAACCGAATTGGTGT	21	SauCas9
ADORA2A4140	GGGATTACAACCGAATTGGT	21	SauCas9
ADORA2A4141	CGTAGATGAAGGGATTCACAA	21	SauCas9
ADORA2A4142	GGATACGGTAGGCGTAGATGA	21	SauCas9
ADORA2A4143	TCATCTACGCCTACCGTATCC	21	SauCas9
ADORA2A4144	CGGATACGGTAGGCGTAGATG	21	SauCas9
ADORA2A4145	GCGGAAGGTCTGGCGGAACTC	21	SauCas9
ADORA2A4146	AATGATCTTGGCGGAAGGTCTG	21	SauCas9
ADORA2A4147	GACGTGGCTGCGAATGATCTT	21	SauCas9
ADORA2A4148	TTGCTGCCTCAGGACGTGGCT	21	SauCas9
ADORA2A4149	CAAGGCAGCTGGCACCAGTGC	21	SauCas9
ADORA2A4150	CGGGCACTGGTGCCAGCTGCC	21	SauCas9
ADORA2A4151	CTTGGCAGCTCATGGCAGTGA	21	SauCas9
ADORA2A4152	CCGTCTCAACGGCCACCCGCC	21	SauCas9
ADORA2A4153	CACACTCCTGGCGGGTGGCCG	21	SauCas9
ADORA2A4154	TGCCGTTGGCCCACACTCCTG	21	SauCas9
ADORA2A4155	CCATTGGGCCTCCGCTCAGGG	21	SauCas9
ADORA2A4156	CATAGCCATTGGGCCTCCGCT	21	SauCas9
ADORA2A4157	AATGGCTATGCCCTGGGGCTG	21	SauCas9
ADORA2A4158	ATGCCCTGGGGCTGGTGAGTG	21	SauCas9
ADORA2A4159	GCCCTGGGGCTGGTGAGTGGA	21	SauCas9
ADORA2A4160	TGGTGAGTGGAGGGAGTGCCC	21	SauCas9
ADORA2A4161	GAGGGAGTGCCCAAGAGTCCC	21	SauCas9
ADORA2A4162	AGGGAGTGCCCAAGAGTCCC	21	SauCas9
ADORA2A4163	GTCTGGGAGGCCCGTGTTC	21	SauCas9

ADORA2A4164	CATGGCTAAGGAGCTCCACGT	21	SauCas9
ADORA2A4165	GAGCTCCTTAGCCATGAGCTC	21	SauCas9
ADORA2A4166	GCTCCTTAGCCATGAGCTCAA	21	SauCas9
ADORA2A4167	GGCCTAGATGACCCCTGGCC	21	SauCas9
ADORA2A4168	CCCCCTGGCCAGGATGGAGC	21	SauCas9
ADORA2A4169	CTCCTGCTCCATCTGGGCCA	21	SauCas9
ADORA2A4416	CCGTGATGTACACCGAGGAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4417	CTTTGCCATCACCATCAGCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4418	TTTGCCATCACCATCAGCAC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4419	TTGCCTGCTTCGTCCTGGTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4420	TCCTGGTCCTCACGCAGAGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4421	TCTTCAGTCTCCTGGCCATC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4422	GTCTCCTGGCCATCGCCATT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4423	ACCTAGCATGGGAGTCAGGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4424	AACCTAGCATGGGAGTCAGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4425	ATGCTAGGTTGGAACAACCTG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4426	GCAGCCCTGGGAGTGGTTCT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4427	CGCAGCCCTGGGAGTGGTTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4428	AGGGCTGCGGGGAGGGCCAA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4429	TGGGGACCACATCTCAAAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4430	CATGAACTACATGGTGTACT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4431	ATGAACTACATGGTGTACTT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4432	ACTTCTTTGCCTGTGTGCTG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4433	TGCTGCTCATGCTGGGTGTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4434	CAAATAGACACCCAGCATGA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4435	GCTGTGCTCGCGCCGCCAGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4436	TGGCGGCGCGACGACAGCTG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4437	TCTGCTTCAGCTGTCGTCGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4438	GGCAGAGGCTGGCTCTCCAT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4439	CGGCAGAGGCTGGCTCTCCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4440	CCGGCAGAGGCTGGCTCTCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4441	CACTGCAGAAGGAGGTCCAT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4442	TGCTGCCAAGTCACTGGCCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4443	ACAATGATGGCCAGTGACTT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4444	TACACATCATCAACTGCTTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4445	CTTTCTTCTGCCCCGACTGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4446	GACTGCAGCCACGCCCTCT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4447	TCTCTGGCTCATGTACCTGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4448	CAACCGAATTGGTGTGGGAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4449	ACACCAATTCGGTTGTGAAT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4450	GTTGTGAATCCCTTCATCTA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4451	TTCATCTACGCCTACCGTAT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4452	TCTACGCCTACCGTATCCGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4453	CGAGTTCGCCAGACCTTCC	20	AsCpf1 RR

ADORA2A4454	GCCAGACCTTCCGCAAGATC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4455	CCAGACCTTCCGCAAGATCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4456	GCAAGATCATTCGCAGCCAC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4457	CAAGATCATTCGCAGCCACG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4458	CAGCCACGTCCTGAGGCAGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4459	AGGCAGCTGGCACCAGTGCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4460	TCACTGCCATGAGCTGCCAA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4461	TCTCAACGGCCACCCGCCAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4462	CTCAGGGTGGGGAGCACTGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4463	CACCCTGAGCGGAGGCCCAA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4464	ACCCTGAGCGGAGGCCCAAT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4465	AGGGCATAGCCATTGGGCCT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4466	CTCACCAGCCCCAGGGCATA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4467	TCCACTCACCAGCCCCAGGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4468	TGGGACTCTTGGGCACTCCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4469	CTGGGACTCTTGGGCACTCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4470	CCTGGGACTCTTGGGCACTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4471	AGGGGAACACGGGCCTCCCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4472	CGTCTGGGAGGCCCGTGTTT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4473	AGACGTGGAGCTCCTTAGCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4474	TTGAGCTCATGGCTAAGGAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4475	CTGGCCTAGATGACCCCTG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4476	TGGCCTAGATGACCCCTGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4477	TCCTGGGCCAGGGGGTCATC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4478	CTGGCCCAGGATGGAGCAGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4479	TGGCCCAGGATGGAGCAGGA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4480	CGCGAGTTCCGCCAGACCTT	20	AsCpf1 RVR
ADORA2A4481	CCCTGGGGCTGGTGAGTGGA	20	AsCpf1 RVR

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения в настоящем изобретении представляет собой gRNA, которая нацеливается на TGFbetaR2 (gRNA TGFbetaR2). В некоторых вариантах осуществления gRNA, которая нацеливается на TGFbetaR2, представляет собой одну или несколько из gRNA, описанных в табл. 6.

Таблица 6

## gRNA TGFbetaR2

Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (ДНК)	Длина	Фермент
TGFBR24326	CAGGACGATGTGCAGCGGCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24327	ACCGCACGTTTCAGAAGTCGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24328	ACAАCTGTGTAAATTTTGTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24329	CAACTGTGTAAATTTTGTGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24330	ACCTGTGACAACCAGAAATC	20	AsCpf1 RR



TGFBR24331	CCTGTGACAACCAGAAATCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24332	TGTGGCTTCTCACAGATGGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24333	TCTGTGAGAAGCCACAGGAA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24334	AAGCTCCCCTACCATGACTT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24335	GAATAAAGTCATGGTAGGGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24336	AGAATAAAGTCATGGTAGGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24337	CTACCATGACTTTATTCTGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24338	TACCATGACTTTATTCTGGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24339	TAATGCACTTTGGAGAAGCA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24340	TTCATAATGCACTTTGGAGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24341	AAGTGCATTATGAAGGAAAA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24342	TGTGTTCTGTAGCTCTGAT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24343	TGTAGCTCTGATGAGTGCAA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24344	AGTGACAGGCATCAGCCTCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24345	AGTGGTGGCAGGAGGCTGAT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24346	AGGTTGAACTCAGCTTCTGC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24347	CAGGTTGAACTCAGCTTCTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24348	ACCTGGGAAACCGGAAGAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24349	CGTCTTGCCGGTTTCCCAGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24350	GCGTCTTGCCGGTTTCCCAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24351	TGAGCTTCCGCGTCTTGCCG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24352	GCGAGCACTGTGCCATCATC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24353	GGATGATGGCACAGTGCTCG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24354	AGGATGATGGCACAGTGCTC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24355	CGTGTGCCAACAACATCAAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24356	GCTCAATGGGCAGCAGCTCT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24357	ACCAGGGTGTCCAGCTCAAT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24358	CACCAGGGTGTCCAGCTCAA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24359	CCACCAGGGTGTCCAGCTCA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24360	GCTTGCCCTTATAGACCTCA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24361	GAGCAGTTTGTAGACAGTGCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24362	AGAGGCATACTCCTCATAGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24363	CTATGAGGAGTATGCCTCTT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24364	AAGAGGCATACTCCTCATAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24365	TATGAGGAGTATGCCTCTTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24366	GATTGATGTCTGAGAAGATG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24367	CTCCTCAGCCGTCAGGAACT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24368	GTTCTGACGGCTGAGGAGC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24369	GCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24370	TGACGGCTGAGGAGCGGAAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24371	TCTTCCGCTCCTCAGCCGTC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24372	AACTCCGTCTTCCGCTCCTC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24373	CAACTCCGTCTTCCGCTCCT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24374	CCAACTCCGTCTTCCGCTCC	20	AsCpf1 RR

TGFBR24375	ACGCCAAGGGCAACCTACAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24376	CGCCAAGGGCAACCTACAGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24377	AGCTGATGACATGCCGCGTC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24378	GGGCGAGGGAGCTGCCCAGC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24379	CGGGCGAGGGAGCTGCCCAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24380	CCGGGCGAGGGAGCTGCCCA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24381	TCGCCCCGGGGATTGCTCAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24382	ACATGGAGTGTGATCACTGT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24383	CAGTGATCACACTCCATGTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24384	TGTGGGAGGCCCAAGATGCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24385	TGTGCACGATGGGCATCTTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24386	CGAGGATATTGGAGCTCTTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24387	ATATCCTCGTGAAGAACGAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24388	GACGCAGGGAAAGCCCAAAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24389	CTGCGTCTGGACCCTACTCT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24390	TGCGTCTGGACCCTACTCTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24391	CAGACAGAGTAGGGTCCAGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24392	GCCAGCACGATCCCACCACA	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24393	AAGGAAAAAAAAAAGCCTGG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24394	ACACCAGCAATCCTGACTTG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24395	ACTAGCAACAAGTCAGGATT	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24396	GCAACTCCCAGTGGTGGCAG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24397	TGTCATCATCATCTTCTACT	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24398	GACCTCAGCAAAGCGACCTT	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24399	AGGCCAAGCTGAAGCAGAAC	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24400	AGGAGTATGCCTCTTGGAAG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24401	CCTCTTGGAAGACAGAGAAG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24402	TTCTCATGCTTCAGATTGAT	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24403	CTCGTGAAGAACGACCTAAC	20	AsCpf1 RVR
TGFbR2036	GGCCGCTGCACATCGTCCCTG	20	SpyCas9
TGFbR2037	GCGGGGTCTGCCATGGGTCTG	20	SpyCas9
TGFbR2038	AGTTGCTCATGCAGGATTTC	20	SpyCas9
TGFbR2039	CCAGAATAAAGTCATGGTAG	20	SpyCas9
TGFbR2040	CCCCTACCATGACTTTATTC	20	SpyCas9
TGFbR2041	AAGTCATGGTAGGGGAGCTT	20	SpyCas9
TGFbR2042	AGTCATGGTAGGGGAGCTTG	20	SpyCas9
TGFbR2043	ATTGCACTCATCAGAGCTAC	20	SpyCas9

TGFbR2044	CCTAGAGTGAAGAGATTCAT	20	SpyCas9
TGFbR2045	CCAATGAATCTCTTCACTCT	20	SpyCas9
TGFbR2046	AAAGTCATGGTAGGGGAGCT	20	SpyCas9
TGFbR2047	GTGAGCAATCCCCGGGCGA	20	SpyCas9
TGFbR2048	GTCGTTCTTCACGAGGATAT	20	SpyCas9
TGFbR2049	GCCGCGTCAGGTACTCCTGT	20	SpyCas9
TGFbR2050	GACGCGGCATGTCATCAGCT	20	SpyCas9
TGFbR2051	GCTTCTGCTGCCGGTTAACG	20	SpyCas9
TGFbR2052	GTGGATGACCTGGCTAACAG	20	SpyCas9
TGFbR2053	GTGATCACACTCCATGTGGG	20	SpyCas9
TGFbR2054	GCCCATTGAGCTGGACACCC	20	SpyCas9
TGFbR2055	GCGGTCATCTTCCAGGATGA	20	SpyCas9
TGFbR2056	GGGAGCTGCCAGCTTGCGC	20	SpyCas9
TGFbR2057	GTTGATGTTGTTGGCACACG	20	SpyCas9
TGFbR2058	GGCATCTTGGGCCCTCCACA	20	SpyCas9
TGFbR2059	GCGGCATGTCATCAGCTGGG	20	SpyCas9
TGFbR2060	GTCCTCAGCCGTCAGGAAC	20	SpyCas9
TGFbR2061	GCTGGTGTATATTCTGATG	20	SpyCas9
TGFbR2062	CCGACTTCTGAACGTGCGGT	20	SpyCas9
TGFbR2063	TGCTGGCGATACGCGTCCAC	20	SpyCas9
TGFbR2064	CCGACTTCTGAACGTGCGG	20	SpyCas9
TGFbR2065	CCACCGCACGTTCAGAAGTC	20	SpyCas9
TGFbR2066	TCACCCGACTTCTGAACGTG	20	SpyCas9
TGFbR2067	CCCACCGCACGTTCAGAAGT	20	SpyCas9
TGFbR2068	CGAGCAGCGGGGTCTGCCAT	20	SpyCas9
TGFbR2069	ACGAGCAGCGGGGTCTGCCA	20	SpyCas9
TGFbR2070	AGCGGGGTCTGCCATGGGTC	20	SpyCas9
TGFbR2071	CCTGAGCAGCCCCGACCCA	20	SpyCas9
TGFbR2072	CCATGGGTGCGGGGCTGCTC	20	SpyCas9
TGFbR2073	AACGTGCGGTGGGATCGTGC	20	SpyCas9
TGFbR2074	GGACGATGTGCAGCGGCCAC	20	SpyCas9
TGFbR2075	GTCCACAGGACGATGTGCAG	20	SpyCas9
TGFbR2076	CATGGGTGCGGGGCTGCTCA	20	SpyCas9
TGFbR2077	CAGCGGGGTCTGCCATGGGT	20	SpyCas9
TGFbR2078	ATGGGTGCGGGGCTGCTCAG	20	SpyCas9
TGFbR2079	CGGGGTCTGCCATGGGTGCGG	20	SpyCas9
TGFbR2080	AGGAAGTCTGTGTGGCTGTA	20	SpyCas9
TGFbR2081	CTCCATCTGTGAGAAGCCAC	20	SpyCas9
TGFbR2082	ATGATAGTCACTGACAACAA	20	SpyCas9
TGFbR2083	GATGCTGCAGTTGCTCATGC	20	SpyCas9
TGFbR2084	ACAGCCACACAGACTTCCTG	20	SpyCas9
TGFbR2085	GAAGCCACAGGAAGTCTGTG	20	SpyCas9
TGFbR2086	TTCCTGTGGCTTCTCACAGA	20	SpyCas9
TGFbR2087	CTGTGGCTTCTCACAGATGG	20	SpyCas9

TGFbR2088	TCACAAAATTTACACAGTTG	20	SpyCas9
TGFbR2089	GACAACATCATCTTCTCAGA	20	SpyCas9
TGFbR2090	TCCAGAATAAAGTCATGGTA	20	SpyCas9
TGFbR2091	GGTAGGGGAGCTTGGGGTCA	20	SpyCas9
TGFbR2092	TTCTCCAAAGTGCATTATGA	20	SpyCas9
TGFbR2093	CATCTTCCAGAATAAAGTCA	20	SpyCas9
TGFbR2094	CACATGAAGAAAGTCTCACC	20	SpyCas9
TGFbR2095	TTCCAGAATAAAGTCATGGT	20	SpyCas9
TGFbR2096	TTTTCTTCATAATGCACTT	20	SpyCas9
TGFBR24024	CACAGTTGTGGAAACTTGAC	20	AsCpf1
TGFBR24039	CCCAACTCCGTCTTCCGCTC	20	AsCpf1
TGFBR24040	GGCTTTCCTGCGTCTGGAC	20	AsCpf1
TGFBR24036	CTGAGGTCTATAAGGCCAAG	20	AsCpf1
TGFBR24026	TGATGTGAGATTTTCCACCT	20	AsCpf1
TGFBR24038	CCTATGAGGAGTATGCCTCT	20	AsCpf1
TGFBR24033	AAGTGACAGGCATCAGCCTC	20	AsCpf1
TGFBR24028	CCATGACCCCAAGTCCCCT	20	AsCpf1
TGFBR24031	CTTCATAATGCACTTTGGAG	20	AsCpf1
TGFBR24032	TTCATGTGTTCTGTAGCTC	20	AsCpf1
TGFBR24029	TTCTGGAAGATGCTGCTTCT	20	AsCpf1
TGFBR24035	CCCACCAGGGTGTCCAGCTC	20	AsCpf1
TGFBR24037	AGACAGTGGCAGTCAAGATC	20	AsCpf1
TGFBR24041	CCTGCGTCTGGACCCTACTC	20	AsCpf1
TGFBR24025	CACAACTGTGTAATTTTGT	20	AsCpf1
TGFBR24030	GAGAAGCAGCATCTTCCAGA	20	AsCpf1
TGFBR24027	TGGTTGTCACAGGTGAAAA	20	AsCpf1
TGFBR24034	CCAGGTTGAACTCAGCTTCT	20	AsCpf1
TGFBR24043	ATCACAAAATTTACACAGTTG	21	SauCas9
TGFBR24065	GGCATCAGCCTCCTGCCACCA	21	SauCas9
TGFBR24110	GTTAGCCAGGTCATCCACAGA	21	SauCas9
TGFBR24099	GCTGGGCAGCTCCCTCGCCG	21	SauCas9
TGFBR24064	CAGGAGGCTGATGCCTGTCAC	21	SauCas9
TGFBR24094	GAGGAGCGGAAGACGGAGTTG	21	SauCas9
TGFBR24108	CGTCTGGACCCTACTCTGTCT	21	SauCas9
TGFBR24058	TTTTCTTCATAATGCACTT	21	SauCas9
TGFBR24075	CCATTGAGCTGGACACCCTGG	21	SauCas9
TGFBR24057	CTTCTCCAAAGTGCATTATGA	21	SauCas9
TGFBR24103	GCCCAAGATGCCCATCGTGCA	21	SauCas9
TGFBR24060	TCATGTGTTCTGTAGCTCTG	21	SauCas9
TGFBR24048	GTGATGCTGCAGTTGCTCATG	21	SauCas9
TGFBR24087	TCTCATGCTTCAGATTGATGT	21	SauCas9
TGFBR24081	TCCCTATGAGGAGTATGCCTC	21	SauCas9
TGFBR24044	CATCACAAAATTTACACAGTT	21	SauCas9
TGFBR24077	ATTGAGCTGGACACCCTGGTG	21	SauCas9

TGFBR24080	CAGTCAAGATCTTTCCTATG	21	SauCas9
TGFBR24046	AGGATTTCTGGTTGTACAGG	21	SauCas9
TGFBR24101	TCCACAGTGATCACACTCCAT	21	SauCas9
TGFBR24079	AGCAGAACAACCTCAGAGCAGT	21	SauCas9
TGFBR24072	CCGGCAAGACGCGGAAGCTCA	21	SauCas9
TGFBR24074	GATGTCAGAGCGGTCATCTTC	21	SauCas9
TGFBR24062	TCATTGCACTCATCAGAGCTA	21	SauCas9
TGFBR24054	CTTCCAGAATAAAGTCATGGT	21	SauCas9
TGFBR24045	AGATTTTCCACCTGTGACAAC	21	SauCas9
TGFBR24049	ACTGCAGCATCACCTCCATCT	21	SauCas9
TGFBR24098	AGCTGGGCAGCTCCCTCGCCC	21	SauCas9
TGFBR24090	TGACGGCTGAGGAGCGGAAGA	21	SauCas9
TGFBR24076	CATTGAGCTGGACACCCTGGT	21	SauCas9
TGFBR24078	AGCAAAGCGACCTTCCCCAC	21	SauCas9
TGFBR24067	CGCGTTAACCGGCAGCAGAAG	21	SauCas9
TGFBR24063	GAAATATGACTAGCAACAAGT	21	SauCas9
TGFBR24107	AGACAGAGTAGGGTCCAGACG	21	SauCas9
TGFBR24047	CAGGATTTCTGGTTGTACAG	21	SauCas9
TGFBR24096	CTCCTGTAGGTTGCCCTTGGC	21	SauCas9
TGFBR24105	ACAGAGTAGGGTCCAGACGCA	21	SauCas9
TGFBR24056	GCTTCTCCAAAGTGCAATTATG	21	SauCas9
TGFBR24068	GCAGCAGAAGCTGAGTTCAAC	21	SauCas9
TGFBR24093	TGAGGAGCGGAAGACGGAGTT	21	SauCas9
TGFBR24055	CTTTGGAGAAGCAGCATCTTC	21	SauCas9
TGFBR24053	CTCCCCTACCATGACTTTATT	21	SauCas9
TGFBR24106	GACAGAGTAGGGTCCAGACGC	21	SauCas9
TGFBR24092	CTGAGGAGCGGAAGACGGAGT	21	SauCas9
TGFBR24102	GGGCATCTTGGGCCTCCACA	21	SauCas9
TGFBR24082	CCAAGAGGCATACTCCTCATA	21	SauCas9
TGFBR24051	AGAATGACGAGAACATAACAC	21	SauCas9
TGFBR24097	CCTGACGCGGCATGTCATCAG	21	SauCas9
TGFBR24073	AGCGAGCACTGTGCCATCATC	21	SauCas9
TGFBR24104	GCAGGTTAGGTCGTTCTTCAC	21	SauCas9
TGFBR24050	ACCTCCATCTGTGAGAAGCCA	21	SauCas9
TGFBR24052	TAAAGTCATGGTAGGGGAGCT	21	SauCas9
TGFBR24061	TCAGAGCTACAGGAACACATG	21	SauCas9
TGFBR24086	TCTCAGACATCAATCTGAAGC	21	SauCas9
TGFBR24066	CATCAGCCTCCTGCCACCACT	21	SauCas9
TGFBR24089	CGCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	21	SauCas9
TGFBR24071	AACCTGGGAAACCGGCAAGAC	21	SauCas9
TGFBR24095	TCCACGCCAAGGGCAACCTAC	21	SauCas9
TGFBR24100	GAGGTGAGCAATCCCCGGGC	21	SauCas9
TGFBR24069	CAGCAGAAGCTGAGTTCAACC	21	SauCas9
TGFBR24083	TCCAAGAGGCATACTCCTCAT	21	SauCas9
TGFBR24070	AGCAGAAGCTGAGTTCAACCT	21	SauCas9
TGFBR24088	CCAGTTCCTGACGGCTGAGGA	21	SauCas9
TGFBR24085	AGGAGTATGCCTCTTGAAGA	21	SauCas9
TGFBR24084	TTCCAAGAGGCATACTCCTCA	21	SauCas9
TGFBR24042	CAACTGTGTAATTTTGTGAT	21	SauCas9
TGFBR24059	TGAAGGAAAAAAAAAGCCTG	21	SauCas9
TGFBR24091	CGTCTCCGCTCCTCAGCCGT	21	SauCas9
TGFBR24109	CCAGGTCATCCACAGACAGAG	21	SauCas9
TGFBR2736	GCCTAGAGTGAAGAGATTCAT	21	SpyCas9
TGFBR2737	GTTCTCCAAGTGCATTATGA	21	SpyCas9
TGFBR2738	GCATCTCCAGAATAAAGTCA	21	SpyCas9

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения в настоящем изобретении представляет собой gRNA, которая нацеливается на CISH (gRNA CISH). В некоторых вариантах осуществления

gRNA, которая нацеливается на CISH, представляет собой одну или несколько из gRNA, описанных в табл. 7.

Таблица 7

## gRNA CISH

Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (ДНК)	Длина	Фермент
CISH0873	CAACCGTCTGGTGGCCGACG	20	SpyCas9
CISH0874	CAGGATCGGGGCTGTCGCTT	20	SpyCas9
CISH0875	TCGGGCCTCGCTGGCCGTAA	20	SpyCas9
CISH0876	GAGGTAGTCGGCCATGCGCC	20	SpyCas9
CISH0877	CAGGTGTTGTCGGGCCCTCGC	20	SpyCas9
CISH0878	GGAGGTAGTCGGCCATGCGC	20	SpyCas9
CISH0879	GGCATACTCAATGCGTACAT	20	SpyCas9
CISH0880	CCGCCTTGTCATCAACCGTC	20	SpyCas9
CISH0881	AGGATCGGGGCTGTCGCTTC	20	SpyCas9
CISH0882	CCTTGTCATCAACCGTCTGG	20	SpyCas9
CISH0883	TACTCAATGCGTACATTGGT	20	SpyCas9
CISH0884	GGGTTCCATTACGGCCAGCG	20	SpyCas9
CISH0885	GGCACTGCTTCTGCGTACAA	20	SpyCas9
CISH0886	GGTTGATGACAAGGCGGCAC	20	SpyCas9
CISH0887	TGCTGGGGCCTTCTCGAGG	20	SpyCas9
CISH0888	TTGCTGGCTGTGGAGCGGAC	20	SpyCas9
CISH0889	TTCTCCTACCTTCGGAATC	20	SpyCas9
CISH0890	GACTGGCTTGGGCAGTTCCA	20	SpyCas9
CISH0891	CATGCAGCCCTTGCCCTGCTG	20	SpyCas9
CISH0892	AGCAAAGGACGAGGTCTAGA	20	SpyCas9
CISH0893	GCCTGCTGGGGCCTTCCTCG	20	SpyCas9
CISH0894	CAGACTCACCAGATTCCCGA	20	SpyCas9

CISH0895	ACCTCGTCCTTTGCTGGCTG	20	SpyCas9
CISH0896	CTCACCAGATTCCCGAAGGT	20	SpyCas9
CISH7048	TACGCAGAAGCAGTGCCCGC	20	AsCpf1
CISH7049	AGGTGTACAGCAGTGGCTGG	20	AsCpf1
CISH7050	GGTGTACAGCAGTGGCTGGT	20	AsCpf1
CISH7051	CGGATGTGGTCAGCCTTGTG	20	AsCpf1
CISH7052	CACTGACAGCGTGAACAGGT	20	AsCpf1
CISH7053	ACTGACAGCGTGAACAGGTA	20	AsCpf1
CISH7054	GCTCACTCTCTGTCTGGGCT	20	AsCpf1
CISH7055	CTGGCTGTGGAGCGGACTGG	20	AsCpf1
CISH7056	GCTCTGACTGTACGGGGCAA	20	AsCpf1 RR
CISH7057	AGCTCTGACTGTACGGGGCA	20	AsCpf1 RR
CISH7058	ACAGTACCCCTTCCAGCTCT	20	AsCpf1 RR
CISH7059	CGTCGGCCACCAGACGGTTG	20	AsCpf1 RR
CISH7060	CCAGCCACTGCTGTACACCT	20	AsCpf1 RR
CISH7061	ACCCCGGCCCTGCCTATGCC	20	AsCpf1 RR
CISH7062	GGTATCAGCAGTGCAGGAGG	20	AsCpf1 RR
CISH7063	GATGTGGTCAGCCTTGTGCA	20	AsCpf1 RR
CISH7064	GGATGTGGTCAGCCTTGTGC	20	AsCpf1 RR
CISH7065	GGCCACGCATCCTGGCCTTT	20	AsCpf1 RR
CISH7066	GAAAGGCCAGGATGCGTGGC	20	AsCpf1 RR
CISH7067	ACTGCTTGTCCAGGCCACGC	20	AsCpf1 RR
CISH7068	TCTGGACTCCAAGTCTTGT	20	AsCpf1 RR
CISH7069	GTCTGGACTCCAAGTCTTG	20	AsCpf1 RR
CISH7070	GCTTCCGTCTGGACTCCAAC	20	AsCpf1 RR
CISH7071	GACGGAAGCTGGAGTCGGCA	20	AsCpf1 RR
CISH7072	CGCTGTCAGTAAAACCACT	20	AsCpf1 RR
CISH7073	CTGACAGCGTGAACAGGTAG	20	AsCpf1 RR
CISH7074	TTACGGCCAGCGAGGCCCGA	20	AsCpf1 RR
CISH7075	ATTACGGCCAGCGAGGCCCG	20	AsCpf1 RR
CISH7076	GGAATCTGGTGAGTCTGAGG	20	AsCpf1 RR
CISH7077	CCCTCAGACTCACCAGATTC	20	AsCpf1 RR
CISH7078	CGAAGGTAGGAGAAGGTCTT	20	AsCpf1 RR
CISH7079	GAAGGTAGGAGAAGGTCTTG	20	AsCpf1 RR
CISH7080	GCACCTTTGGCTCACTCTCT	20	AsCpf1 RR
CISH7081	TCGAGGAGGTGGCAGAGGGT	20	AsCpf1 RR
CISH7082	TGGAAGTGCCTAAGCCAGTC	20	AsCpf1 RR
CISH7083	AGGGACGGGGCCACAGGGG	20	AsCpf1 RR
CISH7084	GGGACGGGGCCACAGGGGC	20	AsCpf1 RR
CISH7085	CTCCACAGCCAGCAAAGGAC	20	AsCpf1 RR
CISH7086	CAGCCAGCAAAGGACGAGGT	20	AsCpf1 RR
CISH7087	CTGCCTTCTAGACCTCGTCC	20	AsCpf1 RR
CISH7088	CCTAAGGAGGATGCGCCTAG	20	AsCpf1 RVR

CISH7089	TGGCCTCCTGCACTGCTGAT	20	AsCpf1 RVR
CISH7090	AGCAGTGCAGGAGGCCACAT	20	AsCpf1 RVR
CISH7091	CCGACTCCAGCTTCCGTCTG	20	AsCpf1 RVR
CISH7092	GGGGTTCCATTACGGCCAGC	20	AsCpf1 RVR
CISH7093	CACAGCAGATCCTCCTCTGG	20	AsCpf1 RVR
CISH7094	ATTGCCCCGTACAGTCAGAG	21	SauCas9
CISH7095	CCCGTACAGTCAGAGCTGGA	21	SauCas9
CISH7096	TGGTGGAGGAGCAGGCAGTG	21	SauCas9
CISH7097	TCCTTAGGCATAGGCAGGGC	21	SauCas9
CISH7098	CGGCCCTGCCTATGCCTAAG	21	SauCas9
CISH7099	TAGGCATAGGCAGGGCCGGG	21	SauCas9
CISH7100	AGGCAGGGCCGGGGTGGGAG	21	SauCas9
CISH7101	GCAGGATCGGGGCTGTCTGCT	21	SauCas9
CISH7102	CTGCACAAGGCTGACCACAT	21	SauCas9
CISH7103	TGCACAAGGCTGACCACATC	21	SauCas9
CISH7104	CTGACCACATCCGAAAGGC	21	SauCas9
CISH7105	GGCCACGCATCCTGGCCTTT	21	SauCas9
CISH7106	GCGTGGCCTGGACAAGCAGT	21	SauCas9
CISH7107	GACAAGCAGTTGGAGTCCAG	21	SauCas9
CISH7108	GTTGGAGTCCAGACGGAAGC	21	SauCas9
CISH7109	ATGCGTACATTGGTGGGGCC	21	SauCas9
CISH7110	TGGCCCCACCAATGTACGCA	21	SauCas9
CISH7111	GCTACCTGTTACGCTGTCA	21	SauCas9
CISH7112	TGACAGCGTGAACAGGTAGC	21	SauCas9
CISH7113	GTCGGGCCTCGCTGGCCGTA	21	SauCas9
CISH7114	GCACTTGCTTAGGCTGGTAT	21	SauCas9
CISH7115	GGGAATCTGGTGAGTCTGAG	21	SauCas9
CISH7116	CTCACCAGATTCCCGAAGGT	21	SauCas9
CISH7117	CTCCTACCTTCGGAATCTG	21	SauCas9
CISH7118	CAAGACCTTCTCCTACCTC	21	SauCas9
CISH7119	CCAAGACCTTCTCCTACCT	21	SauCas9
CISH7120	GCCAAGACCTTCTCCTACCT	21	SauCas9
CISH7121	TATGCACAGCAGATCCTCCT	21	SauCas9
CISH7122	CAAAGGTGCTGGACCCAGAG	21	SauCas9
CISH7123	GGCTCACTCTCTGTCTGGGC	21	SauCas9
CISH7124	AGGGTACCCAGCCCAGACA	21	SauCas9
CISH7125	AGAGGGTACCCAGCCCAGA	21	SauCas9
CISH7126	GTACCCTCTGCCACCTCCTC	21	SauCas9
CISH7127	CCTTCTCGAGGAGGTGGCA	21	SauCas9
CISH7128	ATGACTGGCTTGGGCAGTTC	21	SauCas9
CISH7129	GGCCCTGTGGGCCCGTCC	21	SauCas9
CISH7130	AGGACGAGGTCTAGAAGGCA	21	SauCas9

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения в настоящем изобретении представляет собой gRNA, которая нацеливается на B2M (gRNA B2M). В некоторых вариантах осуществления gRNA, которая нацеливается на B2M, представляет собой одну или несколько из gRNA, описанных в табл. 8.



## gRNA B2M

Название gRNA	Последовательность нацеливающего домена gRNA (ДНК)	Длина	Фермент
B2M1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	20	SpyCas9
B2M2	GGGCACGCGTTTAATATAAG	20	SpyCas9
B2M3	ACTCACGCTGGATAGCCTCC	20	SpyCas9
B2M4	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	20	SpyCas9
B2M5	CACGCGTTTAATATAAGTGG	20	SpyCas9
B2M6	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	20	SpyCas9
B2M7	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	20	SpyCas9
B2M8	AGTGGAGGCGTCGCGCTGGC	20	SpyCas9
B2M9	GCCCCAATGCTGTCAGCTTC	20	SpyCas9
B2M10	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	20	SpyCas9
B2M11	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	20	SpyCas9
B2M12	GGCCACGGAGCGAGACATCT	20	SpyCas9
B2M13	CGTGAGTAAACCTGAATCTT	20	SpyCas9
B2M14	AGTCACATGGTTCACACGGC	20	SpyCas9
B2M15	AAGTCAACTTCAATGTCGGA	20	SpyCas9
B2M16	CAGTAAGTCAACTTCAATGT	20	SpyCas9
B2M17	ACCCAGACACATAGCAATTC	20	SpyCas9
B2M18	GCATACTCATCTTTTTCAGT	20	SpyCas9
B2M19	ACAGCCAAGATAGTTAAGT	20	SpyCas9
B2M20	GGCATACTCATCTTTTTCAG	20	SpyCas9
B2M21	TTCCTGAAGCTGACAGCATT	20	SpyCas9
B2M22	TCACGTCATCCAGCAGAGAA	20	SpyCas9
B2M23	CAGCCCAAGATAGTTAAGTG	20	SpyCas9
B2M-c1	AAUUCUCUCUCCAUUCUU	18	AsCpf1
B2M-c2	AAUUCUCUCUCCAUUCUUC	19	AsCpf1
B2M-c3	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCA	20	AsCpf1
B2M-c4	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAG	21	AsCpf1
B2M-c5	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGU	22	AsCpf1
B2M-c6	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGUA	23	AsCpf1
B2M-c7	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGUAA	24	AsCpf1

B2M-c8	ACUUUCCAUUCUCUGCUG	18	AsCpf1
B2M-c9	ACUUUCCAUUCUCUGCUGG	19	AsCpf1
B2M-c10	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGA	20	AsCpf1
B2M-c11	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAU	21	AsCpf1
B2M-c12	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAUG	22	AsCpf1
B2M-c13	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAUGA	23	AsCpf1
B2M-c14	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAUGAC	24	AsCpf1
B2M-c15	AGCAAGGACUGGUCUUUC	18	AsCpf1
B2M-c16	AGCAAGGACUGGUCUUUCU	19	AsCpf1
B2M-c17	AGCAAGGACUGGUCUUUCUA	20	AsCpf1
B2M-c18	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAU	21	AsCpf1
B2M-c19	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUC	22	AsCpf1
B2M-c20	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUCU	23	AsCpf1
B2M-c21	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUCUC	24	AsCpf1
B2M-c22	AGUGGGGGUGAAUUCAGU	18	AsCpf1
B2M-c23	AGUGGGGGUGAAUUCAGUG	19	AsCpf1
B2M-c24	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGU	20	AsCpf1
B2M-c25	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUA	21	AsCpf1
B2M-c26	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAG	22	AsCpf1
B2M-c27	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAGU	23	AsCpf1
B2M-c28	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAGUA	24	AsCpf1
B2M-c29	AUCCAUCCGACAUUGAAG	18	AsCpf1
B2M-c30	AUCCAUCCGACAUUGAAGU	19	AsCpf1
B2M-c31	AUCCAUCCGACAUUGAAGUU	20	AsCpf1
B2M-c32	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUG	21	AsCpf1
B2M-c33	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUGA	22	AsCpf1
B2M-c34	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUGAC	23	AsCpf1
B2M-c35	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUGACU	24	AsCpf1
B2M-c36	CAAUUCUCUCUCCAUUCU	18	AsCpf1
B2M-c37	CAAUUCUCUCUCCAUUCUU	19	AsCpf1
B2M-c38	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUC	20	AsCpf1
B2M-c39	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCA	21	AsCpf1
B2M-c40	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAG	22	AsCpf1
B2M-c41	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGU	23	AsCpf1
B2M-c42	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGUA	24	AsCpf1
B2M-c43	CAGUGGGGGUGAAUUCAG	18	AsCpf1
B2M-c44	CAGUGGGGGUGAAUUCAGU	19	AsCpf1
B2M-c45	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUG	20	AsCpf1
B2M-c46	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGU	21	AsCpf1
B2M-c47	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUA	22	AsCpf1
B2M-c48	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAG	23	AsCpf1
B2M-c49	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAGU	24	AsCpf1

B2M-c50	CAUUCUCUGCUGGAUGAC	18	AsCpf1
B2M-c51	CAUUCUCUGCUGGAUGACG	19	AsCpf1
B2M-c52	CAUUCUCUGCUGGAUGACGU	20	AsCpf1
B2M-c53	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUG	21	AsCpf1
B2M-c54	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUGA	22	AsCpf1
B2M-c55	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUGAG	23	AsCpf1
B2M-c56	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUGAGU	24	AsCpf1
B2M-c57	CCCGAAUUAUCCUCAGGUA	18	AsCpf1
B2M-c58	CCCGAAUUAUCCUCAGGUAC	19	AsCpf1
B2M-c59	CCCGAAUUAUCCUCAGGUACU	20	AsCpf1
B2M-c60	CCCGAAUUAUCCUCAGGUACUC	21	AsCpf1
B2M-c61	CCCGAAUUAUCCUCAGGUACUCC	22	AsCpf1
B2M-c62	CCCGAAUUAUCCUCAGGUACUCCA	23	AsCpf1
B2M-c63	CCCGAAUUAUCCUCAGGUACUCCAA	24	AsCpf1
B2M-c64	CCGAUAUUAUCCUCAGGUAC	18	AsCpf1
B2M-c65	CCGAUAUUAUCCUCAGGUACU	19	AsCpf1
B2M-c66	CCGAUAUUAUCCUCAGGUACUC	20	AsCpf1
B2M-c67	CCGAUAUUAUCCUCAGGUACUCC	21	AsCpf1
B2M-c68	CCGAUAUUAUCCUCAGGUACUCCA	22	AsCpf1
B2M-c69	CCGAUAUUAUCCUCAGGUACUCCAA	23	AsCpf1
B2M-c70	CCGAUAUUAUCCUCAGGUACUCCAAA	24	AsCpf1
B2M-c71	CUCACGUCAUCCAGCAGA	18	AsCpf1
B2M-c72	CUCACGUCAUCCAGCAGAG	19	AsCpf1
B2M-c73	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAGA	20	AsCpf1
B2M-c74	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAGAA	21	AsCpf1
B2M-c75	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAAU	22	AsCpf1
B2M-c76	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAAUG	23	AsCpf1
B2M-c77	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAAUGG	24	AsCpf1
B2M-c78	CUGAAUUGCUAUGUGUCU	18	AsCpf1
B2M-c79	CUGAAUUGCUAUGUGUCUG	19	AsCpf1
B2M-c80	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGG	20	AsCpf1
B2M-c81	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGG	21	AsCpf1
B2M-c82	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGGU	22	AsCpf1
B2M-c83	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGGUU	23	AsCpf1
B2M-c84	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGGUUU	24	AsCpf1
B2M-c85	GAGUACCUGAGGAAUAUC	18	AsCpf1
B2M-c86	GAGUACCUGAGGAAUAUCG	19	AsCpf1
B2M-c87	GAGUACCUGAGGAAUAUCGG	20	AsCpf1
B2M-c88	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGG	21	AsCpf1
B2M-c89	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGGA	22	AsCpf1
B2M-c90	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGGAA	23	AsCpf1
B2M-c91	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGGAAA	24	AsCpf1

B2M-c92	UAUCUCUUGUACUACACU	18	AsCpf1
B2M-c93	UAUCUCUUGUACUACACUG	19	AsCpf1
B2M-c94	UAUCUCUUGUACUACACUGA	20	AsCpf1
B2M-c95	UAUCUCUUGUACUACACUGAA	21	AsCpf1
B2M-c96	UAUCUCUUGUACUACACUGAAU	22	AsCpf1
B2M-c97	UAUCUCUUGUACUACACUGAAUU	23	AsCpf1
B2M-c98	UAUCUCUUGUACUACACUGAAUUC	24	AsCpf1
B2M-c99	UCAAUUCUCUCUCCAUUC	18	AsCpf1
B2M-c100	UCAAUUCUCUCUCCAUUCU	19	AsCpf1
B2M-c101	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUU	20	AsCpf1
B2M-c102	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUC	21	AsCpf1
B2M-c103	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUCA	22	AsCpf1
B2M-c104	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAG	23	AsCpf1
B2M-c105	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGU	24	AsCpf1
B2M-c106	UCACAGCCCAAGAUAGUU	18	AsCpf1
B2M-c107	UCACAGCCCAAGAUAGUUA	19	AsCpf1
B2M-c108	UCACAGCCCAAGAUAGUUA	20	AsCpf1
B2M-c109	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAG	21	AsCpf1
B2M-c110	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAGU	22	AsCpf1
B2M-c111	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAGUG	23	AsCpf1
B2M-c112	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAGUGG	24	AsCpf1
B2M-c113	UCAGUGGGGGUGAAUUCA	18	AsCpf1
B2M-c114	UCAGUGGGGGUGAAUUCAG	19	AsCpf1
B2M-c115	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGU	20	AsCpf1
B2M-c116	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUG	21	AsCpf1
B2M-c117	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUGU	22	AsCpf1
B2M-c118	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUA	23	AsCpf1
B2M-c119	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAG	24	AsCpf1
B2M-c120	UGGCCUGGAGGCUAUCCA	18	AsCpf1
B2M-c121	UGGCCUGGAGGCUAUCCAG	19	AsCpf1
B2M-c122	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGC	20	AsCpf1
B2M-c123	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCG	21	AsCpf1
B2M-c124	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCGU	22	AsCpf1
B2M-c125	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCGUG	23	AsCpf1
B2M-c126	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCGUGA	24	AsCpf1
B2M-c127	AUAGAUCGAGACAUGUAA	18	AsCpf1
B2M-c128	AUAGAUCGAGACAUGUAAG	19	AsCpf1
B2M-c129	AUAGAUCGAGACAUGUAAGC	20	AsCpf1
B2M-c130	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCA	21	AsCpf1
B2M-c131	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCAG	22	AsCpf1
B2M-c132	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCAGC	23	AsCpf1
B2M-c133	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCAGCA	24	AsCpf1

B2M-c134	CAUAGAUCGAGACAUGUA	18	AsCpf1
B2M-c135	CAUAGAUCGAGACAUGUAA	19	AsCpf1
B2M-c136	CAUAGAUCGAGACAUGUAAG	20	AsCpf1
B2M-c137	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGC	21	AsCpf1
B2M-c138	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGCA	22	AsCpf1
B2M-c139	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGCAG	23	AsCpf1
B2M-c140	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGCAGC	24	AsCpf1
B2M-c141	CUCCACUGUCUUUUUCAU	18	AsCpf1
B2M-c142	CUCCACUGUCUUUUUCAUA	19	AsCpf1
B2M-c143	CUCCACUGUCUUUUUCAUAG	20	AsCpf1
B2M-c144	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	21	AsCpf1
B2M-c145	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	22	AsCpf1
B2M-c146	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGAUC	23	AsCpf1
B2M-c147	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGAUCG	24	AsCpf1
B2M-c148	UCAUAGAUCGAGACAUGU	18	AsCpf1
B2M-c149	UCAUAGAUCGAGACAUGUA	19	AsCpf1
B2M-c150	UCAUAGAUCGAGACAUGUAA	20	AsCpf1
B2M-c151	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAG	21	AsCpf1
B2M-c152	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAGC	22	AsCpf1
B2M-c153	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAGCA	23	AsCpf1
B2M-c154	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAGCAG	24	AsCpf1
B2M-c155	UCCACUGUCUUUUUCAUA	18	AsCpf1
B2M-c156	UCCACUGUCUUUUUCAUAG	19	AsCpf1
B2M-c157	UCCACUGUCUUUUUCAUAGA	20	AsCpf1
B2M-c158	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	21	AsCpf1
B2M-c159	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAUC	22	AsCpf1
B2M-c160	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAUCG	23	AsCpf1
B2M-c161	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAUCGA	24	AsCpf1
B2M-c162	UCUCCACUGUCUUUUUCA	18	AsCpf1
B2M-c163	UCUCCACUGUCUUUUUCAU	19	AsCpf1
B2M-c164	UCUCCACUGUCUUUUUCAUA	20	AsCpf1
B2M-c165	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	21	AsCpf1
B2M-c166	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	22	AsCpf1
B2M-c167	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	23	AsCpf1
B2M-c168	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAGAUC	24	AsCpf1
B2M-c169	UUCUCCACUGUCUUUUUC	18	AsCpf1
B2M-c170	UUCUCCACUGUCUUUUUCA	19	AsCpf1
B2M-c171	UUCUCCACUGUCUUUUUCAU	20	AsCpf1
B2M-c172	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUA	21	AsCpf1
B2M-c173	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	22	AsCpf1
B2M-c174	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	23	AsCpf1
B2M-c175	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	24	AsCpf1

B2M-c176	UUUCUCCACUGUCUUUUU	18	AsCpf1
B2M-c177	UUUCUCCACUGUCUUUUU	19	AsCpf1
B2M-c178	UUUCUCCACUGUCUUUUUCA	20	AsCpf1
B2M-c179	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAU	21	AsCpf1
B2M-c180	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUA	22	AsCpf1
B2M-c181	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	23	AsCpf1
B2M-c182	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	24	AsCpf1
B2M-c183	UUUCUCCACUGUCUUUU	18	AsCpf1
B2M-c184	UUUCUCCACUGUCUUUU	19	AsCpf1
B2M-c185	UUUCUCCACUGUCUUUUUC	20	AsCpf1
B2M-c186	UUUCUCCACUGUCUUUUUCA	21	AsCpf1
B2M-c187	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAU	22	AsCpf1
B2M-c188	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUA	23	AsCpf1
B2M-c189	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	24	AsCpf1

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения в настоящем изобретении представляет собой gRNA, которая нацеливается на NKG2A (gRNA NKG2A). В некоторых вариантах осуществления gRNA, которая нацеливается на NKG2A, представляет собой одну или несколько из gRNA, описанных в табл. 9.

Таблица 9

## gRNA NKG2A

Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (ДНК)	Длина	Фермент
NKG2A55	GAGGTAAGCGTTTGCATTG	21	AsCpf1
NKG2A56	CCTCTAAAGCTTATGCTTACA	21	AsCpf1
NKG2A57	AGTCGATTTACTTGTAGCACT	21	AsCpf1
NKG2A58	CTTGTAGCACTGCACAGTTAA	21	AsCpf1
NKG2A59	TCCATTACAGGATAAAAGACT	21	AsCpf1
NKG2A60	CTCCATTACAGGATAAAAGAC	21	AsCpf1
NKG2A61	TCTCCATTACAGGATAAAAGA	21	AsCpf1
NKG2A62	ATCCTGTAATGGAGAAAATC	21	AsCpf1
NKG2A63	TCCTGTAATGGAGAAAATCC	21	AsCpf1
NKG2A136	AAACATGAGTAAGTTGTTTG	21	AsCpf1
NKG2A137	GCTTTCAAACATGAGTAAGTT	21	AsCpf1
NKG2A138	AAAGCCAAACCATTTCATTGTC	21	AsCpf1
NKG2A139	GTAACAGCAGTCATCATCCAT	21	AsCpf1
NKG2A140	ACCATCCTCATGGATTGGTGT	21	AsCpf1
NKG2A141	TGTCCATCATTTACCATCCT	21	AsCpf1
NKG2A142	GAAATTTCTGTCCATCATTT	21	AsCpf1
NKG2A143	AGAAATTTCTGTCCATCATTT	21	AsCpf1
NKG2A144	TTTtagAAATTTCTGTCCATC	21	AsCpf1

NKG2A145	CTTTTAGAAATTTCTGTCCAT	21	AsCpf1
NKG2A146	TTTCTTTTAGAAATTTCTGT	21	AsCpf1
NKG2A147	TAAAAGAAAAGAAAGAATTTT	21	AsCpf1
NKG2A270	AAACATTTACATCTTACCATT	21	AsCpf1
NKG2A271	CATCTTACCATTTCTTCTCA	21	AsCpf1
NKG2A272	TATAGATAATGAAGAAGAAAT	21	AsCpf1
NKG2A273	TTCTTCATTATCTATAGAAAG	21	AsCpf1
NKG2A274	CTGGCCTGTA CT CGAAGAAC	21	AsCpf1
NKG2A275	CTTACCAATGTAGTAACAAC	21	AsCpf1
NKG2A276	GCACGTCATTGTGGCCATTGT	21	AsCpf1
NKG2A277	TTTAGCACGTCATTGTGGCCA	21	AsCpf1
NKG2A414	CCATCAGCTCCAGAGAAGCTC	21	AsCpf1
NKG2A415	TCTCCCTGCAGATTACCATC	21	AsCpf1
NKG2A437	AAATGCTTTACCTTGCAGTG	21	AsCpf1
NKG2A438	AATGCTTTACCTTGCAGTGA	21	AsCpf1
NKG2A439	CCTTTCAGTGATAGGTTTTG	21	AsCpf1
NKG2A440	CAGTGATAGGTTTTGTCATTC	21	AsCpf1
NKG2A441	AAGGGAATGACAAAACCTATC	21	AsCpf1
NKG2A442	CAAGGGAATGACAAAACCTAT	21	AsCpf1
NKG2A443	GTCATTCCTTGAAAATCCTG	21	AsCpf1
NKG2A444	TCATTCCTTGAAAATCCTGA	21	AsCpf1
NKG2A445	TGAAGGTTAATCCGCATAG	21	AsCpf1
NKG2A446	GAAGGTTAATCCGCATAGG	21	AsCpf1
NKG2A447	AAGGTTAATCCGCATAGGT	21	AsCpf1
NKG2A448	ATCCGCATAGGTTATTTCTT	21	AsCpf1
NKG2A449	GCAACTGAACAGGAAATAACC	21	AsCpf1
NKG2A450	AGCAACTGAACAGGAAATAAC	21	AsCpf1
NKG2A451	CTGTTTCAGTTGCTAAAATGGA	21	AsCpf1
NKG2A452	TATTGCCTTTAGGTTTTCGTT	21	AsCpf1
NKG2A453	ATTGCCTTTAGGTTTTCGTTG	21	AsCpf1
NKG2A454	TTGCCTTTAGGTTTTCGTTGC	21	AsCpf1
NKG2A455	GGTTTTCGTTGCTGCCTCTT	21	AsCpf1
NKG2A456	CGTTGCTGCCTCTTTGGGTTT	21	AsCpf1
NKG2A457	GTTGCTGCCTCTTTGGGTTTG	21	AsCpf1
NKG2A458	GGTTTGGGGGCAGATTCAGGT	21	AsCpf1
NKG2A459	GGGGCAGATTCAGGTCTGAGT	21	AsCpf1

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения в настоящем изобретении представляет собой gRNA, которая нацеливается на PD1. В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения в настоящем изобретении представляет собой gRNA, которая нацеливается на PD1. gRNA, которые нацеливаются на B2M и PD1, для применения в настоящем изобретении дополнительно описаны в WO 2015161276 и WO 2017152015 Welstead et al. ("Welstead"); обе из которых включены в данный документ посредством ссылки.

#### РНК-направляемые нуклеазы

РНК-направляемые нуклеазы по настоящему изобретению включают без ограничения нуклеазы CRISPR класса 2, которые встречаются в природе, такие как Cas9 и Cpf1, а также другие нуклеазы, производные или полученные из них. С функциональной точки зрения РНК-направляемые нуклеазы определяются как нуклеазы, которые (а) взаимодействуют с (например, образуют комплекс с) gRNA; и (b) вместе с gRNA связываются с и необязательно расщепляют или модифицируют область-мишень ДНК, которая включает (i) последовательность, комплементарную нацеливаемой домене gRNA и необязательно (ii) дополнительную последовательность, называемую "мотивом, примыкающим к протоспейсеру" или "PAM", который более подробно описан ниже. Как будет проиллюстрировано в следующих примерах, РНК-направляемые нуклеазы могут быть определены в общих чертах по их специфичности в отношении PAM и активности расщепления, даже несмотря на то, что могут существовать различия между отдельными РНК-направляемыми нуклеазами, которые обладают одинаковой специфичностью в отношении PAM или активностью расщепления. Специалисты в данной области техники поймут, что некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к системам, способам и композициям, которые могут быть реализованы с использованием любой подходящей РНК-направляемой нуклеазы, характеризующейся опре-

деленной специфичностью в отношении PAM и/или активностью расщепления. По этой причине, если не указано иное, термин РНК-направляемая нуклеаза следует понимать как общий термин, не ограничивающийся каким-либо конкретным типом (например, Cas9 против Cpf1), видом (например, *S. pyogenes* против *S. aureus*) или вариацией (например, полноразмерная против усеченной или расщепленной; встречающаяся в природе специфичность в отношении PAM против сконструированной специфичности в отношении PAM и т.д.) РНК-направляемой нуклеазы.

Последовательность PAM получила свое название от ее последовательного взаимоотношения с последовательностью "протоспейсера", которая комплементарна нацеливающим доменам gRNA (или "спейсерам"). Вместе с последовательностями протоспейсеров последовательности PAM определяют области-мишени или последовательности-мишени для конкретных комбинаций РНК-направляемых нуклеаз/gRNA.

Различные РНК-направляемые нуклеазы, могут требовать различных последовательных взаимоотношений между PAM и протоспейсерами. Например, нуклеазы Cas9 распознают последовательности PAM, расположенные в направлении 3' от протоспейсера, в то время как Cpf1, с другой стороны, обычно распознает последовательности PAM, которые находятся в направлении 5' от протоспейсера.

Помимо распознавания конкретных последовательных ориентации PAM и протоспейсеров РНК-направляемые нуклеазы могут также распознавать определенные последовательности PAM. Cas9 *S. aureus*, например, распознает последовательность PAM NNGRRT или NNGRRV, где остатки N находятся непосредственно с 3'-стороны области, распознаваемой нацеливающим доменом gRNA. Cas9 *S. pyogenes* распознает последовательности PAM NGG. И Cpf1 *F. Novicida* распознает последовательность PAM TTN. Последовательности PAM были идентифицированы для множества РНК-направляемых нуклеаз, и стратегия идентификации новых последовательностей PAM была описана Shmakov et al., 2015, *Molecular Cell* 60, 385-397, November 5, 2015. Следует также отметить, что сконструированные РНК-направляемые нуклеазы могут характеризоваться специфичностью в отношении PAM, которая отличается от специфичности в отношении PAM эталонных молекул (например, в случае сконструированной РНК-направляемой нуклеазы, эталонная молекула может представлять собой встречающийся в природе вариант, из которого происходит РНК-направляемая нуклеаза, или встречающийся в природе вариант, характеризующийся наибольшей гомологией аминокислотной последовательности со сконструированной РНК-направляемой нуклеазой).

В дополнение к своей специфичности в отношении PAM, РНК-направляемые нуклеазы можно охарактеризовать их активностью расщепления ДНК: встречающиеся в природе РНК-направляемые нуклеазы обычно формируют DSB в нуклеиновых кислотах-мишенях, но были получены сконструированные варианты, которые образуют только SSB (обсуждалось выше) Ran & Hsu, et al., *Cell* 154(6), 1380-1389, September 12, 2013 (Ran), включенная в данный документ посредством ссылки), или которые вообще не разрезают ДНК.

#### Cas9

Кристаллические структуры были определены для Cas9 *S. pyogenes* (Jinek 2014) и для Cas9 *S. aureus* в комплексе с одномолекулярной направляющей РНК и ДНК-мишенью (Nishimasu 2014; Anders 2014 и Nishimasu 2015).

Встречающийся в природе белок Cas9 содержит две доли: долю распознавания (REC) и нуклеазную долю (NUC); каждая из которых содержит определенные структурные и/или функциональные домены. Доля REC содержит домен богатой аргинином мостовой спирали (BH) и по меньшей мере один домен REC (например, домен REC1 и необязательно домен REC2). Доля REC не имеет структурного сходства с другими известными белками, что указывает на то, что это уникальный функциональный домен. Не желая быть связанными какой-либо теорией, мутационный анализ предполагает определенные функциональные роли доменов BH и REC: домен BH, по-видимому, играет роль в распознавании gRNA ДНК в то время как домен REC, как полагают, взаимодействует с дуплексом типа "повтор:анти-повтор" в gRNA и опосредует образование комплекса Cas9/gRNA.

Доля NUC содержит домен RuvC, домен HNH и взаимодействующий с PAM (PI) домен. Домен RuvC обладает структурным сходством с членами суперсемейства интегразы ретровирусов и расщепляет некомплементарную (т.е. нижнюю) цепь нуклеиновой кислоты-мишени. Он может быть образован из двух или более расщепленных мотивов RuvC (таких как RuvC I, RuvCII и RuvCIII в *S. pyogenes* и *S. aureus*). Между тем домен HNH структурно подобен эндонуклеазным мотивам HNH и расщепляет комплементарную (т.е. верхнюю) цепь нуклеиновой кислоты-мишени. Домен PI, как следует из названия, вносит свой вклад в специфичность в отношении PAM.

Хотя определенные функции Cas9 связаны с (но не обязательно полностью определяются) конкретными доменами, изложенными выше, эти и другие функции могут быть опосредованы или быть подвергнуты влиянию других доменов Cas9 или множества доменов в любой доле. Например, в Cas9 *S. pyogenes*, как описано в Nishimasu 2014, дуплекс типа "повтор:анти-повтор" gRNA попадет в борозду между долями REC и NUC, и нуклеотиды в дуплексе взаимодействуют с аминокислотами в доменах BH, PI, и REC. Некоторые нуклеотиды в первой структуре типа "стебель-петля" также взаимодействуют с аминокислотами во множестве доменов (PI, BH и REC1), как и некоторые нуклеотиды во второй и третьей



структурах типа "стебель-петля" (домены RuvC и PI).

#### Cpf1

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

Хотя Cas9 и Cpf1 имеют сходство по структуре и функциям, следует понимать, что определенные виды активности Cpf1 опосредуются структурными доменами, которые не являются аналогичными каким-либо доменам Cas9. Например, расщепление комплементарной цепи ДНК-мишени, по-видимому, опосредуется доменом Nuc, который последовательно и пространственно отличается от домена HNH Cas9. Кроме того, ненацеливающая часть gRNA Cpf1 (ручка) принимает структуру типа "псевдоузел", а не структуру типа "стебель-петля", образованную дуплексом типа "повтор:анти-повтор" в gRNA Cas9.

#### Модификации РНК-направляемых нуклеаз

РНК-направляемые нуклеазы, описанные выше, обладают видами активности и свойствами, которые могут быть полезными в различных применениях, но специалист в данной области техники поймет, что РНК-направляемые нуклеазы также могут быть модифицированы в определенных случаях для изменения активности расщепления, специфичности в отношении PAM или других структурных или функциональных особенностей.

Обращаясь сначала к модификациям, которые изменяют активность расщепления, выше были описаны мутации, которые снижают или устраняют активность доменов в доле NUC. Иллюстративные мутации, которые могут быть осуществлены в доменах RuvC, в домене HNH Cas9 или в домене Nuc Cpf1 описаны в Rap и Yamano, а также в Cotta-Ramusino. В целом, мутации, которые снижают или устраняют активность в одном из двух нуклеазных доменах, приводят к образованию РНК-направляемых нуклеаз с нулевой активностью, но следует отметить, что тип нулевой активности варьирует в зависимости от того, какой домен инактивирован. В качестве одного примера, инактивация домена RuvC или домена HNH Cas9 приводит к образованию никазы.

Модификации специфичности в отношении PAM относительно встречающихся в природе эталонных молекул Cas9 были описаны Kleinstiver et al. и для *S. pyogenes* (Kleinstiver et al., Nature. 2015 Jul 23;523(7561):481-5 (Kleinstiver I), и для *S. aureus* (Kleinstiver et al., Nat Biotechnol. 2015 Dec; 33(12): 1293-1298 (Kleinstiver II)). Kleinstiver et al. также описали модификации, которые улучшают точность нацеливания Cas9 (Nature, 2016 January 28; 529, 490-495 (Kleinstiver III)). Каждая из этих ссылок включена в данный документ посредством ссылки. РНК-направляемые нуклеазы были расщеплены на две или более частей, как описано в Zetsche et al. (Nat Biotechnol. 2015 Feb;33(2): 139-42 (Zetsche II), включенной посредством ссылки) и Fine et al. (Sci Rep. 2015 Jul 1;5:10777 (Fine), включенной посредством ссылки).

РНК-направляемые нуклеазы могут быть, в определенных вариантах осуществления, оптимизированными по размеру или усеченными, например, посредством одной или нескольких делеций, которые уменьшают размер нуклеазы, при этом сохраняя активность связывания с gRNA, активность нацеливания, активность распознавания PAM и активность расщепления. В определенных вариантах осуществления РНК-направляемые нуклеазы связаны ковалентно или нековалентно с другим полипептидом, нуклеотидом или другой структурой, необязательно посредством линкера. Иллюстративные связанные нуклеазы и линкеры описаны в Guilinger et al., Nature Biotechnology 32, 577-582 (2014), которая включена в данный документ посредством ссылки для всех целей.

РНК-направляемые нуклеазы также необязательно включают метку, такую как без ограничения сигнал ядерной локализации для облегчения перемещения РНК-направляемого нуклеазного белка в ядро. В определенных вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза может включать С- и/или N-концевые сигналы ядерной локализации. Последовательности ядерной локализации известны в данной области техники и описаны у Maeder и в другой литературе.

Вышеупомянутый список модификаций предназначен для того, чтобы быть иллюстративным по своей природе, и специалист в данной области техники поймет, с учетом настоящего изобретения, что другие модификации могут быть возможны или необходимы в определенных применениях. Поэтому для краткости иллюстративные системы, способы и композиции по настоящему изобретению представлены со ссылкой на конкретные РНК-направляемые нуклеазы, но следует понимать, что используемые РНК-направляемые нуклеазы могут быть модифицированы таким образом, что их принципы деятельности не изменяются. Такие модификации охватываются объемом настоящего изобретения.

Иллюстративные подходящие варианты нуклеаз включают без ограничения варианты AsCpf1, содержащие замену M537R, замену H800A и/или замену F870L, или любую их комбинацию (схема нумерации в соответствии с последовательностью AsCpf1 дикого типа). Другие подходящие модификации

аминокислотной последовательности AsCpf1 известны специалистам в данной области. Некоторые иллюстративные последовательности AsCpf1 дикого типа и вариантов AsCpf1 представлены ниже.

Аминокислотная последовательность His-AsCpf1-sNLS-sNLS H800A (SEQ ID

NO:[XX])

MGHNNHHHGSTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQQFIEEDKAR  
 NDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLDWNLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNA  
 IHDFYIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTT  
 YFSGFYENRKNVFS AEDISTAI PHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKA  
 GIVFVSTSIIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKND  
 ETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCYKTLRLNENVLETA  
 EALF NELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKV  
 QRS LKH EDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAAALDQPLPTTLKKQEEKE  
 ILSQLD SLLGL YHLLDWFVAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYAT  
 KKPYSVEKFKLNFQMP T LASGWDVNKEKNGAILFVKNGLYYLGIMPQKGRYKALS  
 FEPTEKTSEGFDKMYDYFPDA AKMIPKSTQLKAVTAHFQTHHTPILLSNFI  
 EPLEITKEIYDLNPEKEPKKFQTAYAKT GDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTS  
 IDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQR IAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNK  
 DFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKT SIKLNGQAE L FYRPKSRMKRMAARL  
 GEKMLNKKLKDQKTPIDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNV ITKEVSHEI  
 IKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGE  
 RNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKLDNREKERVAAARQAWSVVGTIKDLK  
 QGYLS QVIHEIVDLMIHYQAVVLENLNFQKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCL  
 VLKDYPAEK VGGVLNYPQLTDQFTSFAKMGTSQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDP  
 FVWKT IKNHESRKH F LEGFDLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFPAWDI  
 VFEKNETQF DAKGTPFIAGKR IVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGI  
 VFRDGSNILPKLLENDSDHAIDTMVALIRS VLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLN  
 GVCFDSRFQNP EWPM DADANGAYHIALKGQLLLNHLKE SKDLKLQNGISNQD  
 WLAYIQELRNGSPKKRKRKVGSPKKRKRK

Аминокислотная последовательность варианта 1 Cpf1 (SEQ ID NO:[XX])

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQQFIEEDKARNDHYKELKPIIDRI  
 YKTYADQCLQLVQLDWNLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDFYIGRTDNLTD  
 AINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFS  
 AEDISTAI PHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIVFVSTSI  
 IEEVFS

PFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHI IASLPHRFIPL  
 FKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQS FCKYKTLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFIS  
 HKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGK  
 ELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQDLSLLGLYHLLDWFVAVDESNE  
 VDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKNLNFQRPTLASGWDVNKEKNG  
 AILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTSEGFDMYYDYFPDAAKMI PKCSTQLKAV  
 TAHFQTHHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNPEKEPKKFQATAYAKKTGDQKGYREALCKWI  
 DFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGK  
 LYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAEFYRPKSRMKRMAHR  
 LGKMLNKKLKDQKTPIDPTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI IKDRR  
 FTSDKFLFHVPI TLNYQAANS PSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGK  
 ILEQSLNTIQQFDYQKCLDNREKERVAAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQ  
 AVVVLENLNFVGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLPYQLTDQF  
 TSFAKMGTSQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFDVDFVWTKIKNHESRKHFLGEGDFLHYDVKTG  
 DFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAQGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRY  
 RDLYPANELIALLEEKIVFRDGSNILPKLLENDSDHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGED  
 YINSPVRDLNGVCFDSRFQNPPEWPMADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQD  
 WLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG  
 HHHH

**Аминокислотная последовательность варианта 2 Cpf1 (SEQ ID NO:[XX])**

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELI PQGKTLKHIQEQQFIEEDKARNNDHYKELKP  
 IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWNLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRT  
 DNLTDAINKRHAIEYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR  
 KNVFSAEDISTAI PHRIVQDNFPKFENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSE  
 EVFSPFYFNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHI IASLPH  
 RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQS FCKYKTLRNENVLETAEALFNELNSIDL  
 THIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEI  
 SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQDLSLLGLYHLLDWFVAV  
 DESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKNLNFQMPPTLASGWDVNK  
 EKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTSEGFDMYYDYFPDAAKMI PKCST  
 QLKAVTAHFQTHHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNPEKEPKKFQATAYAKKTGDQKGYREA  
 LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA  
 VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAEFYRPKSRMK  
 RMAHRLGKMLNKKLKDQKTPIDPTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI  
 IKDRRFTSDKFFFHVPI TLNYQAANS PSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI  
 DSTGKILEQSLNTIQQFDYQKCLDNREKERVAAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL  
 MIHYQAVVVLENLNFVGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLPYQ  
 LTDQFTSFAKMGTSQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFDVDFVWTKIKNHESRKHFLGEGDFLHY  
 DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAQGTPFIAGKRIVPVIENHR  
 FTGRYRDLYPANELIALLEEKIVFRDGSNILPKLLENDSDHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA  
 ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPPEWPMADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNG  
 ISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG  
 SLEHHHHHHH

**Аминокислотная последовательность варианта 3 Cpf1 (SEQ ID NO:1096)**

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELI PQGKTLKHIQEQQFIEEDKARNNDHYKELKP  
 IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWNLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRT  
 DNLTDAINKRHAIEYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR

KNVFS AEDI STAIPHRIVQDNFPKFKENCHI FTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVST SIE  
 EVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHI IASLPH  
 RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQS FCKYKTL LRNENVLETAEALFNELNSIDL T  
 HIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEI I  
 SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLD SLLGLYHLLDWFVAV  
 DESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKNLNFQRPTLASGWDV NK  
 EKNNGAILFVKNGLYL LGIMPQKGRYKALSFEPT EKTSEGFDKMYDYFPDAAKMI PKCST  
 QLKAVTAHFQTHHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREA  
 LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA  
 VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAE LFYRPKSRMK  
 RMAARLGEKMLNKKLDQKTPIPD TLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI  
 IKDRRFTSDKFLFHVPITLNYQAANS PSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI  
 DSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAA RQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL  
 MIHYQAVVVLENLNF GFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLPNYQ  
 LTDQFTSFAKMGTSQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTG FVDFVWWTIKNHESRKHFLGFDLHY  
 DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQF DAKGTPFIAGKRIVPVIENHR  
 FTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLEND DSHAITMVALIRSVLQMRNSNA  
 ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNG  
 ISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPK KKRKVGGSGSGSGSGSGSGSGSGSG  
 SLEHHHHHH

**Аминокислотная последовательность варианта 4 CpfI (SEQ ID NO:1097)**

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIQGKTLKHIQE QGFIEEDKARN DHYKELKP  
 IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIH DYFIGRT  
 DNLTDAINKRHAETIKGIFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR  
 KNVFS AEDI STAIPHRIVQDNFPKFKENCHI FTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVST SIE  
 EVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHI IASLPH  
 RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQS FCKYKTL LRNENVLETAEALFNELNSIDL T  
 HIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEI I  
 SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLD SLLGLYHLLDWFVAV  
 DESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKNLNFQRPTLASGWDV NK  
 EKNNGAILFVKNGLYL LGIMPQKGRYKALSFEPT EKTSEGFDKMYDYFPDAAKMI PKCST  
 QLKAVTAHFQTHHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREA  
 LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA  
 VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAE LFYRPKSRMK  
 RMAARLGEKMLNKKLDQKTPIPD TLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI  
 IKDRRFTSDKFLFHVPITLNYQAANS PSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI  
 DSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAA RQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL  
 MIHYQAVVVLENLNF GFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLPNYQ  
 LTDQFTSFAKMGTSQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTG FVDFVWWTIKNHESRKHFLGFDLHY  
 DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQF DAKGTPFIAGKRIVPVIENHR  
 FTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLEND DSHAITMVALIRSVLQMRNSNA  
 ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNG  
 ISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPK KKRKV

**Аминокислотная последовательность варианта 5 CpfI (SEQ ID NO:1107)**

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIQGKTLKHIQE QGFIEEDKARN DHYKELKP  
 IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIH DYFIGRT  
 DNLTDAINKRHAETIKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR

KNVFS AEDISTAI PHRIVQDNFPKFENCHI FTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSI E  
 EVFSPFPYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHI IASLPH  
 RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCYKTLRLNENVLETAELFNELNSIDL  
 HIFISHKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEI I  
 SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQDLSLLGLYHLLDWFV  
 DESNEVDPEFSARLTGKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDV  
 EKNNGAILFVNGLLYLGI MPKQKGRYKALSFEPTTEKTSEGFDMYYDYFPDAAKMI PKCST  
 QLKAVTAHFQTHHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNPEKEPKKFQATAYAKKTGDQKGYR  
 EALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYAE LNPLLYHISFQRIAEKEIMDA  
 VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKT SIKLNGQAE LFYRPKSRM  
 KMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIDPTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEV  
 SHEIKDRRFTSDKFLFHVPI TLNYQAANS PSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLI  
 YITVIDSTGKILEQRSNLTIQQFDYQKKLDNREKERVAAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQ  
 VIHEIVDLMIHYQAVVLENLNFQFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEK  
 VGGVLPYQLTDQFTSFAKMGTSQGF LFYVPAPYTSKIDPLTG FVDPFVWKT IKNHESR  
 KHFLGFDLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGT  
 PFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNLPKLEND  
 DSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNP  
 EPWMDADANGAYHIALKGQLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAIQELRNGR  
 SSDEATADSQHAAPPKPKKRV

**Аминокислотная последовательность варианта 6 CpfI (SEQ ID NO:1108)**

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQE QGFIEEDKARN DHYKELKPI  
 IIDRIYKTYADQCLQLVQLD WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIH  
 DYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRS  
 FDKFTTYFSGFYENRKNVFS AEDISTAI PHRIVQDNFPKFENCHI FTRLITAVPSL  
 REHFENVKKAIGIFVSTSI E EVFSPFPYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTE  
 KIKGLNEVLNLAIQKNDETAHI IASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKS  
 DEEVIQSFCYKTLRLNENVLETAELFNELNSIDLHIFISHKLETISSALCDHWD  
 TLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEI I SAAGKELSEAFKQ  
 KTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQDLSLLGLYHLLDWFVDESNEV  
 DPEFSARLTGKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDV  
 NKEKNNGAILFVNGLLYLGI MPKQKGRYKALSFEPTTEKTSEGFDMYYDYFPD  
 AAKMI PKCSTQLKAVTAHFQTHHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNPEKEPKKF  
 QATAYAKKTGDQKGYREALECKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDL  
 GEYAE LNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHT  
 LYWTGLFSPENLAKT SIKLNGQAE LFYRPKSRMKMAHRLGEKMLNKKLKDQKTP  
 IDPTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEV SHEIKDRRFTSDKFLFHV  
 P I TLNYQAANS PSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKI  
 LEQRSNLTIQQFDYQKKLDNREKERVAAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEI  
 VDLMIHYQAVVLENLNFQFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEK  
 VGGVLPYQLTDQFTSFAKMGTSQGF LFYVPAPYTSKIDPLTG FVDPFVWKT IKN  
 HESRKHFLGFDLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQ  
 FDAKGT PFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNLP  
 KLEND DSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNP  
 EPWMDADANGAYHIALKGQLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAIQELRNGR  
 SSDEATADSQHAAPPKPKKRVGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS  
 SLEHHHHHH

**Аминокислотная последовательность варианта 7 CpfI (SEQ ID NO:[XX])**

MGRDPGKPIPNPLGLDSTAPKPKKRVGIHGVPAATQFEGFTNLYQVSKTLR  
 FELIPQGKTLKHIQE QGFIEEDKARN DHYKELKPI IIDRIYKTYADQCLQLVQLD  
 WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIH DYFIGRTDNLTDAINKRHAEI  
 YKGLFKAELFNGK

LKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVSAEDISTAI PHRIVQDNFPKFKEN  
 CHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGIS  
 REAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHI IASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEE  
 VIQSFCYKTLNENVLETAEALFNELN SIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALY  
 ERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQ  
 PLPTTLKKQEEKEILKSQDLSLLGLYHLLDWFVAVDESNEVDPEFSARLTGKLEMEPSLSFY  
 NKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPPTLASGWDVNKEKNGAILFVKNGLYLGLIMPQKQGRYK  
 ALSFEPTSEKTFEGDKMYDYFPDAAKMI PKCSTQLKAVTAHFQHTHTPILLSNNFIEPLEI  
 TKEIYDLNNPEKEPKKFQTAAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRP  
 SSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHT  
 LYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAEFYRPKSRMMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIDPTLYQ  
 ELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI IKDRRFTSDKFFHVPITLNYQAANS  
 PSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRS LNTIQQFDYQKLDNRE  
 KVERAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVLENLNFQKSKRTGIAEKA  
 VYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLPYQLTDQFTSFAKMGTSQGF LFYVPAPYTSK  
 IDPLTGFVDPFVWKT IKNHESRKHFLFEGFDLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMP  
 AWDIVFEKNETQFDAQGTPFIAGKRIVPVIEENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDG  
 SNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNP  
 EWPMDADANGAYHIALKGQLLLNLHLSKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNPKKKRQVLAAL  
 EHHHHH

Иллюстративная аминокислотная последовательность AsCpf1 дикого типа (SEQ  
 ID NO: [[XX]]):

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQQFIEEDKARNNDHYKELKP  
 IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDFYFIGRT  
 DNLTDAINKRHAIEYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR  
 KNVSAEDISTAI PHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSI  
 IEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHI IASLPH  
 RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCYKTLNENVLETAEALFNELN SIDLT  
 HIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEI  
 ISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQDLSLLGLYHLLDWFV  
 AVDESNEVDPEFSARLTGKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPPTLASGWDVN  
 KEKNGAILFVKNGLYLGLIMPQKQGRYKALSFEPTSEKTFEGDKMYDYFPDAAKMI PKCST  
 QLKAVTAHFQHTHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAAYAKKTGDQKGYREA  
 LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA  
 VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAEFYRPKSRM  
 MAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIDPTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI  
 IKDRRFTSDKFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI  
 DSTGKILEQRS LNTIQQFDYQKLDNREKVERAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL  
 MIHYQAVVLENLNFQKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLPYQ  
 LTDQFTSFAKMGTSQGF LFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKT IKNHESRKHFLFEGFDLHY  
 DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAQGTPFIAGKRIVPVIEENHR  
 FTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA  
 ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNP EWPMDADANGAYHIALKGQLLLNLHLSKDLKLQNG  
 ISNQDWLAYIQELRN

Нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК-направляемые нуклеазы В данном документе предусмотре-  
 ны нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК-направляемые нуклеазы, например, Cas9, Cpf1, или их  
 функциональные фрагменты. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК-направляемые  
 нуклеазы, были описаны ранее (см., например, Cong 2013; Wang 2013; Mali 2013; Jinek 2012). В некото-  
 рых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемую нуклеазу, может представлять собой  
 синтетическую последовательность нуклеиновой кислоты. Например, синтетическая молекула нуклеи-  
 ной кислоты может быть химически модифицирована. В определенных вариантах осуществления  
 mRNA, кодирующая РНК-направляемую нуклеазу, будет иметь одно или несколько (например, все) из  
 следующих свойств: она может быть экпирована; полиаденилирована и замещена 5-метилцитидином  
 и/или псевдоуридином.

Синтетические последовательности нуклеиновых кислот также могут быть оптимизированы по ко-  
 донам, например, по меньшей мере один редко встречающийся кодон или менее часто встречающийся  
 кодон может быть заменен на часто встречающийся кодон. Например, синтетическая нуклеиновая кисло-  
 та может направлять синтез оптимизированной матричной мРНК, например, оптимизированной для экс-  
 прессии в системе экспрессии млекопитающих, например, описанной в данном документе. Примеры ко-  
 доно-оптимизированных последовательностей, кодирующих Cas9, представлены в Cotta-Ramusino.

В дополнение или альтернативным образом, нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемую  
 нуклеазу, может содержать последовательность ядерной локализации (NLS). Последовательности ядер-

ной локализации известны в данной области техники.

#### Функциональный анализ молекул-кандидатов

РНК-направляемые нуклеазы-кандидаты, gRNA-кандидаты и их комплексы могут быть оценены посредством стандартных способов, известных в данной области техники. См., например, Cotta-Ramusino. Стабильность комплексов RNP может быть оценена с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, как описано ниже.

#### Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF)

Термостабильность рибонуклеопротеиновых (RNP) комплексов, содержащих gRNA и РНК-направляемые нуклеазы, может быть измерена с помощью DSF. Методика DSF измеряет термостабильность белка, которая может увеличиваться при благоприятных условиях, таких как добавление связывающей молекулы РНК, например, gRNA.

Анализ DSF может проводиться в соответствии с любым подходящим протоколом и может использоваться в любых подходящих условиях, включая без ограничения (а) тестирование различных условий (например, различных стехиометрических соотношений gRNA: РНК-направляемый белок нуклеазы, различных буферных растворов и т.д.) для определения оптимальных условий для образования RNP; и (b) тестирование модификаций (например, химических модификаций, изменений последовательности и т.д.) РНК-направляемой нуклеазы и/или gRNA для выявления тех модификаций, которые улучшают образование или стабильность RNP. Одним из показателей анализа DSF является сдвиг температуры плавления комплекса RNP; относительно большой сдвиг позволяет предположить, что комплекс RNP более стабилен (и, таким образом, может иметь большую активность или более благоприятную кинетику образования, кинетику разложения или другую функциональную характеристику) по сравнению с эталонным комплексом RNP, характеризующимся меньшим сдвигом. Когда анализ DSF используют в качестве инструмента скрининга, может быть указан пороговый сдвиг температуры плавления, так что на выходе один или несколько RNP характеризуются сдвигом температуры плавления на уровне или выше порогового значения. Например, порог может составлять 5-10°C (например, 5°, 6°, 7°, 8°, 9°, 10°) или более, и на выходе один или несколько RNP могут быть охарактеризованы сдвигом температуры плавления, большим или равным пороговому значению.

Ниже приведены два неограничивающих примера условий анализа DSF. Чтобы определить лучший раствор для образования комплексов RNP, фиксированную концентрацию (например, 2 мкМ) Cas9 в воде + 10x SYPRO Orange® (Life Technologies, № по кат. S-6650) вносят в 384-луночный планшет. Затем добавляют эквимоллярное количество gRNA, разбавленное в растворах с различными pH и солями. После инкубации при комнатной температуре в течение 10 минут и короткого центрифугирования для удаления пузырьков используют термоциклер Bio-Rad CFX384™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler с программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager для создания градиента от 20°C до 90°C с повышением температуры на 1°C каждые 10 с.

Второй анализ состоит из смешивания различных концентраций gRNA с фиксированной концентрацией (например, 2 мкМ) Cas9 в оптимальном буфере из анализа 1, описанного выше, и инкубации (например, при комнатной температуре в течение 10 минут) в 384-луночном планшете. Добавляется равный объем оптимального буфера + 10x SYPRO Orange® (Life Technologies, № по кат. S-6650), и планшет запечатывается средством Microseal® B adhesive (MSB-1001). После короткого центрифугирования для удаления пузырьков используется термоциклер Bio-Rad CFX384™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler с программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager для создания градиента от 20°C до 90°C с повышением температуры на 1°C каждые 10 с.

#### Стратегии редактирования генома

Вышеописанные системы редактирования генома используются в различных вариантах осуществления настоящего изобретения для получения изменений (т.е. для изменения) областей-мишеней ДНК внутри клетки или полученных из клетки. В данном документе описаны различные стратегии для получения конкретных изменений, и эти стратегии обычно описываются в отношении желаемого исхода репарации, количества и расположения отдельных изменений (например, SSB или DSB) и сайтов-мишеней таких изменений.

Стратегии редактирования генома, которые включают образование SSB или DSB, характеризуются исходами репарации, включая (а) делецию всей или части области-мишени; (b) вставка или замена всей или части области-мишени; или (с) прерывание всей или части области-мишени. Это группирование не предназначено для ограничения или привязки к какой-либо конкретной теории или модели и предлагается исключительно для экономии изложения. Специалисты в данной области техники оценят, что перечисленные исходы не являются взаимоисключающими и что некоторые виды репарации могут привести к другим исходам. Описание конкретной стратегии или способа редактирования не следует понимать как требующее определенного исхода репарации, если не указано иное. Замена области-мишени обычно включает замену всей или части существующей последовательности в области-мишени на гомологичную последовательность, например, посредством генной коррекции или генной конверсии, двух исходов репарации, которые опосредуются путями HDR. HDR обеспечивается за счет использования донорной

матрицы, которая может быть одноцепочечной или двухцепочечной, как более подробно описано ниже. Одноцепочечные или двухцепочечные матрицы могут быть экзогенными, и в этом случае они будут способствовать генной коррекции, или они могут быть эндогенными (например, гомологичная последовательность в клеточном геноме), чтобы способствовать конверсии гена. Экзогенные матрицы могут иметь асимметричные выступающие концы (т.е. часть матрицы, которая является комплементарной сайту DSB, может быть смещена в направлении 3' или 5', а не центрирована в донорной матрице), например, как описано в Richardson et al. (Nature Biotechnology 34, 339-344 (2016), (Richardson), включенной посредством ссылки). В случаях, когда матрица является одноцепочечной, она может соответствовать либо комплементарной (верхней), либо некомплементарной (нижней) цепи области-мишени.

#### Генные конструкции

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены сложные стратегии редактирования и образующиеся в результате модифицированные клетки, имеющие сложные геномные изменения, которые обеспечивают возможность получения передовых продуктов на основе НК-клеток для клинических применений, например, для терапевтических подходов в иммуноонкологии. В некоторых вариантах осуществления геномные изменения вводятся с использованием одной или нескольких экспрессионных конструкций HDR. В некоторых вариантах осуществления геномные изменения вводятся с использованием одной или нескольких экспрессионных конструкций HDR. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных конструкций HDR содержат одну или несколько донорных матриц HDR. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько донорных матриц HDR содержат одну или несколько экспрессионных кассет, кодирующих одну или несколько cDNA. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит одну экспрессионную кассету. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит две экспрессионные кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит три экспрессионные кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит четыре экспрессионные кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит пять экспрессионных кассет. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит шесть экспрессионных кассет. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит семь экспрессионных кассет. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит восемь экспрессионных кассет. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит девять экспрессионных кассет. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица HDR содержит десять экспрессионных кассет. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет являются моноцистронными. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет являются бицистронными. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат одну cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат две cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат три cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат четыре cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат пять cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат шесть cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат семь cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат восемь cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат девять cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат десять cDNA. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат одну или несколько cDNA, разделенных последовательностью 2A. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат две cDNA, разделенных последовательностью 2A. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных кассет содержат три cDNA, разделенных последовательностью 2A.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция HDR содержит одну или несколько cDNA, управляемых гетерологичным промотором. В некоторых вариантах осуществления последовательностью одна или несколько экспрессионных кассет содержат cDNA для экспрессии одного или нескольких генов, перечисленных в табл. 10.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция HDR содержит одну или несколько донорных матриц для встраивания инактивирующей мутации в ген-мишень, где продукт гена характеризуется меньшей функцией или ее отсутствием (будучи частично или полностью инактивированным). В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция HDR содержит одну или несколько донорных матриц для встраивания инактивирующей мутации в ген-мишень, где продукт гена характеризуется отсутствием функции (будучи полностью инактивированным).

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую cDNA одного или нескольких генов, перечисленных в табл. 10. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению содержит любую комбинацию двух или более экзогенных конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих cDNA одного или нескольких генов, перечислен-





рует потерю функции по меньшей мере семи или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере восьми или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере девяти или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере десяти или более генов, перечисленных в табл. 11.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная НК-клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного или нескольких генов, перечисленных в табл. 11, или любой комбинации двух или более из них. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере двух или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере трех или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере четырех или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере пяти или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере шести или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере семи или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере восьми или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере девяти или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению демонстрирует потерю функции по меньшей мере десяти или более генов, перечисленных в табл. 11.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую cDNA одного или нескольких генов, перечисленных в табл. 10, и демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного гена, перечисленного в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению содержит любую комбинацию двух или более экзогенных конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих cDNA одного или нескольких генов, перечисленных в табл. 10, по меньшей мере одного гена, перечисленного в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую cDNA одного или нескольких генов, перечисленных в табл. 10, и потерю функции двух или более генов, перечисленных в табл. 11. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению содержит две или более экзогенных конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих cDNA одного или нескольких генов, перечисленных в табл. 10, и потерю функции двух или более генов, перечисленных в табл. 11.

Генная конверсия и генная коррекция облегчены, в некоторых случаях, посредством образования одного или несколько одноцепочечных разрывов в области-мишени или вокруг нее, как описано в Ran и Cotta-Ramusino. В некоторых случаях двойная никазная стратегия используется для образования двух смещенных SSB, которые, в свою очередь, образуют один DSB, имеющий выступающий конец (например, 5'-выступающий конец).

Прерывание и/или делеция всей или части последовательности-мишени могут быть достигнуты с помощью множества исходов репарации. В качестве одного примера, может быть осуществлена делеция последовательности путем одновременного образования двух или более DSB, которые фланкируют область-мишень, которая затем вырезается, когда происходит репарация DSB, как описано в Maeder для мутации LCA10. В качестве другого примера последовательность может быть прервана делецией, образованной путем образования двухцепочечного разрыва с одноцепочечными выступающими концами с последующим экзонуклеолитическим процессингом выступающих концов перед репарацией.

Одно конкретное подмножество прерываний последовательности-мишени опосредуется образованием вставки/делеции в последовательности-мишени, где исход репарации обычно опосредуется путями NHEJ (включая Alt-NHEJ). NHEJ называют "подверженным ошибкам" путем репарации из-за его ассоциации с мутациями типа "вставка/делеция". Однако в некоторых случаях репарация DSB происходит посредством NHEJ без изменения последовательности вокруг разрыва (так называемая "идеальная" или "безрубцовая" репарация); это обычно требует, чтобы два конца DSB были идеально лигированы. Вставки/делеции, тем временем, как полагают, возникают вследствие ферментативного процессинга свободных концов ДНК, прежде чем они лигируются, что добавляет и/или удаляет нуклеотиды из одной или обеих цепей одного или обоих свободных концов.

Поскольку ферментативный процессинг свободных концов DSB может быть стохастическим по

своей природе, мутации типа "вставка/делеция", как правило, переменны и происходят в пределах спектра, и могут зависеть от множества факторов, включая конкретный сайт-мишень, используемый тип клетки, используемую стратегию редактирования генома и т.д. Даже в этом случае можно сделать ограниченные обобщения относительно образования вставок/делеций: делеции, образованные путем репарации одного DSB, чаще всего находятся в диапазоне 1-50 п.о., но могут достигать более 100-200 п.о. Вставки, образованные путем репарации одного DSB, обычно короче и часто включают короткие дубликации последовательности, непосредственно окружающей место разрыва. Однако возможно получить большие вставки, и в этих случаях вставленная последовательность часто прослеживается до других участков генома или плазмидной ДНК, присутствующей в клетках.

Мутации типа "вставка/делеция" и системы редактирования генома, сконфигурированные для получения вставок/делеций, применимы для прерывания последовательностей-мишеней, например, когда образование конкретной конечной последовательности не требуется, и/или где будут допустимы мутации сдвига рамки считывания. Они также могут быть применимы в условиях, когда предпочтительны определенные последовательности, поскольку определенные требуемые последовательности имеют тенденцию предпочтительно возникать в результате репарации SSB или DSB в данном сайте. Мутации типа "вставка/делеция" также являются применимым инструментом для оценки или скрининга активности конкретных систем редактирования генома и их компонентов. В этих и других условиях вставок/делеций могут быть охарактеризованы (а) их относительной и абсолютной частотой в геномах клеток, контактирующих с системами редактирования генома, и (б) распределением численных различий относительно неотредактированной последовательности, например,  $\pm 1$ ,  $\pm 2$ ,  $\pm 3$  и т.д. В качестве одного примера в условиях поиска лидерного соединения можно провести скрининг множества gRNA для выявления тех gRNA, которые наиболее эффективно управляют разрезанием в сайте-мишени, на основе показателя вставки/делеции в контролируемых условиях. Направляющие, которые приводят к образованию вставок/делеций с частотой на уровне пороговой или выше, или которые приводят к определенному распределению вставок/делеций, могут быть выбраны для дальнейшего изучения и развития. Частота и распределение вставки/делеции также могут быть полезными в качестве показателя для оценки реализаций различных систем редактирования генома или составов и способов доставки, например, сохраняя gRNA постоянной и варьируя определенные другие условия реакции или способы доставки.

#### Мультиплексные стратегии

Хотя иллюстративные стратегии, обсужденные выше, сосредоточены на исходах репарации, опосредованных одиночными DSB, системы редактирования генома в соответствии с настоящим изобретением также могут быть использованы для образования двух или более DSB либо в одном и том же локусе, либо в разных локусах. Стратегии для редактирования, которые включают образование множества DSB или SSB, описаны, например, в Cotta-Ramusino. В некоторых вариантах осуществления, когда в геноме НК-клетки или клетки, из которой происходит НК-клетка, вносятся множественные изменения, то эти изменения вносятся одновременно или в непосредственной близости по времени. В некоторых таких вариантах осуществления два или более геномных изменения осуществляются двумя или более разными РНК-направляемыми нуклеазами. Например, одно из геномных изменений может быть осуществлено с помощью saCas9 (в связи с соответствующей направляющей РНК saCas9), а другое геномное изменение может быть осуществлено с помощью Cpf1 (в связи с соответствующей направляющей РНК Cpf1). В некоторых вариантах осуществления использование различных РНК-направляемых нуклеаз в контексте мультиплексных подходов к геномному редактированию является преимущественным по сравнению с использованием одной и той же РНК-направляемой нуклеазы для двух или более изменений, например, в том смысле, что это позволяет снизить вероятность или частоту нежелательных эффектов, таких как, например, нецелевое разрезание и возникновение геномных транслокаций.

#### Конструкция донорной матрицы

Конструкция донорной матрицы подробно описана в литературе, например в Cotta-Ramusino. Донорные матрицы в виде олигомеров ДНК (олигодезоксинуклеотиды или ODN), которые могут быть одноцепочечными (ssODN) или двухцепочечными (dsODN), могут использоваться для облегчения репарации DSB на основе HDR и особенно применимы для внесения изменений в последовательность-мишень ДНК путем вставки новой последовательности в последовательность-мишень или полной замены последовательности-мишени.

Независимо от того, одноцепочечные они или двухцепочечные, донорные матрицы обычно включают области, которые гомологичны областям ДНК, находящимся внутри или рядом с (например, фланкируя или примыкая к) подлежащей расщеплению последовательностью-мишенью. Эти гомологичные области называются в данном документе "плечами гомологии" и схематически проиллюстрированы ниже.

[5'-плечо гомологии] - [замещающая последовательность] - [3'-плечо гомологии]

Плечи гомологии могут иметь любую подходящую длину (включая 0 нуклеотидов, если используется только одно плечо гомологии), и 3'- и 5'-плечи гомологии могут иметь одинаковую длину или могут различаться по длине. На выбор подходящей длины плеч гомологии может влиять множество факторов, таких как желание избежать гомологии или микрогомологий с определенными последовательностями, такими как повторы Alu или другие очень распространенные элементы. Например, 5'-плечо гомологии

может быть укорочено, чтобы избежать элемента повторяющейся последовательности. В других вариантах осуществления 3'-плечо гомологии может быть укорочено, чтобы избежать элемента повторяющейся последовательности. В некоторых вариантах осуществления оба плеча гомологии 5' и 3' могут быть укорочены, чтобы избежать включения определенных элементов повторяющихся последовательностей. Кроме того, некоторые конструкции плеч гомологии могут повысить эффективность редактирования или увеличить частоту требуемого исхода репарации. Например, в Richardson et al. *Nature Biotechnology* 34, 339-344 (2016) (Richardson), которая включена посредством ссылки, обнаружили, что относительная асимметрия 3'- и 5'-плеч гомологии одноцепочечных донорных матриц влияет на скорость и/или исходы репарации.

Замещающие последовательности в донорных матрицах были описаны в другой литературе, в том числе в Cotta-Ramusino et al. Замещающая последовательность может иметь любую подходящую длину (включая ноль нуклеотидов, если желаемым исходом репарации является делеция) и обычно включает одну, две, три или более модификаций последовательности относительно встречающейся в природе последовательности в клетке, редактирование которой требуется. Одна из распространенных модификаций последовательности включает изменение встречающейся в природе последовательности для репарации мутации, которая связана с заболеванием или состоянием, лечение которого требуется. Другая распространенная модификация последовательности включает изменение одной или нескольких последовательностей, которые комплементарны или кодируют последовательность РНК-направляемой нуклеазы или нацеливающий домен gRNA, используемые для образования SSB или DSB, для уменьшения или устранения повторного расщепления сайта-мишени после того, как замещающая последовательность была включена в сайт-мишень.

Если используется линейный ssODN, он может быть сконфигурирован таким образом, чтобы он подвергался (i) отжигу с разорванной цепью нуклеиновой кислоты-мишени, (ii) отжигу с интактной цепью нуклеиновой кислоты-мишени, (iii) отжигу с плюс-цепью нуклеиновой кислоты-мишени и/или (iv) отжигу с минус-цепью нуклеиновой кислоты-мишени. ssODN может иметь любую подходящую длину, например, приблизительно, по меньшей мере или не более 150-200 нуклеотидов (например, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 нуклеотидов). Следует отметить, что матричная нуклеиновая кислота также может представлять собой вектор на основе нуклеиновой кислоты, такой как вирусный геном или кольцевая двухцепочечная ДНК, например, плаزمид. Векторы на основе нуклеиновых кислот, содержащие донорные матрицы, могут включать другие кодирующие или некодирующие элементы. Например, матричная нуклеиновая кислота может быть доставлена как часть вирусного генома (например, в геноме AAV или лентивируса), который включает определенные элементы геномного остова (например, инвертированные концевые повторы в случае генома AAV) и необязательно включает дополнительные последовательности, кодирующие gRNA и/или РНК-направляемую нуклеазу. В определенных вариантах осуществления к донорной матрице могут примыкать или ее могут фланкировать сайты-мишени, распознаваемые одной или несколькими gRNA, для облегчения образования свободных DSB на одном или обоих концах донорной матрицы, которые могут участвовать в репарации соответствующих SSB или DSB, образованных в клеточной ДНК с использованием тех же gRNA. Иллюстративные векторы на основе нуклеиновых кислот, подходящие для применения в качестве донорных матриц, описаны в Cotta-Ramusino.

Какой бы формат ни использовался, можно сконструировать матричную нуклеиновую кислоту, чтобы избежать нетребуемых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления одно или оба плеча гомологии могут быть укорочены, чтобы избежать перекрытия с определенными элементами повторяющихся последовательностей, например, повторов Alu, элементов LINE и т.д.

Количественное измерение целевого редактирования генов Следует отметить, что системы редактирования генома по настоящему изобретению позволяют обнаруживать и количественно измерять исходы целевого редактирования генов, включая целевую интеграцию. Композиции и способы, описанные в данном документе, могут основываться на использовании донорных матриц, содержащих 5'-плечо гомологии, карго, один или несколько сайтов праймирования, 3'-плечо гомологии и необязательно спейсерную последовательность. Например, в международной патентной публикации № WO2019/014564 Ramusino et al. (Ramusino), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, описываются композиции и способы, которые позволяют проводить количественный анализ исходов целевого редактирования генов, включая события целевой интеграции, путем встраивания одного или нескольких сайтов связывания праймеров (т.е. сайтов праймирования) в донорную матрицу, которые по сути идентичны сайту праймирования, присутствующему в локусе-мишени геномной ДНК (т.е. нуклеиновой кислоте-мишени). Сайты праймирования встроены в донорную матрицу таким образом, что когда происходит гомологичная рекомбинация донорной матрицы с нуклеиновой кислотой-мишенью, успешная целевая интеграция донорной матрицы интегрирует сайты праймирования из донорной матрицы в нуклеиновую кислоту-мишень таким образом, что по меньшей мере один ампликон может быть получен для количественного определения исходов целевого редактирования. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота-мишень содержит первый сайт праймирования (P1) и второй сайт праймирования (P2), а донорная матрица содержит последовательность карго, первый сайт праймирования (P1') и второй сайт праймирования (P2'), где P2' расположен в направлении 5' от последовательности

карго, где P1' расположен в направлении 3' от последовательности карго (т.е. A1--P2'--N--P1'--A2), где P1' по сути идентичен P1, и где P2' по сути идентичен P2. После точной целевой интеграции, управляемой гомологией, получают три ампликона с использованием одной реакции ПЦР с двумя олигонуклеотидными праймерами. Первый ампликон, Amplicon X, образуется из сайтов связывания праймеров, изначально присутствующих в геномной ДНК (P1 и P2), и может быть секвенирован для анализа событий целевого редактирования, которые не приводят к целевой интеграции (например, вставок, делеций, геной конверсии). Оставшиеся два ампликона картируются в сайтах 5'- и 3'-соединений после целевой интеграции, управляемой гомологией. Второй ампликон, Amplicon Y, является результатом амплификации последовательности нуклеиновой кислоты между P1 и P2' после события целевой интеграции в нуклеиновой кислоте-мишени, тем самым амплифицируя сайт 5'-соединения. Третий ампликон, Amplicon Z, является результатом амплификации последовательности нуклеиновой кислоты между P1 и P2' после события целевой интеграции в нуклеиновой кислоте-мишени, тем самым амплифицируя сайт 3'-соединения. Секвенирование данных ампликонов обеспечивает количественную оценку целевой интеграции в нуклеиновой кислоте-мишени в дополнение к информации о точности целевой интеграции. Чтобы избежать каких-либо смещений, обуславливаемых размером ампликона, в донорную матрицу необязательно может быть включена спейсерная последовательность, чтобы обеспечить одинаковую длину всех трех ожидаемых ампликонов.

#### Реализация систем редактирования генома: доставка, составы и пути введения

Как обсуждалось выше, системы редактирования генома по настоящему изобретению могут быть реализованы любым подходящим путем, что означает, что компоненты таких систем, включая без ограничения РНК-направляемую нуклеазу, gRNA и необязательную донорную матричную нуклеиновую кислоту, могут быть доставлены, составлены или введены в любой подходящей форме или комбинации форм, которые приводят к трансдукции, экспрессии или введению системы редактирования генома и/или вызывают требуемый исход репарации в клетке, ткани или субъекте. Системы редактирования генома в соответствии с настоящим изобретением могут включать множество gRNA, множество РНК-направляемых нуклеаз и другие компоненты, такие как белки, и для специалиста в данной области техники будут очевидны различные реализации на основе принципов, проиллюстрированных в системах по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома по настоящему изобретению доставляется в клетки в виде рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса. В некоторых вариантах осуществления один или несколько RNP-комплексов доставляются в клетку последовательно в любом порядке или одновременно. Нуклеиновые кислоты, кодирующие различные элементы системы редактирования генома по настоящему изобретению, можно вводить субъектам или доставлять в клетки известными в данной области техники способами или как описано в данном документе. Например, ДНК, кодирующие РНК-направляемые нуклеазы и/или gRNA, а также донорные матричные нуклеиновые кислоты могут быть доставлены с помощью, например, способов на основе векторов (например, вирусных или невирусных векторов), способов не на основе векторов (например, с использованием "голой" ДНК или комплексов ДНК) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома по настоящему изобретению доставляется посредством AAV.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие системы редактирования генома или их компоненты, могут быть доставлены непосредственно в клетки в виде голы ДНК или РНК, например, посредством трансфекции или электропорации, или могут быть конъюгированы с молекулами (например, с N-ацетилгалактозамином), способствующими поглощению клетками-мишенями (например, эритроцитами, HSC). В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома по настоящему изобретению доставляется в клетки путем электропорации. Одно из многообещающих решений для улучшения способов клеточной терапии состоит в прямой доставке активных белков в клетки человека. Средство доставки белка, Feldan Shuttle, представляет собой средство доставки на основе белка, которое разработано для клеточной терапии (Del'Guidice et al., PLoS One. 2018 Apr 4;13(4):e0195558; включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома по настоящему изобретению доставляется в клетки посредством Feldan Shuttle. Модифицированные клетки по настоящему изобретению можно вводить любыми известными путями введения, известными специалисту в данной области техники, на момент подачи данной заявки. В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки по настоящему изобретению вводят внутривенно (IV). В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки по настоящему изобретению вводят внутривенно (IV).

Используемый в данном документе термин "доза" относится к определенному количеству фармакологически активного материала для введения субъекту в течение заданного времени. Если не указано иное, указанные дозы относятся к НК-клеткам, имеющим сложные геномные изменения, которые обеспечивают возможность получения передовых продуктов на основе НК-клеток для клинических применений. В некоторых вариантах осуществления доза модифицированных НК-клеток относится к эффективному количеству модифицированных НК-клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления доза или эффективное количество модифицированных НК-клеток относится к приблизительно  $1 \times 10^9$ - $5 \times 10^9$

модифицированных НК-клеток или приблизительно  $2 \times 10^9$ - $5 \times 10^9$  модифицированных НК-клеток на дозу. В некоторых вариантах осуществления доза или эффективное количество модифицированных НК-клеток относится к приблизительно  $3 \times 10^9$ - $5 \times 10^9$  модифицированных НК-клеток или приблизительно  $4 \times 10^9$ - $5 \times 10^9$  модифицированных НК-клеток на дозу.

#### Получение модифицированных iNK-клеток

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к получению генетически модифицированных НК-клеток, которые происходят из стволовых клеток, например, из мультипотентных клеток, таких как, например, HSC, или из плюрипотентных стволовых клеток, таких как, например, ES-клетки или iPS-клетки. В некоторых вариантах осуществления, где генетически модифицированные iNK-клетки, которые происходят из iPS-клеток, iPS-клетки происходят из соматической донорской клетки. В некоторых вариантах осуществления, где генетически модифицированные iNK-клетки происходят из iPS-клеток, iPS-клетки происходят из мультипотентной донорской клетки, например, из HSC.

Геномные изменения, присутствующие в конечной iNK-клетке, могут быть выполнены на любой стадии способа репрограммирования донорской клетки до состояния iPS-клетки, во время состояния iPS-клетки и/или на любой стадии способа дифференцировки iPS-клетки в состояние iNK-клетки, например, в промежуточном состоянии, таком как, например, состояние HSC, происходящей из iPS-клетки, или даже до или во время конечного состояния iNK-клетки. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько геномных изменений, присутствующих в модифицированной iNK-клетке, предусмотренной в данном документе, выполняются до репрограммирования донорской клетки до состояния iPS-клетки. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько геномных изменений, присутствующих в модифицированной iNK-клетке, предусмотренной в данном документе, выполняются одновременно, в непосредственной близости по времени и/или на одной и той же клеточной стадии способа репрограммирования/дифференцировки, например, на стадии донорской клетки, во время способа репрограммирования, на стадии iPS-клетки или во время способа дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления два или более изменений, присутствующих в модифицированной iNK-клетке, предусмотренной в данном документе, выполняются в разное время и/или на разных клеточных стадиях способа репрограммирования/дифференцировки клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления одно изменение выполняют на стадии донорской клетки, а другое изменение выполняют на стадии iPS-клетки; в некоторых вариантах осуществления одно изменение выполняют на стадии репрограммирования, а другое изменение выполняют на стадии iPS-клетки. Эти примеры представлены для иллюстрации некоторых стратегий, предусмотренных в данном документе, и не предназначены для ограничения.

В качестве донорской клетки можно использовать различные типы клеток, которые можно подогнать стратегиям репрограммирования, дифференцировки и геномного редактирования, предусмотренным в данном документе, для получения модифицированных iNK-клеток. Донорская клетка, которая должна быть подвергнута стратегиям репрограммирования, дифференцировки и геномного редактирования, предусмотренным в данном документе, может представлять собой любой подходящий тип клеток. Например, донорская клетка может представлять собой плюрипотентную стволовую клетку или дифференцированную клетку, например, соматическую клетку, такую как, например, фибробласт или Т-лимфоцит.

В некоторых вариантах осуществления донорская клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления донорская клетка представляет собой клетку примата, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления донорская клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления донорская клетка представляет собой соматическую клетку. В некоторых вариантах осуществления донорская клетка представляет собой стволовую клетку или клетку-предшественника. В некоторых вариантах осуществления донорская клетка не является частью человеческого эмбриона, и ее получение не включает разрушение человеческого эмбриона. В некоторых вариантах осуществления iNK-клетки и способы получения таких iNK-клеток, имеющих одно или несколько геномных изменений (например, нокаут гена, нежелательного для терапевтических подходов в иммуноонкологии, и/или нокин экзогенной нуклеиновой кислоты, например, экспрессионной конструкции, кодирующей продукт гена, требуемый для терапевтических подходов в иммуноонкологии). В некоторых вариантах осуществления, iNK-клетки происходят из iPS-клеток, которые, в свою очередь, происходят из соматической донорской клетки. Любая подходящая соматическая клетка может быть использована для получения iPS-клеток и, в свою очередь, для получения iNK-клеток. Подходящие стратегии получения iPS-клеток из различных типов соматических донорских клеток описаны и известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления соматическая донорская клетка представляет собой фибробласт. В некоторых вариантах осуществления соматическая донорская клетка представляет собой зрелую Т-клетку.

Например, в некоторых вариантах осуществления соматическая донорская клетка, из которой происходит iPS-клетка, а затем и iNK-клетка, представляет собой Т-клетку, созревшую в процессе развития (Т-клетку, которая подверглась селекции в тимусе). Отличительной чертой Т-клеток, созревших в процессе развития, является перестроенный локус Т-клеточного рецептора. Во время созревания Т-клеток

локус TCR подвергается перестройкам V(D)J с образованием полных экзонов V-домена. Эти перестройки сохраняются в ходе репрограммирования Т-клеток в индуцированную плюрипотентную стволовую (iPS) клетку и в ходе дифференцировки полученной iPS-клетки в соматическую клетку.

В определенных вариантах осуществления соматическая донорская клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку, наивную CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> Т-клетку центральной памяти, CD8<sup>+</sup> Т-клетку центральной памяти, эффекторную CD4<sup>+</sup> Т-клетку памяти, эффекторную CD4<sup>+</sup> Т-клетку памяти, CD4<sup>+</sup> Т-клетку, стволовую CD4<sup>+</sup> Т-клетку памяти, стволовую CD8<sup>+</sup> Т-клетку памяти, CD4<sup>+</sup> хелперную Т-клетку, регуляторную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку, естественную Т-клетку-киллера, наивную CD4<sup>+</sup> Т-клетку, TH17 CD4<sup>+</sup> Т-клетку, TH1 CD4<sup>+</sup> Т-клетку, TH2 CD4<sup>+</sup> Т-клетку, TH9 CD4<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> Т-клетку, или CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> Т-клетку.

Одним из преимуществ использования Т-клеток для получения iPS-клеток является то, что Т-клетки можно относительно легко редактировать, например, с помощью способов на основе CRISPR или других способов редактирования генов. Еще одно преимущество использования Т-клеток для получения iPS-клеток состоит в том, что перестроенный локус TCR обеспечивает возможность генетического отслеживания отдельных клеток и их дочерних клеток. Если стратегии репрограммирования, размножения, культивирования и/или дифференцировки вовлечены в получение NK-клеток, в клональной экспансии отдельной клетки можно использовать перестроенный локус TCR в качестве генетического маркера, однозначно идентифицирующего клетку и ее дочерние клетки. Это, в свою очередь, позволяет характеризовать клеточную популяцию как истинно клональную, или идентифицировать смешанные популяции или контаминирующие клетки в клональной популяции.

Третье преимущество использования Т-клеток для получения iNK-клеток, несущих множественные изменения, заключается в том, что культура Т-клеток отбирается против определенных кариотипических aberrаций, связанных с хромосомными транслокациями. Такие aberrации являются поводом для беспокойства при редактировании клеток с помощью технологии CRISPR и, в частности, при получении клеток с множественными изменениями.

Четвертое преимущество использования iPS-клеток, полученных из Т-клеток, в качестве отправной точки для получения терапевтических лимфоцитов заключается в том, что оно обеспечивает возможность экспрессии подвергшихся предварительному скринингу TCR в лимфоцитах, например, путем отбора Т-клеток на основании активности связывания в отношении специфического антигена, например опухолевого антигена, репрограммирования выбранных Т-клеток в iPS-клетки, а затем получения из этих iPS-клеток лимфоцитов, которые экспрессируют TCR (например, Т-клеток). Эта стратегия также позволит активировать TCR в других типах клеток, например, с помощью генетических или эпигенетических стратегий.

Пятое преимущество использования iPS-клеток, полученных из Т-клеток, в качестве отправной точки для дифференцировки iNK заключается в том, что Т-клетки сохраняют по меньшей мере часть своей "эпигенетической памяти" в ходе процесса репрограммирования и, таким образом, последующая дифференцировка в такой же тип клеток или близкородственный тип клеток, такой как iNK-клетки, будет более эффективной и/или приведет к более качественным популяциям клеток по сравнению с подходами, использующими неродственные клетки, такие как фибробласты, в качестве отправной точки для получения iNK.

В определенных вариантах осуществления донорская клетка, подвергаемая манипуляциям, например, репрограммируемая клетка и/или клетка, геном которой редактируется, представляет собой долгосрочную гемопоэтическую стволовую клетку, краткосрочную гемопоэтическую стволовую клетку, мультипотентную клетку-предшественника, ограниченную по линии дифференцировки клетку-предшественника, лимфоидную клетку-предшественника, миелоидную клетку-предшественника, общую миелоидную клетку-предшественника, эритроидную клетку-предшественника, эритро-мегакариоцитарную клетку-предшественника, клетку сетчатки, фоторецепторную клетку, палочковидную клетку, колбочковую клетку, клетку пигментированного эпителия сетчатки, клетку трабекулярной сети, волосковую клетку улитки, внешнюю волосковую клетку, внутреннюю волосковую клетку, легочную эпителиальную клетку, бронхиальную эпителиальную клетку, альвеолярную эпителиальную клетку, легочную эпителиальную клетку-предшественника, поперечнополосатую мышечную клетку, сердечную мышечную клетку, сателлитную клетку мышцы, нейрон, нейрональную стволовую клетку, мезенхимальную стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPS), эмбриональную стволовую клетку, фибробласт, происходящие из моноцитов макрофаг или дендритную клетку, мегакариоцит, нейтрофил, эозинофил, базофил, тучную клетку, ретикулоцит, В-клетку, например, предшественника В-клетки, пре-В-клетку, про-В-клетку, В-клетку памяти, плазматическую В-клетку, эпителиальную клетку желудочно-кишечного тракта, билиарную эпителиальную клетку, эпителиальную клетку протока поджелудочной железы, кишечную стволовую клетку, гепатоцит, звездчатую клетку печени, клетку Купфера, остеобласт, остеокласт, адипоцит, преадипоцит, островковую клетку поджелудочной железы (например, бета-клетку, альфа-клетку, дельта-клетку), экзокринную клетку поджелудочной железы, шванновскую клетку или олигодендроцит.

В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой циркулирующую

кровяную клетку, например, ретикулоцит, эритро-мегакариоцитарную клетку-предшественника (MEP), миелоидную клетку-предшественника (CMP/GMP), лимфоидную клетку-предшественника (LP), гемопоэтическую стволовую клетку/клетку-предшественника (HSC) или эндотелиальную клетку (EC). В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой клетку костного мозга (например, ретикулоцит, эритроидную клетку (например, эритробласт), клетку MEP, миелоидную клетку-предшественника (CMP/GMP), клетку LP, эритроидную клетку-предшественника (EP), HSC, мультипотентную клетку-предшественника (MPP), эндотелиальную клетку (EC), клетку гомогенного эндотелия (HE) или мезенхимальную стволовую клетку). В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой миелоидную клетку-предшественника (например, общую миелоидную клетку-предшественника (CMP) или гранулоцитарно-макрофагальную клетку-предшественника (GMP)). В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой лимфоидную клетку-предшественника, например, общую лимфоидную клетку-предшественника (CLP). В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой эритроидную клетку-предшественника (например, клетку MEP). В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку/клетку-предшественника (например, долгосрочную HSC (LT-HSC), краткосрочную HSC (ST-HSC), клетку MPP или ограниченную по линии дифференцировки клетку-предшественника (LRP)). В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой CD34<sup>+</sup> клетку, CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> клетку, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клетку, CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> клетку, CD105<sup>+</sup> клетку, CD31<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> клетку или CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> клетку. В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой CD34<sup>+</sup> HSPC пуповинной крови, эндотелиальную клетку вены пуповины, эндотелиальную клетку артерии пуповины, CD34<sup>+</sup> клетку амниотической жидкости, эндотелиальную клетку амниотической жидкости, эндотелиальную клетку плаценты или CD34<sup>+</sup> гемопоэтическую клетку плаценты. В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой мобилизованную CD34<sup>+</sup> гемопоэтическую клетку периферической крови (после лечения пациента средством мобилизации, например, G-CSF или Plerixafor). В определенных вариантах осуществления донорская клетка представляет собой эндотелиальную клетку периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления донорская клетка представляет собой делящуюся клетку. В других вариантах осуществления донорская клетка представляет собой неделиющуюся клетку.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные iNK-клетки, полученные в результате способов и стратегий репрограммирования, дифференцировки и редактирования, предусмотренных в данном документе, вводят нуждающемуся в этом субъекту, например, в контексте терапевтического подхода в иммуноонкологии. В некоторых вариантах осуществления донорские клетки или любые клетки на любой стадии репрограммирования, дифференцировки и редактирования, предусмотренные в данном документе, могут поддерживаться в культуре или храниться (например, замороженными в жидком азоте) с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, например, для последующего определения характеристик или введения нуждающемуся в этом субъекту.

#### Репрограммирование клеток

Клетка, которая характеризуется повышенной активностью клетки, имеет большую пластичность в развитии (т.е. может дифференцироваться в большее количество типов клеток) по сравнению с той же клеткой в перепрограммированном состоянии. Другими словами, репрограммированная клетка представляет собой клетку, которая находится в менее дифференцированном состоянии, чем такая же клетка в перепрограммированном состоянии.

Репрограммирование клеток по настоящему изобретению может быть выполнено с использованием нескольких способов. Примеры некоторых способов репрограммирования соматических клеток по настоящему изобретению описаны без ограничения в Valamehr et al. WO 2017/078807 ("Valamehr") и Mendlein et al. WO 2010/108126 ("Mendlein"), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Вкратце, способ направления дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток на клетки дефинитивной гемопоэтической линии дифференцировки может включать (i) приведение в контакт плюрипотентных стволовых клеток с композицией, содержащей активатор BMP и необязательно bFGF, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток из плюрипотентных стволовых клеток; (ii) приведение в контакт мезодермальных клеток с композицией, содержащей активатор BMP, bFGF и ингибитор GSK3, где в композиции необязательно отсутствует ингибитор рецептора TGFβ/ALK, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, из мезодермальных клеток; (iii) приведение в контакт мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, с композицией, содержащей ингибитор ROCK; один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из bFGF, VEGF, SCF, IGF, EPO, IL6 и IL11; и необязательно активатор пути Wnt, где в композиции необязательно отсутствует ингибитор рецептора TGFβ/ALK, для инициации дифференцировки и размножения дефинитивного гомогенного эндотелия из мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный гомогенный эндотелий, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток; и



необязательно подвержение плюрипотентных стволовых клеток, мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный гомогенный эндотелий и/или дефинитивного гомогенного эндотелия воздействию низкого давления кислорода, составляющего от приблизительно 2% до приблизительно 10%.

В некоторых вариантах осуществления способа направления дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток на клетки гемопоэтической линии дифференцировки, способ дополнительно включает приведение в контакт плюрипотентных стволовых клеток с композицией, содержащей ингибитор MEK, ингибитор GSK3 и ингибитор ROCK, где в композиции отсутствуют ингибиторы рецептора TGF $\beta$ /ALK, для посева и размножения плюрипотентных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки представляют собой iPSC. В некоторых вариантах осуществления iPSC представляют собой наивные iPSC. В некоторых вариантах осуществления iPSC содержит один или несколько генетических импринтов, и где один или несколько генетических импринтов, содержащихся в iPSC, сохраняются в происходящих и дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток гемопоэтических клетках. В некоторых вариантах осуществления способа направления дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток на клетки гемопоэтической линии дифференцировки эта дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток в клетки гемопоэтической линии дифференцировки происходит без образования эмбрионидных тел и осуществляется в форме монослойного культивирования. В некоторых вариантах осуществления указанного выше способа полученные клетки дефинитивного гомогенного эндотелия, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, являются CD34+. В некоторых вариантах осуществления полученные клетки дефинитивного гомогенного эндотелия являются CD34+CD43-. В некоторых вариантах осуществления клетки дефинитивного гомогенного эндотелия являются CD34+CD43-CXCR4-CD73-. В некоторых вариантах осуществления клетки дефинитивного гомогенного эндотелия являются CD34+ CXCR4-CD73-. В некоторых вариантах осуществления клетки дефинитивного гомогенного эндотелия являются CD34+CD43-CD93-. В некоторых вариантах осуществления клетки дефинитивного гомогенного эндотелия являются CD34+ CD93-.

В некоторых вариантах осуществления указанного выше способа способ дополнительно включает (i) приведение в контакт дефинитивного гомогенного эндотелия, происходящего из плюрипотентных стволовых клеток, с композицией, содержащей ингибитор ROCK; один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из VEGF, bFGF, SCF, Flt3L, TPO и IL7; и необязательно активатор BMP; для инициации дифференцировки дефинитивного гомогенного эндотелия в предшественники пре-Т-клеток; и необязательно (ii) приведение в контакт предшественников пре-Т-клеток с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L и IL7, но не содержащей одного или нескольких из VEGF, bFGF, TPO, активаторов BMP и ингибиторов ROCK, для инициации дифференцировки предшественников пре-Т-клеток в предшественники Т-клеток или Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления способа предшественники Т-клеток, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, являются CD34+CD45+CD7+. В некоторых вариантах осуществления способа предшественники Т-клеток, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, являются CD45+CD7+. В еще некоторых вариантах осуществления указанного выше способа направления дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток на клетки гемопоэтической линии дифференцировки способ дополнительно включает (i) приведение в контакт дефинитивного гомогенного эндотелия, происходящего из плюрипотентных стволовых клеток, с композицией, содержащей ингибитор ROCK; один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из VEGF, bFGF, SCF, Flt3L, TPO, IL3, IL7 и IL15; и необязательно активатор BMP, для инициации дифференцировки дефинитивного гомогенного эндотелия в предшественники пре-НК-клеток; и необязательно (ii) приведение в контакт предшественников пре-НК-клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L, IL3, IL7 и IL15, где среда не содержит одного или нескольких из VEGF, bFGF, TPO, активаторов BMP и ингибиторов ROCK, для инициации дифференцировки предшественников пре-НК-клеток в предшественники НК-клеток или НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления предшественники НК-клеток, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, являются CD3-CD45+CD56+CD7+. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, являются CD3-CD45+CD56+, и необязательно дополнительно определяются как NKp46+, CD57+ и CD16+. В еще некоторых вариантах осуществления указанного выше способа направления дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в НК-клетки способ дополнительно включает нокаут гена Nrg1 в плюрипотентных стволовых клетках.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения клеток линии дифференцировки Т, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, который включает (i) приведение в контакт плюрипотентных стволовых клеток с композицией, содержащей активатор BMP и необязательно bFGF, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток из плюрипотентных стволовых клеток; (ii) приведение в контакт мезодермальных клеток с композицией, содержащей активатор BMP, bFGF и ингибитор GSK3, где в композиции отсутствует ингибитор рецеп-

тора TGF $\beta$ /ALK, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, из мезодермальных клеток; (iii) приведение в контакт мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, с композицией, содержащей ингибитор ROCK; один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из bFGF, VEGF, SCF, IGF, EPO, IL6 и IL11; и необязательно активатор пути Wnt, где в композиции отсутствует ингибитор рецептора TGF $\beta$ /ALK, для инициации дифференцировки и размножения дефинитивного гемогенного эндотелия из мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE; (iv) приведение в контакт дефинитивного гемогенного эндотелия с композицией, содержащей ингибитор ROCK; один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из VEGF, bFGF, SCF, Flt3L, TPO и IL7; и необязательно активатор BMP; для инициации дифференцировки дефинитивного гемогенного эндотелия в предшественники пре-Т-клеток; и (v) приведение в контакт предшественников пре-Т-клеток с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L и IL7, где композиция не содержит одного или нескольких из VEGF, bFGF, TPO, активаторов BMP и ингибиторов ROCK, для инициации дифференцировки предшественников пре-Т-клеток в предшественники Т-клеток или Т-клетки; и необязательно засеянные плюрипотентные стволовые клетки, мезодермальные клетки, мезодермальные клетки, обладающие потенциалом превращения в дефинитивный HE и/или дефинитивный гемогенный эндотелий могут подвергаться воздействию низкого давления кислорода, составляющего от приблизительно 2% до приблизительно 10%. В некоторых вариантах осуществления группа II указанного выше способа дополнительно включает приведение в контакт iPSC с композицией, содержащей ингибитор MEK, ингибитор GSK3 и ингибитор ROCK, но не содержащей ингибиторов рецептора TGF $\beta$ /ALK, для посева и размножения плюрипотентных стволовых клеток; и/или где плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки представляют собой iPSC. В некоторых вариантах осуществления iPSC представляют собой наивную iPSC. В некоторых вариантах осуществления способа дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток в линии дифференцировки Т-клеток происходит без образования эмбрионных телес и осуществляется в формате монослойного культивирования.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения NK-клеток линии дифференцировки, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, который включает (i) приведение в контакт плюрипотентных стволовых клеток с композицией, содержащей активатор BMP и необязательно bFGF, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток из плюрипотентных стволовых клеток; (ii) приведение в контакт мезодермальных клеток с композицией, содержащей активатор BMP, bFGF и ингибитор GSK3, и необязательно не содержащей ингибитор рецептора TGF $\beta$ /ALK, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, из мезодермальных клеток; (iii) приведение в контакт мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из bFGF, VEGF, SCF, IGF, EPO, IL6 и IL11; ингибитор ROCK; необязательно активатор пути Wnt; и необязательно не содержащей ингибитор рецептора TGF $\beta$ /ALK, для инициации дифференцировки и размножения дефинитивного гемогенного эндотелия, происходящего из плюрипотентных стволовых клеток, из мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток; (iv) приведение в контакт дефинитивного гемогенного эндотелия, происходящего из плюрипотентных стволовых клеток, с композицией, содержащей ингибитор ROCK; один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из VEGF, bFGF, SCF, Flt3L, TPO, IL3, IL7 и IL15, и необязательно активатор BMP, для инициации дифференцировки дефинитивного гемогенного эндотелия, происходящего из плюрипотентных стволовых клеток, в предшественники пре-NK-клеток; и (v) приведение в контакт предшественников пре-NK-клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L, IL3, IL7 и IL15, но не содержащей одного или нескольких из VEGF, bFGF, TPO, активаторов BMP и ингибиторов ROCK, для инициации дифференцировки предшественников пре-NK-клеток, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, в предшественники NK-клеток или NK-клетки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток; и необязательно подвержение засеянных плюрипотентных стволовых клеток, мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, и/или дефинитивного гемогенного эндотелия воздействию низкого давления кислорода, составляющего от приблизительно 2% до приблизительно 10%. В некоторых вариантах осуществления способ группы II получения клеток линии дифференцировки NK, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, дополнительно включает приведение в контакт iPSC с композицией, содержащей ингибитор MEK, ингибитор GSK3 и ингибитор ROCK, но не содержащей ингибиторов рецептора TGF $\beta$ /ALK, для посева и размножения iPSC. В некоторых вариантах осуществления iPSC представляют собой наивные iPSC. В некоторых вариантах осуществления способ получения клеток линии дифференцировки NK, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток,

происходит без образования эмбрионных тел и осуществляется в формате монослойного культивирования. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения дефинитивного гемогенного эндотелия, происходящего из плюрипотентных стволовых клеток, где способ включает (i) приведение в контакт iPSC с композицией, содержащей активатор BMP и необязательно bFGF, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, из плюрипотентных стволовых клеток; (ii) приведение в контакт мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, с композицией, содержащей активатор BMP, bFGF и ингибитор GSK3, и необязательно не содержащей ингибитор рецептора TGF $\beta$ /ALK, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, из мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток; (iii) приведение в контакт мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокины, выбранные из группы, состоящей из bFGF, VEGF, SCF, IGF, EPO, IL6 и IL11; ингибитор ROCK и необязательно активатор пути Wnt, и необязательно не содержащей ингибитор рецептора TGF $\beta$ /ALK, для инициации дифференцировки и размножения дефинитивного гемогенного эндотелия, происходящего из плюрипотентных стволовых клеток, из мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE; и необязательно подвержение засеянных плюрипотентных стволовых клеток, мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток и/или дефинитивного гемогенного эндотелия воздействию низкого давления кислорода, составляющего от приблизительно 2% до приблизительно 10%. В некоторых вариантах осуществления указанный выше способ получения дефинитивного гемогенного эндотелия, происходящего из плюрипотентных стволовых клеток, дополнительно включает приведение в контакт iPSC с композицией, содержащей ингибитор MEK, ингибитор GSK3 и ингибитор ROCK, но не содержащей ингибиторов рецептора TGF $\beta$ /ALK, для посева и размножения iPSC; и/или где iPSC представляют собой наивные iPSC. В некоторых вариантах осуществления iPSC содержит один или несколько генетических импринтов, и где один или несколько генетических импринтов, содержащихся в iPSC, сохраняются в происходящих и дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток гемопоэтических клетках дефинитивного гемогенного эндотелия. В некоторых вариантах осуществления указанный выше способ дифференцировки iPSC в клетки дефинитивного гемогенного эндотелия происходит без образования эмбрионных тел и осуществляется в формате монослойного культивирования.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения мультипотентных предшественников гемопоэтической линии дифференцировки, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, включающий (i) приведение в контакт iPSC с композицией, содержащей активатор BMP и необязательно bFGF, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, из iPSC; (ii) приведение в контакт мезодермальных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, с композицией, содержащей активатор BMP, bFGF и ингибитор GSK3, но при этом в композиции отсутствует ингибитор рецептора TGF $\beta$ /ALK, для инициации дифференцировки и размножения мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, из мезодермальных клеток; (iii) приведение в контакт мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, с композицией, содержащей ингибитор ROCK; один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из bFGF, VEGF, SCF, IGF, EPO, IL6 и IL11; и необязательно активатор пути Wnt, где в композиции отсутствует ингибитор рецептора TGF $\beta$ /ALK, для инициации дифференцировки и размножения дефинитивного гемогенного эндотелия из мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE; (iv) приведение в контакт дефинитивного гемогенного эндотелия с композицией, содержащей активатор BMP, ингибитор ROCK; один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из TPO, IL3, GM-CSF, EPO, bFGF, VEGF, SCF, IL6, Flt3L и IL11, для инициации дифференцировки дефинитивного гемогенного эндотелия в пре-HSC; и (v) приведение в контакт пре-HSC с композицией, содержащей активатор BMP, один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из TPO, IL3, GM-CSF, EPO, bFGF, VEGF, SCF, IL6 и IL11, но не содержащей ингибитор ROCK, для инициации дифференцировки пре-HSC в мультипотентные предшественники гемопоэтической линии дифференцировки; и необязательно подвержение засеянных плюрипотентных стволовых клеток, мезодермальных клеток и/или дефинитивного гемогенного эндотелия воздействию низкого давления кислорода, составляющего от приблизительно 2% до приблизительно 10%. В некоторых вариантах осуществления указанный выше способ получения мультипотентных предшественников гемопоэтической линии дифференцировки, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, дополнительно включает приведение в контакт плюрипотентных стволовых клеток с композицией, содержащей ингибитор MEK, ингибитор GSK3 и ингибитор ROCK, но не содержащей ингибиторов рецептора TGF $\beta$ /ALK, для посева и размножения плюрипотентных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки представляют собой iPSC. В некоторых вариантах

осуществления iPSC представляют собой наивные iPSC. В некоторых вариантах осуществления iPSC содержит один или несколько генетических импринтов, и где один или несколько генетических импринтов, содержащихся в iPSC, сохраняются в происходящих и дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток мультипотентных предшественниках гемопоэтической линии дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток в мультипотентные предшественники гемопоэтической линии дифференцировки с использованием указанного выше способа происходит без образования эмбрионных тел и осуществляется в формате монослойного культивирования. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая одну или несколько клеточных популяций, полученных из платформы культивирования, описанной в данном документе: происходящие из плюрипотентных стволовых клеток (i) CD34+ дефинитивный гемогенный эндотелий (iCD34), где iCD34-клетки обладают способностью дифференцироваться в мультипотентные клетки-предшественники Т-клеток, клетки-предшественники NK-клеток, Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки и В-клетки, и где iCD34-клетки являются CD34+CD43-; (ii) дефинитивный гемогенный эндотелий (iHE), где iHE-клетки являются CD34+, и имеют по меньшей мере одну характеристику из CD43-, CD93-, CXCR4-, CD73- и CXCR4-CD73-; (iii) дефинитивные HSC, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, где iHSC является CD34+CD45+; (iv) мультипотентные гемопоэтические клетки-предшественники, где iMPP-клетки являются CD34+CD45+; (v) клетки-предшественники Т-клеток, где клетки-предшественники Т-клеток являются CD34+CD45+CD7+ или CD34-CD45+CD7+; (vi) Т-клетки, где Т-клетки являются CD45+CD3+CD4+ или CD45+CD3+CD8+; (vii) клетки-предшественники NK-клеток, где клетки-предшественники NK-клеток являются CD45+CD56+CD7+; (viii) NK-клетки, где NK-клетки являются CD3-CD45+CD56+, и необязательно дополнительно определяются как NKp46+, CD57+ и CD16+; (ix) NKT-клетки, где NKT-клетки являются CD45+Va24Ja18+CD3+; и (x) В-клетки, где В-клетки являются CD45+CD19+. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены одна или несколько клеточных линий или клональные клетки, полученные с помощью способа, описанного в данном документе: происходящие из плюрипотентных стволовых клеток (i) CD34+ дефинитивный гемогенный эндотелий (iCD34), где iCD34-клетки обладают способностью дифференцироваться в мультипотентные клетки-предшественники, клетки-предшественники Т-клеток, клетки-предшественники NK-клеток, Т-клетки, NK-клетки и NKT-клетки, и где iCD34-клетки являются CD34+CD43-; (ii) дефинитивный гемогенный эндотелий (iHE), где клеточная линия или клональные клетки iHE являются CD34+, и имеют по меньшей мере одну характеристику из CD43-, CD93-, CXCR4-, CD73- и CXCR4-CD73-; (iii) дефинитивные HSC, где iHSC является CD34+CD45+; (iv) мультипотентные гемопоэтические клетки-предшественники (iMPP), где iMPP-клетки являются CD34+CD45+; (v) клетки-предшественники Т-клеток, где клетки-предшественники Т-клеток являются CD34+CD45+CD7+ или CD34-CD45+CD7+; (vi) Т-клетки, где Т-клетки являются CD45+CD3+CD4+ или CD45+CD3+CD8+; (vii) клетки-предшественники NK-клеток, где клетки-предшественники NK-клеток являются CD45+CD56+CD7+; (viii) NK-клетки, где NK-клетки являются CD3-CD45+CD56+, и необязательно дополнительно определяются как NKp46+, CD57+ и CD16+; (ix) NKT-клетки, где NKT-клетки являются CD45+Va24Ja18+CD3+; и (x) В-клетки, где В-клетки являются CD45+CD19+.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ стимуляции гемопоэтического самообновления, восстановления или приживления с использованием одного или более из клеточных популяций, клеточных линий или клональных клеток, полученных с использованием способов, описанных в данном документе: происходящие из плюрипотентных стволовых клеток (i) CD34+ дефинитивный гемогенный эндотелий (iCD34), где iCD34-клетки обладают способностью дифференцироваться в мультипотентные клетки-предшественники, клетки-предшественники Т-клеток, клетки-предшественники NK-клеток, Т-клетки, NK-клетки и NKT-клетки, и где iCD34-клетки являются CD34+CD43-; (ii) дефинитивный гемогенный эндотелий (iHE), где клеточная линия или клональные клетки iHE являются CD34+, и имеют по меньшей мере одну характеристику из CD43-, CD93-, CXCR4-, CD73- и CXCR4-CD73-; (iii) дефинитивные HSC, где iHSC являются CD34+CD45+; (iv) мультипотентные гемопоэтические клетки-предшественники, где iMPP-клетки являются CD34+CD45+; (v) клетки-предшественники Т-клеток, где клетки-предшественники Т-клеток являются CD34+CD45+CD7+ или CD34-CD45+CD7+; (vi) Т-клетки, где Т-клетки являются CD45+CD3+CD4+ или CD45+CD3+CD8+; (vii) клетки-предшественники NK-клеток, где клетки-предшественники NK-клеток являются CD45+CD56+CD7+; (viii) NK-клетки, где NK-клетки являются CD3-CD45+CD56+, и необязательно дополнительно определяются как NKp46+, CD57+ и CD16+; (ix) NKT-клетки, где NKT-клетки являются CD45+Va24Ja18+CD3+; и (x) В-клетки, где В-клетки являются CD45+CD19+. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения клеток гемопоэтической линии дифференцировки с улучшенными терапевтическими свойствами, и данный способ включает получение iPSC, содержащих один или несколько генетических импринтов; и направление дифференцировки iPSC на клетки гемопоэтической линии дифференцировки. Стадия направленной дифференцировки дополнительно включает (i) приведение в контакт плюрипотентных стволовых клеток с композицией, содержащей активатор пути BMP и необязательно bFGF, для получения мезодермальных клеток; (ii) при-

ведение в контакт мезодермальных клеток с композицией, содержащей активатор пути BMP, bFGF и активатор пути WNT, для получения мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный гемогенный эндотелий (HE), где мезодермальные клетки, обладающие потенциалом превращения в дефинитивный гемогенный эндотелий (HE), способны обеспечивать образование клеток гемопоэтической линии дифференцировки. Предпочтительно мезодермальные клетки и мезодермальные клетки, обладающие потенциалом превращения в дефинитивный HE, получают на стадиях (i) и (ii) без стадии образования эмбрионидных тел, и полученные клетки гемопоэтической линии дифференцировки включают клетки дефинитивного гемогенного эндотелия, гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSC), гемопоэтические мультипотентные клетки-предшественники (MPP), клетки-предшественники пре-Т-клеток, клетки-предшественники пре-NK-клеток, клетки-предшественники Т-клеток, клетки-предшественники NK-клеток, Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки или В-клетки. Более того, клетки гемопоэтической линии дифференцировки сохраняют генетические импринты, содержащиеся в iPSC, для направленной дифференцировки.

В некоторых вариантах осуществления стадия направленной дифференцировки указанного выше способа дополнительно включает (i) приведение мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, в контакт с композицией, содержащей bFGF и ингибитор ROCK, для получения клеток дефинитивного HE; (ii) приведение клеток дефинитивного HE в контакт с композицией, содержащей активатор BMP, необязательно ингибитор ROCK и один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из TPO, IL3, GM-CSF, EPO, bFGF, VEGF, SCF, IL6, Flt3L и IL11, для получения гемопоэтических мультипотентных клеток-предшественников (MPP); (iii) приведение клеток дефинитивного HE в контакт с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L и IL7; и необязательно один или несколько из активатора BMP, ингибитора ROCK, TPO, VEGF и bFGF, для получения предшественников пре-Т-клеток, предшественников Т-клеток и/или Т-клеток; или (iv) приведение клеток дефинитивного HE в контакт с композицией, содержащей один или несколько факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L, TPO, IL7 и IL15; и необязательно один или несколько из активатора BMP, ингибитора ROCK, VEGF и bFGF, для получения предшественников пре-NK-клеток, предшественников NK-клеток и/или NK-клеток. Вкратце, способ может включать репрограммирование зрелой исходной Т- или В-клетки для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC); и обнаружение присутствия, в iPSC или происходящих из них клетках гемопоэтической линии дифференцировки, определенной рекомбинации V(D)J, которая является такой же, как и та, которая содержится в зрелой Т-клетке для получения iPSC. В некоторых вариантах осуществления указанный выше способ дополнительно включает выделение iPSC или клеток гемопоэтической линии дифференцировки, содержащих такую же рекомбинацию V(D)J, что и в зрелых исходных Т- или В-клетках. В некоторых вариантах осуществления указанный выше способ включает, до репрограммирования исходных клеток, получение зрелой исходной Т- или В-клетки для репрограммирования; и определение рекомбинации V(D)J, содержащейся в иммуноглобулинах (Ig) или Т-клеточных рецепторах (TCR), которая является специфической для зрелой исходной Т- или В-клетки.

"Фактор плюрипотентности" или "фактор репрограммирования" относится к средству, способному увеличивать способность клетки к развитию, либо отдельно, либо в комбинации с другими средствами. Факторы плюрипотентности включают без ограничения полинуклеотиды, полипептиды и малые молекулы, способные увеличивать способность клетки к развитию. Иллюстративные факторы плюрипотентности включают, например, факторы транскрипции и низкомолекулярные средства репрограммирования.

Было показано, что ряд различных типов клеток из всех трех зародышевых листков является подходящим для репрограммирования соматических клеток, включая без ограничения клетки печени и желудка (Aoi et al., 2008); панкреатические  $\beta$ -клетки (Stadtfield et al., 2008); зрелые В-лимфоциты (Hanna et al., 2008); фибробласты кожи человека (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Lowry et al., 2008; Aasen et al., 2008); менингоциты (Qin et al., 2008); нервные стволовые клетки (DiStefano et al., 2008); и нервные клетки-предшественники (Eminli et al., 2008). Таким образом, в настоящем изобретении частично рассматриваются способы репрограммирования и/или программирования клеток из любой линии дифференцировки клеток. В настоящем изобретении частично рассматривается изменение активности клетки путем приведения клетки в контакт с одним или несколькими репрессорами и/или активаторами для модуляции эпигенетического состояния, структуры хроматина, транскрипции, сплайсинга мРНК, посттранскрипционной модификации, стабильности и/или периода полужизни мРНК, трансляции, посттранскрипционной модификации, стабильности, и/или периода полужизни, и/или активности белка компонента клеточного пути, связанного с определением или влиянием на активность клеток. Таким образом, в различных вариантах осуществления в настоящем изобретении используются предсказуемые и строго контролируемые способы экспрессии генов, как обсуждается в другом месте в данном документе, которые обеспечивают возможность репрограммирования или дедифференцировки, а также программирования или дифференцировки соматических клеток *ex vivo* или *in vivo*. Как отмечалось выше, преднамеренная генная инженерия клеток, однако, не является предпочтительной, поскольку она изменяет клеточный геном и, вероятно, приведет к генетическим или эпигенетическим аномалиям. Напротив, композиции и способы по на-

стоящему изобретению предусматривают репрессоры и/или активаторы, которые негенетическим образом изменяют активность клетки, имитируя эндогенные пути способности к развитию клетки для достижения репрограммирования и/или прогаммирования клетки.

#### Малые молекулы в репрограммировании

Репрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки также было достигнуто с помощью ретровирусного инфицирования определенных генов (например, Oct-3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc и Lin28 и т.п.) в комбинации с малыми молекулами.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ изменения активности клетки, который включает приведение клетки в контакт с одним или несколькими репрессорами и/или активаторами или композицией, содержащей их, где указанные один или несколько репрессоров и/или активаторов модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути, связанного с активностью клетки, тем самым изменяя активность клетки. В конкретных вариантах осуществления один или несколько репрессоров и/или активаторов модулируют один или несколько компонентов клеточного пути, связанного с активностью клетки, тем самым изменяя активность клетки. В определенных вариантах осуществления один или несколько репрессоров и/или активаторов модулируют один или несколько компонентов одного или нескольких клеточных путей, связанных с активностью клетки, тем самым изменяя активность клетки. В определенных связанных вариантах осуществления модуляция компонента(компонентов) является синергической и увеличивает общую эффективность изменения активности клетки. Активность клетки может быть изменена по сравнению с основным состоянием активности до более активного состояния (например, от дифференцированной клетки к мультипотентной, плюрипотентной или тотипотентной клетке) или до менее активного состояния (например, от тотипотентной, плюрипотентной или мультипотентной клетки к дифференцированной соматической клетке). В еще других вариантах осуществления активность клетки может быть изменена более одного раза. Например, клетка может быть сначала репрограммирована до более активного состояния, а затем запрограммирована на конкретную соматическую клетку.

В другом варианте осуществления в способах настоящего изобретения предусмотрено повышение активности клетки, где клетка репрограммируется или дедифференцируется до тотипотентного состояния, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей один или несколько репрессоров и/или активаторов, где один или несколько репрессоров и/или активаторов модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути, связанного с тотипотентностью клетки, тем самым повышая активность клетки до тотипотентного состояния. В конкретном варианте осуществления способ повышения активности клетки до плюрипотентного состояния включает приведение клетки в контакт с одним или несколькими репрессорами и/или активаторами, где один или несколько репрессоров и/или активаторов модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути, связанного с активностью клетки, тем самым повышая активность клетки до плюрипотентного состояния.

В конкретном варианте осуществления способ повышения эффективности клетки до мультипотентного состояния включает приведение клетки в контакт с одним или несколькими репрессорами и/или активаторами, где один или несколько репрессоров и/или активаторов модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути, связанного с активностью клетки, тем самым повышая активность клетки до мультипотентного состояния.

В определенных вариантах осуществления способ повышения активности клетки дополнительно включает стадию приведения тотипотентной клетки, плюрипотентной клетки или мультипотентной клетки в контакт со второй композицией, где вторая композиция модулирует по меньшей мере один компонент пути клеточной активности, для уменьшения тотипотентности, плюрипотентности или мультипотентности клетки и дифференцировки клетки в зрелую соматическую клетку. В другом связанном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ репрограммирования клетки, который включает приведение клетки в контакт с композицией, включающей один или несколько репрессоров и/или активаторов, где один или несколько репрессоров и/или активаторов модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути или клеточных путей, связанных с репрограммированием клетки, тем самым репрограммируя клетку. В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ дедифференцировки клетки до более активного состояния, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей один или несколько активаторов, где один или несколько репрессоров и/или активаторов модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути или клеточных путей, связанных с дедифференцировкой клетки, тем самым дедифференцируя клетку до активного состояния.

В соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения репрессор может представлять собой антитело или фрагмент антитела, интрацелло, трансантитело, дезоксирибозим, ssRNA, dsRNA, мРНК, антисмысловую РНК, рибозим, антисмысловый олигонуклеотид, pri-miRNA, shRNA, антагомид, аптамеры, siRNA, dsDNA, ssDNA; пептид или его активный фрагмент, пептидомиметик, пептоид или малую органическую молекулу. Репрессоры на основе полипептидов включают без ограничения слитые полипептиды. Репрессоры на основе полипептидов также включают репрессоры транскрипции, которые дополнительно могут представлять собой слитые полипептиды и/или искусственно

сконструированные репрессоры транскрипции, как описано в другом месте в данном документе.

Согласно другим различным вариантам осуществления активатор может представлять собой анти-тело или фрагмент антитела, мРНК, бифункциональный антисмысловой олигонуклеотид, dsDNA, полипептид или его активный фрагмент, пептидомиметик, пептоид или малую органическую молекулу. В некоторых вариантах осуществления репрессоры модулируют по меньшей мере один компонент пути клеточной активности посредством а) репрессии по меньшей мере одного компонента; б) дерепрессии репрессора по меньшей мере одного компонента; или с) репрессии активатора по меньшей мере одного компонента. В родственных вариантах осуществления один или несколько репрессоров могут модулировать по меньшей мере один компонент пути, связанного с активностью клетки, посредством а) дерепрессии по меньшей мере одного компонента; б) репрессии репрессора по меньшей мере одного компонента; или с) дерепрессии активатора по меньшей мере одного компонента.

В определенных вариантах осуществления один или несколько репрессоров модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути, связанного с активностью клетки, посредством а) репрессии гистонметилтрансферазы или репрессии эпигенетического состояния, структуры хроматина, транскрипции, сплайсинга мРНК, посттранскрипционной модификации, стабильности и/или периода полужизни мРНК, трансляции, посттрансляционной модификации, стабильности, и/или периода полужизни, и/или активности белка по меньшей мере одного компонента; или б) дерепрессии деметилазы или активации эпигенетического состояния, структуры хроматина, транскрипции, сплайсинга мРНК, посттранскрипционной модификации, стабильности и/или периода полужизни мРНК, трансляции, посттрансляционной модификации, стабильности, и/или периода полужизни, и/или активности белка по меньшей мере одного компонента. В родственных вариантах осуществления активаторы модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути, связанного с активностью клетки, посредством а) активации по меньшей мере одного компонента; б) активации репрессора репрессора по меньшей мере одного компонента; или с) активации активатора по меньшей мере одного компонента.

В определенных вариантах осуществления один или несколько активаторов модулируют по меньшей мере один компонент посредством а) активации гистондеметидазы или активации эпигенетического состояния, структуры хроматина, транскрипции, сплайсинга мРНК, посттранскрипционной модификации, стабильности и/или периода полужизни мРНК, трансляции, посттрансляционной модификации, стабильности, и/или периода полужизни, и/или активности белка по меньшей мере одного компонента; или б) активации репрессора гистонметилтрансферазы или активации репрессора эпигенетического состояния, структуры хроматина, транскрипции, сплайсинга мРНК, посттранскрипционной модификации, стабильности и/или периода полужизни мРНК, трансляции, посттрансляционной модификации, стабильности, и/или периода полужизни, и/или активности белка по меньшей мере одного компонента.

В различных других вариантах осуществления в настоящем изобретении частично рассматривается способ репрограммирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с одним или несколькими репрессорами, где один или несколько репрессоров модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути, связанного с репрограммированием клетки, тем самым репрограммируя клетку. В различных других вариантах осуществления в настоящем изобретении частично рассматривается способ репрограммирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с одним или несколькими активаторами, где один или несколько активаторов модулируют по меньшей мере один компонент клеточного пути, связанного с репрограммированием клетки, тем самым репрограммируя клетку.

Хотя в данном документе предусмотрены некоторые иллюстративные способы репрограммирования/дифференцировки НК-клеток, они являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Дополнительные подходящие способы репрограммирования/дифференцировки НК-клеток будут очевидны специалистам в данной области техники на основе настоящего изобретения с учетом знаний в данной области техники.

Способы культивирования НК-клеток на питающих слоях или с питающими клетками подробно описаны, например, в EP 3184109 Valamehr et al. ("Valamehr"), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В целом, любой тип популяции НК-клеток можно культивировать с использованием различных способов и устройств. Выбор аппарата для культивирования обычно основывается на масштабе и назначении культуры. Увеличение масштаба культуры клеток предпочтительно включает использование специальных устройств. Аппарат для крупномасштабного получения НК-клеток клинического уровня подробно описан, например, в Spanholtz et al. (PLoS ONE 2010;5:e9221) и Sutlu et al. (Cytotherapy 2010, Early Online 1-12).

Описанные выше способы культивирования популяций НК-клеток ex vivo могут привести, помимо прочего, к получению культивированной популяции НК-клеток.

#### Типы редактирования

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены сложные стратегии редактирования и полученные в результате НК-клетки, имеющие сложные геномные изменения, которые обеспечивают возможность получения передовых продуктов на основе НК-клеток для клинических применений, например, для терапевтических подходов в иммуноонкологии. В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки, предусмотренные в данном документе, могут служить в качестве готового

к использованию клинического решения для пациентов, имеющих или которым диагностировали гиперпролиферативное заболевание, такое как, например, рак. В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки демонстрируют повышенные выживаемость, пролиферацию, уровень ответа НК-клеток, продолжительность ответа НК-клеток, устойчивость к истощению НК-клеток и/или распознавание мишени по сравнению с немодифицированными НК-клетками. Например, модифицированные НК-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии представляющего интерес химерного антигенного рецептора (CAR), например, CAR, нацеленного на мезотелин, EGFR, HER2 и/или MICA/B; возможной экспрессии варианта CD16, например, hnCD16; экспрессии продукта слияния IL15/IL15RA; потере функции рецептора 2 TGF-бета (TGFbetaR2); и/или экспрессии доминантно-негативного варианта TGFbetaR2; потере функции ADORA2A; потере функции B2M; экспрессии HLA-G; потере функции SIPA; потере функции PD1; потере функции TIGIT; и/или потере функции CISH; или к любой комбинации двух или более из них в модифицированной НК-клетке.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии экзогенного варианта CD16, например, hnCD16, экспрессии экзогенного продукта слияния IL15/IL15RA, экспрессии экзогенного HLA-G, экспрессии экзогенного DN-TGFbetaR2, потере функции в TGFbetaR2, потере функции в B2M, потере функции PD1, потере функции TIGIT и/или потере функции ADORA2A. В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии экзогенного варианта CD16, например, hnCD16, экспрессии экзогенного продукта слияния IL15/IL15RA, экспрессии экзогенного HLA-G, экспрессии экзогенного DN-TGFbetaR2, экспрессии растворимого MICA и/или MICB, потере функции в TGFbetaR2, потере функции в B2M, потере функции PD1, потере функции TIGIT и/или потере функции ADORA2A.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии экзогенного варианта CD16, например, hnCD16, экспрессии экзогенного продукта слияния IL15/IL15RA, экспрессии экзогенного HLA-G, экспрессии экзогенного DN-TGFbetaR2, экспрессии растворимого MICA и/или MICB, экспрессии экзогенного IL-12, экспрессии экзогенного IL-18, потере функции в TGFbetaR2, потере функции в B2M, потере функции PD1, потере функции TIGIT и/или потере функции ADORA2A.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные НК-клетки, предусмотренные в данном документе, могут содержать геномные изменения, которые приводят к экспрессии экзогенного варианта CD16, например, hnCD16, экспрессии экзогенного продукта слияния IL15/IL15RA, экспрессии экзогенного HLA-G, экспрессии экзогенного DN-TGFbetaR2, экспрессии экзогенного IL-12, экспрессии экзогенного IL-18, потере функции в TGFbetaR2, потере функции в B2M, потере функции PD1, потере функции TIGIT и/или потере функции ADORA2A. Модифицированные НК-клетки могут демонстрировать одно или несколько изменений в своем геноме, которые приводят к потере функции гена-мишени, и/или одну или несколько модификаций, которые приводят к приобретению функции или сверхэкспрессии продукта гена, например, белка, из экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты, например, из экспрессионной конструкции, содержащей cDNA, кодирующую продукт гена, который интегрирован в геном модифицированной НК-клетки или обеспечивается внехромосомным образом, например, в виде эписомальной экспрессионной конструкции.

Потеря функции гена-мишени характеризуется снижением экспрессии гена-мишени на основе геномной модификации, например, опосредованного РНК-направляемой нуклеазой разреза гена-мишени, который приводит к инактивации или снижению экспрессии или функции кодируемого продукта гена. Приобретение функции продукта гена характеризуется повышенной экспрессией (также называемой в данном документе сверхэкспрессией) продукта гена, например, белка, в клетке, что может включать, например, повышенный уровень экспрессии продукта гена или экспрессию продукта гена в клетке, которая не экспрессирует продукт гена эндогенно, например, из эндогенного гена. В некоторых вариантах осуществления повышенная экспрессия продукта гена достигается путем введения экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты, которая кодирует продукт гена, в клетку, например, экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит cDNA, кодирующую продукт гена, под контролем гетерологического промотора. В некоторых вариантах осуществления экзогенная конструкция нуклеиновой кислоты интегрируется в конкретный локус, например, посредством HDR-опосредованного редактирования генов, как более подробно описано в другом месте в данном документе. Способы достижения изменения с потерей функции, а также способы достижения повышенной экспрессии продуктов генов, например, с помощью технологии РНК-направляемых нуклеаз, хорошо известны специалистам в данной области техники.

Некоторые иллюстративные продукты генов, один или несколько из которых могут быть сверхэкспрессированы в модифицированных НК-клетках, предусмотренных в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, представлены в табл. 10 ниже.



Таблица 10

Химерный антигенный рецептор CAR (например, связывающийся с Her2, EGFR, рецептором фолиевой кислоты альфа, CEA, cMET, MUC1, мезотелином, ROR1 или другими мишенями).
CD16 или вариант CD16 (например, hnCD16)
IL-15/IL-15R/IL-15RA
IL-12/IL-12R/IL-12RA
IL-2/IL-2R/IL-2RA
HLA-G
HLA-E
CD47
CXCR1
CX3CR1
mTRAIL
TOSO

Некоторые иллюстративные гены-мишени, один или несколько из которых модифицированы для демонстрации потери функции в модифицированных НК-клетках, предусмотренных в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, представлены в табл. 11 ниже.

Таблица 11

TGF $\beta$ R2
ADORA2A
TIGIT
B2M
PD-1
CISH
СИТА
Гены альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II, например, HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-DQA2 и/или HLA-DOA

Гены бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II, например, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DQB2, HLA-DQB3, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 и/или HLA-DRB5
CD32B (FCGR2B)
CTLA4
NKG2A
BIM
CBLB
CCR5
CCR7
CD96
CDK8
CXCR3
EP4 (рецептор PGE2)
Fas
GITR
IL1R8
KIRDL1
KIR2DL1-3
LAG3
Гены SOCS
Сортилин
TIM3
TRAC
NLRC5

Настоящее изобретение охватывает модифицированные NK-клетки, демонстрирующие любые изменения и/или повышенную экспрессию продуктов генов, перечисленных в табл. 7 и табл. 8 вместе, а также любую комбинацию таких изменений и/или повышенной экспрессии продуктов генов, перечисленных в этих таблицах. Например, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает варианты осуществления, в которых предусмотрены модифицированные NK-клетки, которые включают одно изменение, перечисленное в табл. 10 или табл. 11, например, потерю функции ADORA2A, или потерю функции B2M, или повышенную экспрессию HLA-G и т.д. Следует понимать, что настоящее изобретение охватывает варианты осуществления, в которых предусмотрены модифицированные NK-клетки, которые включают одно изменение, перечисленное в табл. 11, и повышенную экспрессию продукта гена, перечисленного в табл. 10, например, потерю функции ADORA2A или потерю функции B2M; и повышенную экспрессию HLA-G. Кроме того, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает варианты осуществления, в которых предусмотрены модифицированные NK-клетки, которые включают два или более изменения, перечисленных в табл. 11, и повышенную экспрессию одного продукта гена, перечисленного в табл. 10. Кроме того, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает варианты осуществления, в которых предусмотрены модифицированные NK-клетки, которые включают одно изменение, перечисленное в табл. 11, и повышенную экспрессию двух или более продуктов генов, перечисленных в табл. 10. Кроме того, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает варианты осуществления, в которых предусмотрены модифицированные NK-клетки, которые включают два или более изменений, перечисленных в табл. 11, и повышенную экспрессию двух или более продуктов генов, перечисленных в табл. 10.

Чтобы проиллюстрировать некоторые из конфигураций модифицированных NK-клеток, охватываемых настоящим изобретением, ниже и в других местах в данном документе предусмотрены некоторые иллюстративные неограничивающие варианты осуществления. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены модифицированные NK-клетки, которые демонстрируют потерю функции ADORA2A. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены модифицированные NK-клетки, ко-



## Химерные антигенные рецепторы (CAR)

Используемый в данном документе термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" относится к рецепторному белку, который был модифицирован для придания клеткам, экспрессирующим CAR, новой способности нацеливаться на конкретный белок. В контексте настоящего изобретения NK-клетка, модифицированная для включения CAR, может использоваться в иммунотерапии для нацеливания и разрушения клеток, связанных с заболеванием или нарушением, например, раковых клеток.

Представляющие интерес CAR включают без ограничения CAR, нацеленный на мезотелин, EGFR, HER2 и/или MICA/B. На сегодняшний день терапия T-клетками с CAR, нацеленная на мезотелин, продемонстрировала первые доказательства эффективности в клинических испытаниях фазы I с участием субъектов, имеющих мезотелиому, немелкоклеточный рак легких и рак молочной железы (NCT02414269). Аналогично, CAR, нацеленные на EGFR, HER2 и MICA/B, продемонстрировали многообещающие результаты в ранних исследованиях (см., например, Li et al. (2018), *Cell Death & Disease*, 9(177); Han et al. (2018) *Am. J. Cancer Res.*, 8(1): 106-119 и Demoulin 2017 *Future Oncology*, 13(8)); полное содержание каждой из которых явным образом включено в данный документ посредством ссылки).

CAR хорошо известны специалистам средней квалификации в данной области техники и включают CAR, которые описаны, например, в: WO13/063419 (мезотелин), WO15/164594 (EGFR), WO13/063419 (HER2), WO16/154585 (MICA и MICB), полное содержание каждой из которых явным образом включено в данный документ посредством ссылки. Любой подходящий CAR, NK-CAR или другая связывающая структура, которая нацелена на клетку, например NK-клетку, на клетку-мишень, например клетку, связанную с заболеванием или нарушением, может экспрессироваться в модифицированных NK-клетках, предусмотренных в данном документе. Иллюстративные CAR и связывающие структуры включают без ограничения CAR и связывающие структуры, которые связывают BCMA, CD19, CD22, CD20, CD33, CD123, андрогенный рецептор, PSMA, PSCA, Muc1, вирусные пептиды HPV (т.е. E7), вирусные пептиды EBV, CD70, WT1, SEA, EGFRvIII, IL13R $\alpha$ 2 и GD2, CA125, CD7, EpCAM, Muc16, CD30. Дополнительные подходящие CAR и связывающие структуры в модифицированных NK-клетках, предусмотренных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники на основе настоящего изобретения и общеизвестных знаний в данной области. Такие дополнительные подходящие CAR включают CAR, описанные на фиг. 3 из Davies and Maher, *Adoptive T-cell Immunotherapy of Cancer Using Chimeric Antigen Receptor-Grafted T Cells*, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 58(3): 165-78 (2010), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Модифицированные NK-клетки, предусмотренные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления могут содержать CAR и вариант CD16, например, hnCD16 или CAR, и не содержать вариант CD16. Любая клетка, экспрессирующая CD16 или его вариант, может быть подходящей для комбинированной терапии с моноклональным антителом, например, моноклональным антителом, применяемым в терапии рака, или с Fc-слитым белком, нацеленным на патологические клетки.

## Нокины и нокауты

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка может экспрессировать один или несколько из экзогенного hnCD16, экзогенного IL-15, экзогенного IL-15RA, потери функции в TGFbetaR2, экзогенного DN-TGFbetaR2 и/или потери функции в ADORA2A. В еще одном варианте осуществления модифицированная клетка может характеризоваться потерей функции в B2M, экзогенном HLA-G, потерей функции в SIPA, потерей функции в PD1, потерей функции в TIGIT или потерей функции в CISH.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка может экспрессировать один или несколько из экзогенного hnCD16, экзогенного IL-15, экзогенного IL-15RA, экзогенного HLA-G, экзогенного DN-TGFbetaR2, потери функции в TGFbetaR2, потери функции в B2M, потери функции в PD1, потери функции в TIGIT и/или потери функции в ADORA2A.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка может экспрессировать один или несколько из экзогенного hnCD16, экзогенного IL-15, экзогенного IL-15RA, экзогенного HLA-G, экзогенного DN-TGFbetaR2, растворимого MICA и/или MICB, потери функции в TGFbetaR2, потери функции в B2M, потери функции в PD1, потери функции в TIGIT и/или потери функции в ADORA2A. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка может экспрессировать один или несколько из экзогенного hnCD16, экзогенного IL-15, экзогенного IL-15RA, экзогенного HLA-G, экзогенного DN-TGFbetaR2, экзогенного IL-12, экзогенного IL-18, потери функции в TGFbetaR2, потери функции в B2M, потери функции в PD1, потери функции в TIGIT и/или потери функции в ADORA2A.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка может экспрессировать один или несколько из экзогенного hnCD16, экзогенного IL-15, экзогенного IL-15RA, экзогенного HLA-G, экзогенного DN-TGFbetaR2, экзогенного IL-12, экзогенного IL-18, растворимого MICA и/или MICB, потери функции в TGFbetaR2, потери функции в B2M, потери функции в PD1, потери функции в TIGIT и/или потери функции в ADORA2A.

Используемые в данном документе термины "экспрессировать" или "экспрессия" относятся к процессу продуцирования полипептида, включая транскрипцию и трансляцию. Экспрессия может быть, например, увеличена с помощью нескольких подходов, включая: увеличение количества генов, кодирую-

щих полипептид, увеличение транскрипции гена (как например, с помощью помещения гена под контроль конститутивного промотора), увеличение трансляции гена, нокаут конкурентного гена или комбинацию этих и/или других подходов.

Используемый в данном документе термин "нокин" относится к добавлению гена-мишени в генетический локус клетки.

Используемый в данном документе термин "нокаут" относится к инактивирующей мутации в гене-мишени, где продукт гена-мишени характеризуется потерей функции.

Используемый в данном документе термин "потеря функции" относится к инактивирующей мутации в гене-мишени, где продукт гена характеризуется меньшей функцией или ее отсутствием (будучи частично или полностью инактивированным).

Используемый в данном документе термин "полная потеря функции" относится к инактивирующей мутации в гене-мишени, где продукт гена характеризуется отсутствием функции (будучи полностью инактивированным).

Используемый в данном документе термин "hnCD16a" относится к высокоаффинному нерасщепляемому варианту CD16 (низкоаффинного рецептора Fc $\gamma$ , участвующего в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)). Обычно CD16 расщепляется во время ADCC - CAR hnCD16 не подвергается этому расщеплению и, таким образом, дольше поддерживает сигнал ADCC. В некоторых вариантах осуществления hnCD16a раскрыт в Blood 2016 128:3363, полное содержание которой явным образом включено в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин "MICA/B" относится к связанным с цепью MHC белкам А класса I (MICA) и В (MICB), которые представляют собой полиморфные белки, индуцируемые при стрессе, повреждении или (злокачественной) трансформации клеток, и действуют как сигнал "уничтожь меня" через рецептор члена D группы 2 белков естественных киллеров, экспрессируемый на цитотоксических лимфоцитах. Считается, что MICA/B не экспрессируются конститутивно здоровыми нормальными клетками, но сообщалось об их экспрессии для большинства типов опухолей. Иллюстративные последовательности для MICA представлены в NG\_034139.1, а иллюстративные последовательности для MICB представлены в NG\_021405.1.

Используемый в данном документе термин "AAVSI" относится к аденоасоциированному сайту интеграции 1.

Используемый в данном документе термин "2A" относится к саморасщепляющемуся пептиду 2A.

Используемые в данном документе термины "TGF $\beta$ RII" или "TGFbetaR2" относятся к трансмембранному белку, который имеет домен протеинкиназы, образует гетеродимерный комплекс с рецептором TGF-бета типа 1 и связывает TGF-бета. Этот комплекс рецептор/лиганд фосфорилирует белки, которые затем проникают в ядро и регулируют транскрипцию генов, связанных с пролиферацией клеток, остановкой клеточного цикла, заживлением ран, иммуносупрессией и онкогенезом.

Иллюстративные последовательности TGF $\beta$ RII приведены в KR710923.1, NM\_001024847.2 и NM\_003242.5.

Используемый в данном документе термин "DN-TGF $\beta$ RII" относится к доминантно-негативному рецептору II TGF-бета (может быть экспрессирован из NK-специфического промотора). TGF $\beta$ RII играет важную роль в дифференцировке Т-клеток, и КО в iPSC будет предотвращать CD34+ дифференцировку; КО необходимо было бы осуществлять позже, но DN может быть экспрессирован из NK-специфического промотора (включался бы после CD34+ дифференцировки). В некоторых вариантах осуществления DN-TGF $\beta$ RII раскрыт в Immunity. 2000 Feb; 12(2): 171-81, полное содержание которой явным образом включено в данный документ посредством ссылки.

Стратегию, используемую опухолевыми клетками для защиты себя от эффектов TGF- $\beta$ , можно использовать для защиты опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) от ингибирующих эффектов секретлируемого опухолью TGF- $\beta$ .

Опухолеспецифические CTL, экспрессирующие доминантно-негативный рецептор II TGF-бета (например, последовательность TGF $\beta$ RIIDNR), обладают селективным функциональным преимуществом и преимуществом выживаемости по сравнению с немодифицированными CTL в присутствии опухолей, секретлирующих TGF- $\beta$  (Bollard et al., 2002 Blood. 2002 May 1; 99(9):3179-87; включенная в данный документ в ее полном объеме посредством ссылки). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению экспрессирует конструкцию DN-TGF $\beta$ RII. В некоторых вариантах осуществления конструкция DN-TGF $\beta$ RII управляется длинным промотором EF1a. В некоторых вариантах осуществления осуществляют нокин конструкции DN-TGF $\beta$ RII в локус ADORA2A с использованием gRNA S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления конструкция DN-TGF $\beta$ RII содержит последовательность TGF $\beta$ RIIDNR, сразу за которой следует последовательность 2A и дополнительно следует усеченная последовательность EGFR (EGFRt), чтобы обеспечить отслеживание клеток, которые эффективно экспрессируют данную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления конструкция DN-TGF $\beta$ RII продуцируется в виде длинной одноцепочечной молекулы ДНК В некоторых вариантах осуществления конструкция DN-TGF $\beta$ RII доставляется в клетки в RNP. В некоторых вариантах

осуществления конструкция DN-TGF $\beta$ RII доставляется в клетки с помощью доставки посредством AAV (например, посредством AAV6).

Используемый в данном документе термин "молекула адгезии нервных клеток" (NCAM), также называемая CD56, относится к гомофильному связывающему гликопротеину, экспрессируемому на поверхности нейронов, клеток глии и скелетных мышц, а также определенных клеток гемопоэтической системы. Экспрессия CD56 связана без ограничения с естественными клетками-киллерами. Иллюстративные последовательности для NCAM представлены в NM\_000615.6, NM\_181351.4, NM\_001076682.3, NM\_001242608.1 и NM\_001242607.1.

Используемый в данном документе термин "CISH" относится к цитокин-индуцируемому SH2-содержащему белку, например, см. Delconte et al., *Nat Immunol.* 2016 Jul; 17(7):816-24; включенную в данный документ в ее полном объеме посредством ссылки. Иллюстративные последовательности для CISH представлены в NG\_023194.1.

Используемый в данном документе термин "IL-15/IL15RA" или "интерлейкин-15" (IL-15) относится к цитокину со структурным сходством с интерлейкином-2 (IL-2). Подобно IL-2, IL-15 связывается с и передает сигнал через комплекс, состоящий из бета-цепи рецептора IL-2/IL-15 (CD122) и общей гамма-цепи (гамма-С, CD132). IL-15 секретируется мононуклеарными фагоцитами (и некоторыми другими клетками) после заражения вирусом(вирусами). Этот цитокин индуцирует клеточную пролиферацию естественных клеток-киллеров; клеток врожденной иммунной системы, основная роль которых заключается в уничтожении инфицированных вирусом клеток. Альфа-цепь рецептора IL-15 (IL15RA) специфически связывает IL-15 с очень высокой аффинностью и способна связывать IL-15 независимо от других субъединиц. Предполагается, что это свойство позволяет IL-15 продуцироваться одной клеткой, подвергаться эндоцитозу другой клеткой, а затем презентироваться третьей клетке. Сообщается, что IL15RA усиливает пролиферацию клеток и экспрессию ингибитора апоптоза BCL2L1/BCL2-XL и BCL2. Иллюстративные последовательности для IL-15 представлены в NG\_029605.2, а иллюстративные последовательности для IL-15RA представлены в NM\_002189.4.

IL-15 является ключевым цитокином, способствующим росту NK-клеток и поддержанию гомеостаза Т-клеток памяти. IL-15 и его рецепторная цепь IL-15Ra необходимы для выживания NK и не стимулируют регуляторные Т-клетки. IL-15/IL-15Ra связывается с бета- и гамма-субъединицами рецептора IL-2 и активирует тем самым JAK1/3 и STAT5. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению (например, NK-клетка) экспрессирует экзогенный IL-15/IL-15Ra. В некоторых вариантах осуществления экзогенный IL-15/IL-15Ra экспрессируется в виде связанного с мембраной комплекса IL15.IL15Ra, как описано в Imamura et al., *Blood.* 2014 Aug 14; 124(7): 1081-8 и Hurton LV et al., *PNAS*, 2016; включенных в данный документ в их полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления экзогенный IL-15/IL-15Ra экспрессируется в виде растворимого комплекса IL15Ra.IL15, как описано в Mortier E et al, *JBC* 2006; Bessard A, *Mol Cancer Ther* 2009 и Desbois M, *Jl* 2016; включенных в данный документ в их полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению (например, NK-клетка) экспрессирует связанный с мембраной комплекс IL15.IL15Ra и растворимый комплекс IL15Ra.IL15. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению (например, NK-клетка) экспрессирует связанную с мембраной форму комплекса IL15.IL15Ra с расщепляемым линкером. Нокаут CISH связан с дальнейшим стимулированием передачи сигналов IL-15, как описано в Delconte P, *Nat Immunol* 2016; включенной в данный документ в ее полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению (например, NK-клетка) экспрессирует потерю функции в CISH. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению (например, NK-клетка) экспрессирует экзогенный IL-15/IL-15Ra и потерю функцию в CISH.

Используемый в данном документе термин "ADORA2A" относится к аденозиновому рецептору A2A, кодирующему член суперсемейства рецепторов, связанных с белком (G-белком), связывающим гуаниновые нуклеотиды (GPCR), которое подразделяется на классы и подтипы. Рецепторы представляют собой трансмембранные белки, семь раз проходящие через мембрану, которые реагируют на внеклеточные сигналы и активируют внутриклеточные пути передачи сигналов. Этот белок, аденозиновый рецептор подтипа A2A, использует аденозин в качестве предпочтительного эндогенного агониста и предпочтительно взаимодействует с семейством G(s) и G(olf) G-белков для повышения уровней внутриклеточного cAMP. Он играет важную роль во многих биологических функциях, таких как сердечный ритм и кровообращение, церебральный и почечный кровоток, иммунная функция, регуляция боли и сон. Он участвует в патофизиологических состояниях, таких как воспалительные заболевания и нейродегенеративные нарушения. Иллюстративные последовательности ADORA2a представлены в NG\_052804.1. Используемый в данном документе термин "B2M" ( $\beta$ 2-микроглобулин) относится к белку сыворотки, обнаруживаемому в связке с тяжелой цепью главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I на поверхности почти всех ядерных клеток. Белок имеет преимущественно бета-складчатую листовую структуру, которая может образовывать амилоидные фибриллы при некоторых патологических состояниях. Закоди-

рованный противомикробный белок проявляет антибактериальную активность в околоплодных водах. Иллюстративные последовательности для B2M представлены в NG\_012920.2.

Используемый в данном документе термин "CD32B" относится к белку рецептора II-b Fc-области иммуноглобулина гамма с низкой аффинностью, который у человека кодируется геном FCGR2B. См., например, Rankin-CT et al., CD32B, the human inhibitory Fc-gamma receptor IIB, as a target for monoclonal antibody therapy of B-cell lymphoma. *Blood* 2006 108(7):2384-91, полное содержание которой явным образом включено в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин "CD47", также иногда называемый "интегрин-ассоциированным белком" (IAP), относится к трансмембранному белку, который у человека кодируется геном CD47. CD47 принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, является партнером мембранных интегринов, а также связывает лиганды тромбоспондин-1 (TSP-1) и сигнальный регуляторный белок альфа (SIRP $\alpha$ ). CD47 действует как сигнал для макрофагов, который позволяет экспрессирующим CD47 клеткам избегать атаки макрофагов. См., например, Deuse-T, et al., *Nature Biotechnology* 2019 37: 252-258, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин "HLA-E" относится к альфа-цепи E антигена гистосовместимости HLA класса I, также иногда называемой антигеном E MHC класса I. Белок HLA-E у людей кодируется геном HLA-E. HLA-E человека представляет собой неклассическую молекулу MHC класса I, которая характеризуется ограниченным полиморфизмом и более низкой экспрессией на клеточной поверхности, чем его классические паралоги. Эта молекула класса I представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи и легкой цепи (бета-2-микроглобулин). Тяжелая цепь закреплена в мембране. HLA-E связывает ограниченный набор пептидов, происходящих из лидерных пептидов других молекул класса I. Клетки, экспрессирующие HLA-E, избегают аллогенных ответов и лизиса NK-клетками. См., например, Geornaluisse-G et al., *Nature Biotechnology* 2017 35(8), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Иллюстративные последовательности белка HLA-E представлены в NM\_005516.6. В некоторых вариантах осуществления два или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или два или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II нокаутированы, например, с помощью редактирования генома, в модифицированных лимфоцитах, предусмотренных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления два или более гена альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II, выбранные из HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-DQA2 и HLA-DOA, являются нокаутированными. В качестве другого примера в некоторых вариантах осуществления два или более гена бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II, выбранные из HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DQB3, HLA-DQB2, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 и HLA-DRB5, являются нокаутированными. См., например, Crivello et al., *J Immunol* January 2019, jil800257; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800257>, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин "HLA-G" относится к неклассическим паралогам тяжелой цепи HLA класса I. Эта молекула класса I представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи и легкой цепи (бета-2-микроглобулин). Тяжелая цепь закреплена в мембране. HLA-G экспрессируется на плацентарных клетках плода. HLA-G является лигандом для ингибиторного рецептора KIR2DL4 NK-клеток, и поэтому экспрессия этого HLA трофобластом защищает его от гибели, опосредованной NK-клетками. См., например, Favier et al., *Tolerogenic Function of Dimeric Forms of HLA-G Recombinant Proteins: A Comparative Study In Vivo* PLOS One 2011, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Иллюстративная последовательность HLA-G изложена в NG029039.1. Используемый в данном документе термин "СИТА" относится к белку, расположенному в ядре, который действует как позитивный регулятор транскрипции гена главного комплекса гистосовместимости класса II и называется "главным фактором контроля" для экспрессии этих генов. Белок также связывает GTP и использует связывание GTP для облегчения своего собственного транспорта в ядро. Попадая в ядро, он не связывает ДНК, а скорее использует внутреннюю активность ацетилтрансферазы (АТ), чтобы действовать подобно коактиватору. Мутации в этом гене были связаны с синдромом "голых" лимфоцитов типа II (также известным как наследственный дефицит MHC класса II или комбинированный иммунодефицит с дефицитом HLA класса II), повышенной восприимчивостью к ревматоидному артриту, рассеянному склерозу и, возможно, инфаркту миокарда. См., например, Chang et al., *J Exp Med* 180:1367-1374 и Chang et al., *Immunity*. 1996 Feb;4(2):167-78, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. Иллюстративная последовательность СИТА изложена в NG009628.1. Используемый в данном документе термин "PD1", белок 1 запрограммированной гибели клеток, также известный как CD279 (кластер дифференцировки 279), относится к белку, обнаруживаемому на поверхности клеток, который играет роль в регуляции ответа иммунной системы на клетки организма человека, подавляя иммунную систему и способствуя самотолерантности, подавляя воспалительную активность Т-лимфоцитов. Это предупреждает аутоиммунные заболевания, но также может препятствовать уничтожению раковых клеток иммунной системой. PD-1 представляет собой контрольную точку иммунного ответа и защищает от аутоиммунных реакций с помощью двух механизмов. Во-первых, он способствует апоптозу (запрограммированной гибели клеток) антиген-специфических Т-клеток в лимфатических уз-

лах. Во-вторых, он снижает апоптоз регуляторных Т-лимфоцитов (противовоспалительных, подавляющих Т-лимфоцитов). Иллюстративные последовательности для PD1 представлены в NM\_005018.3. Используемый в данном документе термин "TIGIT" относится к члену семейства PVR (рецепторов полиовируса) белков иммуноглобулинов. Продукт этого гена экспрессируется на нескольких классах Т-клеток, включая фолликулярные В-хелперные Т-клетки (TFH). Было показано, что белок связывает PVR с высокой аффинностью; считается, что это связывание способствует взаимодействию между TFH и дендритными клетками для регулирования зависимых от Т-клеток ответов В-клеток. Иллюстративные последовательности для TIGIT представлены в NM\_173799.4. Используемый в данном документе термин "NLRC5" относится к домену CARD семейства NOD-подобных рецепторов, содержащему 5 внутриклеточных белков, который играет роль в иммунной системе. NLRC5 представляет собой рецептор распознавания образов, участвующий во врожденном иммунитете к вирусам, потенциально посредством регуляции активности интерферона. Иллюстративные последовательности для NLRC5 представлены в NM\_032206.4. Используемый в данном документе термин "CTLA4" относится к члену суперсемейства иммуноглобулинов, который передает ингибирующий сигнал Т-клеткам. Белок содержит V-домен, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост. Иллюстративные последовательности для CTLA4 представлены в AF414120.1. Используемый в данном документе термин "LAG3" относится к белку активации лимфоцитов 3, который принадлежит к суперсемейству Ig и содержит 4 внеклеточных Ig-подобных домена. Иллюстративные последовательности для LAG3 представлены в NM\_002286.6.

Используемый в данном документе термин "CBLB" относится к убиквитин-протеин-лигазе E3, которая способствует опосредованной протеасомами деградации белка с помощью переноса убиквитина с убиквитин-конъюгирующего фермента E2 на субстрат. Кодированный белок участвует в регуляции иммунного ответа путем ограничения активации рецептора Т-клеток, рецептора В-клеток и высокоаффинного рецептора иммуноглобулина-эпсилон. Иллюстративные последовательности для CBLB представлены в KR709533.1.

Используемый в данном документе термин "NKG2A" относится к белку, принадлежащему к семейству лектин-подобных рецепторов клеток-киллеров, также называемому семейством NKG2, которое представляет собой группу трансмембранных белков, предпочтительно экспрессируемых в NK-клетках. Это семейство белков характеризуется ориентацией мембран типа II и наличием лектинового домена C-типа. Этот белок образует комплекс с другим членом семейства, KLRD1/CD94, и участвует в распознавании молекул HLA-E MHC класса I в NK-клетках. См., например, Kamiya-T et al., J Clin Invest 2019, <https://doi.org/10.1172/JCI123955>, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Иллюстративные последовательности для NKG2A представлены в AF461812.1. Используемый в данном документе термин "CCR5" относится к члену семейства бета-хемокиновых рецепторов, который, как предполагается, представляет собой трансмембранный белок, семь раз проходящий через мембрану, подобный рецепторам, связанным с G-белком. Этот белок экспрессируется Т-клетками и макрофагами и, как известно, является важным корецептором макрофаготропных вирусов, включая HIV, для проникновения в клетки-хозяева. Иллюстративные последовательности для CCR5 представлены в U54994.1.

Используемый в данном документе термин "SOCS" относится к семейству генов, участвующих в ингибировании сигнального пути JAK-STAT. Используемый в данном документе термин "BIM" относится к проапоптотическому члену семейства белков BCL-2, который взаимодействует с другими членами семейства белков BCL-2, включая BCL2, BCL2L1/BCL-X(L) и MCL1, и действует как активатор апоптоза.

Используемый в данном документе термин "FAS" относится к члену суперсемейства рецепторов TNF. Этот рецептор содержит домен гибели. Было показано, что он играет центральную роль в физиологической регуляции запрограммированной гибели клеток.

Используемый в данном документе термин "GITR" относится к члену 18 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF18), также известному как индуцируемый активацией рецептор семейства TNFR (AITR) или индуцируемый глюкокортикоидами TNFR-родственный белок. Он участвует во взаимодействиях между активированными Т-лимфоцитами и эндотелиальными клетками и в регуляции гибели клеток, опосредованной Т-клеточными рецепторами.

Используемый в данном документе термин "сортилин" относится к VPS10-родственному семейству белков сортилина.

Используемый в данном документе термин "TIM3" относится к содержащему иммуноглобулиновый и муциновый домен 3 Т-клеточному (TIM-3) белку, который у человека кодируется геном HAVCR2.

Используемый в данном документе термин "CD96" или "TACTILE" относится к мембранному белку типа I, который играет роль в адгезионных взаимодействиях активированных Т- и NK-клеток во время поздней фазы иммунного ответа.

Используемый в данном документе термин "IL1R8" относится к члену семейства рецепторов интерлейкина 1 и подобен вспомогательным белкам интерлейкина 1.

Используемые в данном документе термины "KIR2DL1", "KIR2DL2" и "KIR2DL3" относятся к иммуноглобулиноподобным рецепторам клеток-киллеров (KIR), которые представляют собой трансмембранные гликопротеины, экспрессируемые естественными клетками-киллерами и субпопуляциями Т-клеток.

Используемый в данном документе термин "CDK8" относится к члену семейства циклин-



зависимых протеинкиназ (CDK), который функционирует как регулятор развития клеточного цикла.

Используемый в данном документе термин "CXCR3" относится к рецептору, связанному с G-белком, с селективностью в отношении трех хемокинов, именуемых CXCL9/Mig (индуцируемый интерфероном- $\gamma$  монокин), CXCL10/IP10 (индуцируемый интерфероном- $\gamma$  белок размером 10 кДа) и CXCL11/I-TAC (индуцируемый интерфероном  $\alpha$ -хемоаттрактант T-клеток).

Используемый в данном документе термин "CCR7" относится к члену семейства рецепторов, связанных с G-белком. Этот рецептор экспрессируется в различных лимфоидных тканях и активирует B- и T-лимфоциты.

Используемый в данном документе термин "EP4" относится к члену семейства рецепторов, связанных с G-белком. Этот белок является одним из четырех рецепторов, идентифицированных для простагландина E2 (PGE2). Этот рецептор может активировать передачу сигналов T-клеточного фактора.

Используемый в данном документе термин "IL-2" относится к интерлейкину-2, секретлируемому цитокину, который важен для пролиферации T- и B-лимфоцитов.

Используемый в данном документе термин "IL-12" относится к интерлейкину-12, цитокину, который действует на T-клетки и естественные клетки-киллеры.

Используемый в данном документе термин "IL-18" относится к интерлейкину-18, провоспалительному цитокину, который в основном участвует в иммунных ответах поляризованных T-хелперов 1 (Th1) и естественных клеток-киллеров (NK).

Используемый в данном документе термин "CXCR1" относится к члену семейства рецепторов, связанных с G-белком. Этот белок является рецептором интерлейкина 8 (IL8).

Используемый в данном документе термин "CX3CR1" относится к трансмембранному белку и хемокину, участвующим в адгезии и миграции лейкоцитов.

Используемый в данном документе термин "mTRAIL" относится к цитокину, который принадлежит к семейству лигандов фактора некроза опухоли (TNF). Этот белок преимущественно индуцирует апоптоз трансформированных и опухолевых клеток.

Используемый в данном документе термин "TOSO" относится к Fc-фрагменту рецептора IgM.

Используемый в данном документе термин "CD16" относится к рецептору Fc-части иммуноглобулина G, и он участвует в удалении комплексов антиген-антитело из кровотока, а также в других антителозависимых ответах.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены модифицированные клетки, которые демонстрируют потерю функции TRAC. Термин "TRAC" относится к альфа-субъединице (константной) T-клеточного рецептора, кодируемой локусом TRAC. Клетки, демонстрирующие потерю функции TRAC, не экспрессируют T-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены модифицированные клетки, например, плюрипотентные или мультипотентные стволовые клетки или их дифференцированные дочерние клетки (например, iNK-клетки), которые происходят из клетки, экспрессирующей TCR, или из клетки, имеющей перестроенный эндогенный локус TCR, например, из T-клетки. В некоторых вариантах осуществления такие клетки содержат модификацию, которая вызывает потерю функции TRAC и, таким образом, не экспрессируют функциональный TCR. Подходящие способы и композиции для достижения потери функции TRAC будут очевидны специалистам средней квалификации в данной области техники на основании настоящего изобретения. Такие способы и композиции включают без ограничения те, которые раскрыты в заявке PCT/US2015/026504, названной "CRISPR-CAS-related methods, compositions and components for cancer immunotherapy"; PCT-заявке PCT/US2016/024353, озаглавленной "CRISPR-CAS-related methods, compositions and components"; и заявке PCT/US2017/020598, названной "CRISPR-CPF1-related methods, compositions and components for cancer immunotherapy"; полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. Раскрытие конкретно охватывает варианты вышеуказанных генов и CAR, включая варианты, характеризующиеся по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с вышеуказанными последовательностями генов. Используемые в данном документе термины "процент (%) идентичности последовательности" или "процент (%) идентичности", также включающие "гомологию", определяются как процентная доля аминокислотных остатков или нуклеотидов в кандидатной последовательности, идентичных аминокислотным остаткам или нуклеотидам в эталонных последовательностях после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и не учитывает какие-либо консервативные замены как часть идентичности последовательности. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно осуществлять, кроме ручного способа, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита-Уотермана, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, с помощью способа поиска подобия Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444, или с помощью компьютерных программ, в которых используются эти алгоритмы (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин, США).

Нокины и нокауты могут быть достигнуты с помощью технологий редактирования генома, извест-

ных специалистам в данной области техники, и включают технологии CRISPR/Cas. Стратегии редактирования с одиночным разрезом, а также мультиплексного редактирования, подходят для достижения требуемых конфигураций продукта, предусмотренных в данном документе, и такие стратегии описаны в данном документе или иным образом известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные модифицированные клетки, например, модифицированные плюрипотентные клетки или их дифференцированное потомство, например, iNK-клетки или другие модифицированные типы лимфоцитов, оцениваются в отношении их способности избегать иммунной системы неаутологичного хозяина, например, пациента, нуждающегося в иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления такая оценка включает анализ *in vitro*. Подходящие анализы *in vitro* для таких оценок известны специалистам средней квалификации в соответствующей области и включают без ограничения анализы реакции смешанных лимфоцитов (MLR). Этот анализ и другие подходящие анализы описаны, например, в Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, 7<sup>th</sup> edition, ISBN 9781437735734, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Другие подходящие анализы будут очевидны специалисту в данной области с учетом настоящего изобретения.

#### Способы применения

Многие заболевания можно облегчить путем введения субъекту модифицированных клеток по настоящему изобретению. Примеры заболеваний включают без ограничения рак, включая без ограничения солидные опухоли, включая без ограничения опухоль головного мозга, предстательный железы, молочной железы, легкого, ободочной кишки, матки, кожи, печени, кости, поджелудочной железы, яичника, семенника, мочевого пузыря, почки, головы, шеи, желудка, шейки матки, прямой кишки, гортани или пищевода; и гематологические злокачественные новообразования, включая без ограничения острые и хронические лейкозы, лимфомы, множественную миелому и миелодиспластические синдромы. Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам лечения нуждающегося в этом субъекта с помощью введения субъекту композиции, содержащей любую из клеток, описанных в данном документе. В конкретных вариантах осуществления термины "осуществление лечения", "лечение" и т. п. используются в данном документе для обычного обозначения достижения требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим, что означает полное или частичное предупреждение заболевания, и/или может быть терапевтическим, что означает частичное или полное излечение от заболевания и/или нежелательного эффекта, обусловленного заболеванием. Используемый в данном документе термин "лечение" охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего и включает предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но его наличие еще не было диагностировано; подавление заболевания, т.е. остановку его развития; или ослабление заболевания, т.е. инициацию регрессии заболевания. Терапевтическое средство или композицию можно вводить до, во время или после начала заболевания или повреждения. Особый интерес представляет лечение продолжающегося заболевания, при котором лечение стабилизирует или уменьшает нежелательные клинические симптомы пациента.

В конкретных вариантах осуществления субъект имеет заболевание, состояние и/или повреждение, которые можно вылечить, облегчить и/или улучшить с помощью клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что субъект, нуждающийся в клеточной терапии, представляет собой субъекта с повреждением, заболеванием или состоянием, у которого клеточная терапия, например, терапия, при которой клеточный материал вводится субъекту, может вылечить, облегчить, улучшить и/или уменьшить тяжесть по меньшей мере одного симптома, связанного с повреждением, заболеванием или состоянием. В определенных вариантах осуществления предполагается, что субъект, нуждающийся в клеточной терапии, включает без ограничения кандидата на трансплантацию костного мозга или стволовых клеток, субъекта, получавшего химиотерапию или лучевую терапию, субъекта, имеющего гиперпролиферативное нарушение или рак, например, гиперпролиферативное нарушение или рак гемопоэтической системы, или у которого есть риск их развития, субъекта, имеющего опухоль, например, солидную опухоль, или у которого есть риск развития опухоли, субъекта, имеющего вирусную инфекцию или заболевание, связанное с вирусной инфекцией, или у которого есть риск их развития. Соответственно, в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие клетки гемопоэтической линии дифференцировки, происходящие из плюрипотентных клеток, полученные с помощью способов и композиций, раскрытых в данном документе, где фармацевтические композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемую среду. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит Т-клетки, происходящие из плюрипотентных клеток, полученные с помощью способов и композиций, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит NK-клетки, происходящие из плюрипотентных клеток, полученные с помощью способов и композиций, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HE-клетки CD34, происходящие из плюрипотентных клеток, полученные с помощью способов и композиций, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HSC, происходящие из плюрипотентных клеток, полученные с помощью способов и композиций, раскрытых в данном документе.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрено терапевтическое применение вышеуказанных фармацевтических композиций с помощью введения композиции субъекту, подходящему для адоптивной клеточной терапии, где субъект имеет аутоиммунное заболевание; гематологическое злокачественное новообразование; солидную опухоль или инфекцию, связанную с HIV, RSV, EBV, CMV, аденовирусом или полиомавирусом ВК.

Выделенные клетки гемопоэтической линии дифференцировки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, могут содержать по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% Т-клеток, НК-клеток, NKT-клеток, CD34+ HE-клеток или HSC. В некоторых вариантах осуществления выделенные клетки гемопоэтической линии дифференцировки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, содержат от приблизительно 95% до приблизительно 100% Т-клеток, НК-клеток, NKT-клеток, CD34+ HE-клеток или HSC. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие очищенные Т-клетки, НК-клетки, NKT-клетки, CD34+ HE-клетки или HSC, как например композиция, содержащая выделенную популяцию, содержащую приблизительно 95% Т-клеток, НК-клеток, NKT-клеток, CD34+ HE-клеток или HSC, для лечения субъекта, нуждающегося в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает выделенную популяцию клеток гемопоэтической линии дифференцировки, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, где популяция содержит менее чем приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% Т-клеток, НК-клеток, NKT-клеток, CD34+ HE-клеток или HSC, происходящих из iPSC. Выделенная популяция производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки в некоторых вариантах осуществления может содержать более чем приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% Т-клеток, НК-клеток, NKT-клеток, CD34+ HE-клеток или HSC. В других вариантах осуществления выделенная популяция производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки может содержать от приблизительно 0,1% до приблизительно 1%, от приблизительно 1% до приблизительно 3%, от приблизительно 3% до приблизительно 5%, от приблизительно 10% до приблизительно 15%, приблизительно 15-20%, приблизительно 20-25%, приблизительно 25-30%, приблизительно 30-35%, приблизительно 35-40%, приблизительно 40-45%, приблизительно 45-50%, приблизительно 60-70%, приблизительно 70-80%, приблизительно 80-90%, приблизительно 90-95% или от приблизительно 95% до приблизительно 100% Т-клеток, НК-клеток, NKT-клеток, CD34+ HE-клеток или HSC.

В конкретных вариантах осуществления производные клетки гемопоэтической линии дифференцировки могут содержать приблизительно 0,1%, приблизительно 1%, приблизительно 3%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% Т-клеток, НК-клеток, NKT-клеток, CD34+ HE-клеток или HSC. Как будет понятно специалисту средней квалификации в данной области техники, в клеточной терапии можно использовать как аутологичные, так и аллогенные иммунные клетки. Аутологичная клеточная терапия может характеризоваться сниженным инфицированием, низкой вероятностью GvHD и быстрым восстановлением иммунитета. Аллогенная клеточная терапия может характеризоваться иммуноопосредованным эффектом "трансплантат против злокачественного новообразования" (GVM) и низкой частотой рецидивов. Основываясь на конкретных состояниях пациентов или субъектов, нуждающихся в клеточной терапии, специалист средней квалификации в данной области техники сможет определить, какой конкретный тип терапии применять.

В конкретных вариантах осуществления производные клетки гемопоэтической линии дифференцировки фармацевтической композиции по настоящему изобретению являются аллогенными по отношению к субъекту. В конкретных вариантах осуществления производные клетки гемопоэтической линии дифференцировки фармацевтического состава по настоящему изобретению являются аутологичными по отношению к субъекту. Для аутологичной трансплантации выделенная популяция производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки полностью или частично соответствует HLA пациента. В другом варианте осуществления производные клетки гемопоэтической линии дифференцировки не соответствуют HLA субъекта.

Производные клетки гемопоэтической линии дифференцировки, предусмотренные в настоящем изобретении, можно вводить субъекту без размножения *ex vivo* или *in vitro* перед введением. В конкретных вариантах осуществления выделенную популяцию производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки модулируют и обрабатывают *ex vivo* с использованием одного или нескольких средств с получением иммунных клеток с улучшенным терапевтическим потенциалом. Модулированная популяция производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки может быть промыта для удаления лечебного (лечебных) средства (средств), и улучшенная популяция вводится пациенту без дополнительного размножения популяции *in vitro*.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена выделенная популяция производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки, которые размножают до модуляции выделенной популяции или субпопуляции Т-лимфоцитов с помощью одного или нескольких средств.

Выделенная популяция производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки может быть получена рекомбинантно для экспрессии TCR, CAR или других белков. Для сконструированных с помощью методов генетической инженерии производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки, которые экспрессируют рекомбинантный TCR или CAR, либо до, либо после генетической модификации клеток, клетки можно активировать и размножать с применением способов, как описано, например, в патентах США № 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041 и в публикации заявки на патент США № 20060121005.

#### Формы рака

Формы рака, которые являются подходящими терапевтическими мишенями согласно настоящему изобретению, включают раковые клетки из мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, ободочной кишки, пищевода, глаза, желудочно-кишечного тракта, десен, головы, почек, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичника, предстательной железы, кожи, желудка, семенника, языка или матки. Кроме того, рак может в частности относиться без ограничения к следующему гистологическому типу: злокачественное новообразование; карцинома; недифференцированная карцинома; гигантоклеточная карцинома и веретенноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базальноклеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходноклеточная карцинома; папиллярная переходноклеточная карцинома; аденокарцинома; злокачественная гастриннома; холангиокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; комбинированная гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденоидная кистозная карцинома; аденокарцинома при аденоматозном полипе; аденокарцинома при семейном аденоматозном полипозе; солидная карцинома; злокачественная карциноидная опухоль; бронхиолоальвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; гранулярноклеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярно-фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулирующая склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; карцинома эндометрия; карцинома придатков кожи; апокринная аденокарцинома; сальная аденокарцинома; церуминозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидно-клеточная карцинома; инфильтративная протоковая карцинома; медуллярная карцинома; лобулярная карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Педжета молочной железы; ацинарно-клеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; тимома, злокачественная; опухоль стромы яичника, злокачественная; текома, злокачественная; гранулезно-клеточная опухоль, злокачественная; андробластома, злокачественная; карцинома из клеток Сертоли; опухоль из клеток Лейдига, злокачественная; липидоклеточная опухоль, злокачественная; параганглиома, злокачественная; параганглиома вне молочной железы, злокачественная; феохромоцитомы; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; поверхность распространяющаяся меланома; злокачественная меланома в гигантском пигментном невусе; меланома из эпителиоидных клеток; голубой невус, злокачественный; саркома; фибросаркома; фиброзная гистиоцитомы, злокачественная; миксосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль, злокачественная; смешанная опухоль Мюллера; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхимомы, злокачественная; опухоль Бреннера, злокачественная; филоидная опухоль, злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома, злокачественная; дисгерминома; эмбриональная карцинома; тератома, злокачественная; струма яичника, злокачественная; хориокарцинома; мезонефрома, злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома, злокачественная; саркома Капоши; гемангиоперицитомы, злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юкстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома, злокачественная; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; одонтогенная опухоль, злокачественная; амелобластная одонтосаркома; амелобластома, злокачественная; амелобластная фибросаркома; пинеалома, злокачественная; хордома; глиома, злокачественная; эпендимома; астроцитомы; протоплазматическая астроцитомы; фибриллярная астроцитомы; астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль; саркома мозжечка; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; ольфакторная нейрогенная опухоль; менингиома, злокачественная; нейрофибросаркома; неврилеммома, злокачественная; гранулярно-клеточная опухоль, злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; лимфома Ходжкина; парагранулема; злокачественная лимфома, мелкоклеточная лимфоцитарная; злокачественная лимфома, крупноклеточная, диффузная; злокачественная лимфома, фолликулярная; грибовидный микоз; другие уточненные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; саркома тучных клеток; иммунопролиферативное заболевание тонкого кишечника; лейкоз; лимфолейкоз; лейкоз плазматических клеток; эритролейкоз; лимфосаркомно-клеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; лейкоз тучных клеток; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома и волосатоклеточный

лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак ободочной кишки. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак желудка. В другом варианте осуществления рак представляет собой RCC. В другом варианте осуществления рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления признаки солидного рака, которые можно подвергать лечению с помощью модифицированных НК-клеток, предусмотренных в данном документе, отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными методами лечения рака, включают рак мочевого пузыря, гепатоцеллюлярную карциному, рак предстательной железы, рак яичника/матки, рак поджелудочной железы, мезотелиому, меланому, глиобластому, HPV-ассоциированные и/или HPV-положительные формы рака, такие как рак шейки матки и HPV+ рак головы и шеи, рак полости рта, рак глотки, рак щитовидной железы, рак желчного пузыря и виды саркомы мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления гематологические признаки рака, которые можно лечить с помощью модифицированных НК-клеток, предусмотренных в данном документе, отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными методами лечения рака, включают: ALL, CLL, NHL, DLBCL, AML, CML, множественную миелому (MM).

Используемый в данном документе термин "рак" (также используемый взаимозаменяемо с терминами "гиперпролиферативный" и "неопластический") относится к клеткам, обладающим способностью к автономному росту, т.е. аномальному статусу или состоянию, характеризующемуся быстро пролиферирующим клеточным ростом. Раковые болезненные состояния могут быть отнесены к категории патологических, т.е. характеризующихся или составляющих болезненное состояние, например, рост злокачественной опухоли, или могут быть отнесены к категории непатологических, т.е. к отклонению от нормы, но не ассоциированное с болезненным состоянием, например, клеточная пролиферация, связанная с заживлением ран. Подразумевается, что данный термин включает все типы раковых образований или онкогенных процессов, метастатических тканей или злокачественно трансформированных клеток, тканей или органов, независимо от гистопатологического типа или стадии инвазивности. Термин "рак" включает злокачественные новообразования различных систем органов, как например, те, что поражают легкое, молочную железу, щитовидную железу, лимфоидные органы, желудочно-кишечный тракт и мочеполовые пути, а также аденокарциномы, которые включают злокачественные новообразования, такие как большинство форм рака ободочной кишки, почечно-клеточная карцинома, рак предстательной железы и/или опухоли семенников, немелкоклеточная карцинома легкого, рак тонкой кишки и рак пищевода. Термин "карцинома" известен из уровня техники и относится к злокачественным новообразованиям эпителиальных или эндокринных тканей, включая карциномы дыхательной системы, карциномы желудочно-кишечной системы, карциномы мочеполовой системы, карциномы семенников, карциномы молочной железы, карциномы предстательной железы, карциномы эндокринной системы и меланомы. Иллюстративные карциномы включают карциномы, образующиеся из ткани шейки матки, легкого, предстательной железы, молочной железы, головы и шеи, ободочной кишки и яичника. Термин "карцинома" также включает карциносаркомы, например, те, которые включают злокачественные опухоли, состоящие из карциноматозных и саркоматозных тканей. "Аденокарцинома" относится к карциноме, происходящей из железистой ткани или в которой опухолевые клетки образуют узнаваемые железистые структуры. Термин "саркома" известен из уровня техники и относится к злокачественным опухолям мезенхимального происхождения. Примеры клеточных пролиферативных нарушений и/или нарушений дифференцировки легкого включают без ограничения опухоли, такие как бронхогенная карцинома, включая паранеопластические синдромы, бронхиолоальвеолярная карцинома, нейроэндокринные опухоли, такие как бронхиальный карциноид, прочие опухоли, метастатические опухоли и плевральные опухоли, включая солитарные фиброзные опухоли (плевральная фиброма) и злокачественную мезотелиому. Примеры клеточных пролиферативных нарушений и/или нарушений дифференцировки молочной железы включают без ограничения пролиферативное заболевание молочной железы, включая, например, эпителиальную гиперплазию, склерозирующий аденоз и папилломы малых протоков; опухоли, например, стромальные опухоли, такие как фиброаденома, филоидная опухоль и саркомы, и эпителиальные опухоли, такие как папиллома крупного протока; карциному молочной железы, включая карциному *in situ* (неинвазивную), которая включает протоковую карциному *in situ* (включая болезнь Педжета) и лобулярную карциному *in situ*, а также инвазивную (инфильтративную) карциному, включая без ограничения инвазивную протоковую карциному, инвазивную лобулярную карциному, медуллярную карциному, коллоидную (муцинозную) карциному, каналцевую карциному и инвазивную папиллярную карциному, а также прочие злокачественные новообразования. Нарушения мужской молочной железы включают без ограничения гинекомастию и карциному.

Примеры клеточных пролиферативных нарушений и/или нарушений дифференцировки, затрагивающих ободочную кишку, включают без ограничения опухоли ободочной кишки, такие как неопухольевые полипы, аденомы, семейные синдромы, колоректальный канцерогенез, колоректальная карцинома и карциноидные опухоли.

Примеры форм рака или неопластических состояний, в дополнение к описанным выше, включают без ограничения фибросаркому, миосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хор-

дому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак желудка, рак пищевода, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, рак матки, рак головы и шеи, рак кожи, рак головного мозга, плоскоклеточный рак, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак семенников, мелкоклеточную карциному легкого, немелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, акустическую неврину, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластому, ретинобластому, лейкоз, лимфому или саркому Капоши.

Предполагаемые применимые вторичные или вспомогательные терапевтические средства в данном контексте включают без ограничения: химиотерапевтические средства, включая алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид CYTOXAN®; алкилсульфонаты, такие как бусульфид, импротосульфид и пипосульфид; азиридины, такие как бензодопа, карбохон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтиленфосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в частности буллатацин и буллатацион); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, нозембин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевина, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности калихеамицин гамма-II и калихеамицин омега-II (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также хромофор неокарциностаина и родственные хромофоры хромопротеиновых эндиновых антибиотиков), аклаиномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминиомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая ADRIAMYCIN®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, инъекцию липосомального доксорубицина HCl (DOXIL®) и дезоксидоксорубицина), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотионин и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестостерон; ингибиторы гормонов коры надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; добавки для восполнения фолиевой кислоты, такие как фолиевая кислота; ацеглатон, альдофосфамида гликозид; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдотраксат; дефофамин; демеклолин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтанзины, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, Орегон, США); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотечены (в частности токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); тиотепа; таксоиды, например паклитаксел (TAXOL®), альбуминовые наноконструкции паклитаксела (ABRAXANE™) и доцетаксел (TAXOTERE®); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкрестин (ONCOVIN®); оксалиплатин; лейковорин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдотраксат; дауномицин; аминоклутетин; циклоспорин, сиролimus, рапамицин, рапалоги, ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; CHOP, сокращение для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкрестином и преднизолоном, и FOLFOX,

сокращение для схемы лечения оксалиплатином (ELOXATIN™) в комбинации с 5-FU, лейковорином; антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен (EVISTA®), дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (FARESTON®); антипрогестероны; понижающие регуляторы эстрогеновых рецепторов (ERD); антагонисты эстрогеновых рецепторов, такие как фулвестрант (FASLODEX®); средства, которые действуют с целью подавления или остановки функции яичников, например, агонисты гормона, высвобождающего лютеинизирующий гормон (LHRH), такие как ацетат лейпролида (LUPRON® и ELIGARD®), ацетат гозерелина, ацетат бусерелина и триптерелин; другие антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулирующий выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклотетимид, мегестрола ацетат (MEGASE®), экземестан (AROMASIN®), форместат, фадрозол, ворозол (RIVISOR®), летрозол (FEMARA®) и анастрозол (ARIMIDEX®); бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (ARELIA®), тилудронат (SKELID®) или ризедронат (ACTONEL®); троксацитабин (аналог 1,3-диоксоланового нуклеозида цитозина); аптамеры, описанные, например, в патенте США № 6344321, который включен в данный документ в его полном объеме посредством ссылки; моноклональные антитела к HGF (например, AV299 от Aveo, AMG102 от Amgen); усеченные варианты mTOR (например, CGEN241 от CompuGen); ингибиторы протеинкиназ, которые блокируют пути, индуцированные mTOR (например, ARQ197 от Arqule, XL880 от Exelixis, SGX523 от SGX Pharmaceuticals, MP470 от Supergen, PF2341066 от Pfizer); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины для генной терапии, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы I (например, LURTOTECAN®); gmRH (например, ABARELIX®); дитозилат лапатиниба (низкомолекулярный двойной ингибитор тирозинкиназы ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016); ингибиторы COX-2, такие как целекоксиб (CELEBREX®); 4-(5-(4-метилфенил)-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил) бензолсульфонамид; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных.

Другие соединения, которые являются эффективными в лечении рака, известны из уровня техники и описаны в данном документе, которые подходят для использования с композициями и способами по настоящему изобретению, описаны, например, в "Physicians Desk Reference, 62nd edition. Oradell, N.J.: Medical Economics Co., 2008", Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eleventh Edition. McGraw-Hill, 2005", "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, Md.: Lippincott Williams & Wilkins, 2000" и "The Merck Index, Fourteenth Edition. Whitehouse Station, N.J.: Merck Research Laboratories, 2006", включенных в данный документ посредством ссылки в соответствующих частях. Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном документе либо выше, либо ниже, включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме.

По всему настоящему описанию, если контекст не требует иного, слова "содержать", "содержит" и "содержащий" будут подразумевать включение указанных стадии или элемента или группы стадий или элементов, при этом без исключения любых других стадии или элемента или группы стадий или элементов. Термин "состоящий из" подразумевает включающий и ограниченный всем, что следует за фразой "состоящий из". Таким образом, фраза "состоящий из" указывает на то, что перечисленные элементы являются требуемыми или обязательными, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Термин "состоящий по существу из" подразумевает включение любых элементов, перечисленных после этой фразы, и ограниченных другими элементами, которые не мешают или не способствуют активности или действию, указанным в настоящем изобретении для перечисленных элементов. Таким образом, фраза "состоящий по существу из" указывает на то, что перечисленные элементы являются требуемыми или обязательными, но другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или могут не присутствовать в зависимости от того, влияют ли они на активность или действие перечисленных элементов.

Различные варианты осуществления, описанные выше, могут быть комбинированы для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, иностранные патенты, иностранные заявки на патенты и непатентные публикации, упомянутые в настоящем изобретении и/или перечисленные в информационном листке заявки, включены в данный документ в их полном объеме посредством ссылки. Содержимое записей базы данных, например, записей базы данных нуклеотидов или белков NCBI, предусмотренных в данном документе, включено в данный документ в ее полном объеме. Если записи в базе данных будут изменяться с течением времени, то содержание на дату подачи настоящей заявки включено в данный документ посредством ссылки. Аспекты вариантов осуществления могут быть изменены, если необходимо использовать концепции различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления в свете вышеприведенного

подробного описания. В целом, в нижеследующей формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в настоящем изобретении и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые пункты формулы изобретения распространяются. Соответственно, формула изобретения не ограничивается настоящим изобретением.

### Примеры

Нижеследующие примеры являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения каким-либо образом объема или содержания настоящего изобретения.

Пример 1. Получение модифицированных iNK-клеток из iPS-клеток.

Использование технологии iPS-клеток для реализации сложной стратегии редактирования и последующего получения iNK-клеток или других лимфоцитов, например, позволяет получать iNK-клетки, которые экспрессируют представляющий интерес CAR, такой как мезотелин, EGFR, HER2 и MICA/B и/или имеют одно или несколько изменений из списка А и/или таблицы 10, и одно или несколько изменений из списка В и/или таблицы 11.

Список А.

Экзогенная экспрессия улучшенного варианта CD16, например, hnCD16a (высокоаффинный нерасщепляемый вариант CD16 - низкоаффинного рецептора Fc $\gamma$ , участвующего в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)). Обычно CD16 расщепляется во время ADCC протеазами, CAR hnCD16 не подвергается этому расщеплению и, таким образом, дольше поддерживает сигнал ADCC.

Экзогенная экспрессия IL-15/IL 15RA.

Потеря функции TGFbR2 или экзогенная экспрессия доминантно-негативного варианта TGFbR2 (доминантно-негативный рецептор II TGF-бета экспрессируется из NK-специфического промотора, чтобы не мешать роли TGFbRII в дифференцировке CD34 клеток, которые могут происходить из iPS-клеток и обычно служат типом клеток, из которых дифференцируются клетки геновой линии дифференцировки (например, NK-клетки)).

Потеря функции ADORA2A.

Список В.

Потеря функции B2M (например, устранение экспрессии MHC класса I путем нацеливания на экспрессию B2M). Экзогенная экспрессия HLA-G.

Потеря функции СИТА (например, устранение экспрессии MHC класса II путем нацеливания на СИТА).

Потеря функции PD1.

Потеря функции TIGIT.

Потеря функции CISH (цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка).

Потеря функции предпочтительно включает в себя полное устранение поверхностной экспрессии соответствующего белка.

Например, могут быть созданы iNK-клетки с экзогенной экспрессией CAR и варианта CD16 (например, hnCD16) или CAR без варианта CD16. Также могут быть созданы клетки, не экспрессирующие CAR, но экспрессирующие вариант CD16. Любая клетка, экспрессирующая CD16 или его улучшенный вариант (например, hnCD16), может быть подходящей для комбинированной терапии с моноклональным антителом (например, моноклональным антителом, применяемым в терапии рака), или с Fc-слитым белком, нацеленным на патологические клетки.

Если осуществлен нокин более чем двух трансгенов, то мультицистронная экспрессионная конструкция или конструкция 2A могут быть полезными, чтобы избежать необходимости вставки отдельной конструкции для каждого трансгена. Такие iNK-клетки полезны для широкого диапазона видов применения в иммунотерапии, включая без ограничения лечение пролиферативных заболеваний, например, определенных форм рака. При использовании описанных выше CAR предполагалось применение при раке молочной железы, раке ободочной кишки, раке желудка, почечно-клеточной карциноме и NSCLC. Измененный репертуар молекул на поверхности таких клеток также дал бы возможность успешно лечить солидные опухоли, что оказалось трудным с текущими стратегиями, основанными на NK-клетках.

Иллюстративные iNK-клетки, полученные из репрограммированных соматических клеток (или их дочерних клеток), включали одну или несколько (например, одну или несколько, две или более, три или более, четыре или более, пять или более или шесть или более) из следующих характеристик.

Они содержали перестроенный эндогенный локус TCR (например, перестройку

участка TCR $\alpha$  VJ и/или TCR $\beta$  V(D)J и полные экзоны V-домена);

они не экспрессировали эндогенный корецептор Т-клеток, например CD3, CD4 и/или CD8;

они экспрессировали биомаркер NK-клеток, например:

CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45;

рецептор III Fc-области иммуноглобулина гамма, являющийся рецептором NK-клеток (Fc $\gamma$ RIII, кластер дифференцировки 16 (CD16));

член 0 группы 2 белков естественных киллеров (NKG2D, рецептор стрессового лиганда MICAIB);



CD69;

естественный рецептор цитотоксичности (например, NKp30; NKp44; NKp46 и/или CD158b) или любую комбинацию двух или более из них.

Они могли экспрессировать:

химерный антигенный рецептор (CAR);

не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (FcγRIII, CD16);

агонист пути интерлейкина 15 (IL-15), например интерлейкин-15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант (например, конститутивно активный вариант IL-15R, например, IL-15R, слитый с агонистом IL-15R (IL-15RA)); также рассматривались другие агонисты пути интерлейкина либо в качестве альтернативы, либо в комбинации с агонистом пути IL-15, например, агонист пути интерлейкина 2 (IL-2), например, IL-2, рецептор интерлейкина 2 (IL-2R) или его вариант (например, конститутивно активный вариант IL-2R, например, IL-2R, слитый с агонистом IL-2R (IL-2RA)); и/или агонист пути интерлейкина 12 (IL12), например, IL-12, рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант (например, конститутивно активный вариант IL-12R, например, IL-12R, слитый с агонистом IL-12R (IL-12RA)); также рассматривалась комбинация двух или более интерлейкинов, например, комбинация агониста пути IL-15 или агониста IL-2 и агониста IL-12, например, IL-15R, слитый с агонистом IL-15R (IL-15RA) в комбинации с IL-12R, слитым с агонистом IL-12R (IL-15RA);

человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G) или любую комбинацию двух или более из них;

человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);

поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47) и

они могли демонстрировать потерю функции:

рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGFβ2, например, либо путем модификации кодирующей последовательности, либо путем экспрессии доминантно-негативного варианта);

рецептора аденозина A2a (ADORA2A);

T-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);

β-2 микрोगлобулина (B2M);

трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СИТА);

белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1, CD279) или могли экспрессировать антагонист PD-1;

цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH);

рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров);

двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II;

кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B)

или любой комбинации двух или более из них.

Желательно достичь определенных комбинаций этих характеристик, например, iNK-клетки, экспрессирующие CAR, IL-15 и HLA-G, и демонстрирующие потерю функции в B2M и PD-1, путем минимизации количества редактирований. Например, экспрессионную конструкцию, кодирующую CAR, можно было вставить в локус B2M, а экспрессионную конструкцию, кодирующую IL-15 и HLA-G, можно было вставить в локус B2M. Аналогичные стратегии применимы и к другим комбинациям. iNK-клетки можно использовать в качестве монотерапии, и iNK-клетки, экспрессирующие CAR (например, CAR, связывающий мезотелин, EGFR или HER2), будут особенно подходящими для терапевтических подходов, специфически нацеленных на клетки, экспрессирующие поверхностный антиген, который связывает CAR. Некоторые предполагаемые iNK-клетки могут также подходить для подходов комбинированной терапии, например, в комбинации с моноклональным антителом, нацеленным на раковые клетки.

В некоторых вариантах осуществления получение iPSC-клеток может включать получение донорной клетки, например, соматической клетки от здорового донора. В некоторых вариантах осуществления подтверждали, что донорные клетка или популяция клеток являлись кариотипически нормальными и не демонстрировали экспрессию гена или комбинации генов, которые, как известно, связаны с патологическим состоянием, например, злокачественным состоянием. В некоторых вариантах осуществления соматическую клетку редактировали, а затем репрограммировали до плюрипотентного состояния. В некоторых вариантах осуществления соматическую клетку репрограммировали и одновременно редактировали. В некоторых вариантах осуществления соматическую клетку репрограммировали и полученную плюрипотентную клетку редактировали. В некоторых вариантах осуществления получение iPSC-клеток включало клональную экспансию репрограммированных клеточных линий, определение характеристик нескольких таких клональных линий iPSC-клеток и выбор линии, которая включала все требуемые изменения, будучи кариотипически нормальной.

Конечным продуктом для клинического применения являлась популяция iNK-клеток с соответствующими изменениями. Количество клеток должно быть достаточным для того, чтобы вызвать требуемый иммунный ответ после введения субъекту. Точное количество будет зависеть, помимо других фак-

торов, от конкретного требуемого клинического результата, пациента и подлежащего лечению заболевания и может сильно варьироваться. Ожидалось, что подходящая популяция клеток для введения могла составлять от приблизительно 1000 клеток до приблизительно 100000000 клеток. Популяция iNK-клеток для клинического применения не должна была содержать остающихся стволовых клеток, например, iPS-клеток, экспрессирующих Oct-4 и/или Sox2, в идеале не должна была содержать или содержать только минимальное количество клеток, несущих эписомальные экспрессионные конструкции, например, эписомальные экспрессионные конструкции, используемые во время репрограммирования Т-клеток; не должна была содержать или содержать не более чем 1%, 5% или 10% клеток, не экспрессирующих требуемую комбинацию клеточных маркеров и сверхэкспрессированных поверхностных молекул.

Пример 2. Использование Т-клеток в качестве исходных клеток для сложной стратегии редактирования и последующего получения iNK-клеток.

Использование Т-клеток в качестве исходных клеток для сложной стратегии редактирования и последующего получения iNK-клеток или других лимфоцитов, например, давало возможность получать iNK-клетки, которые экспрессировали представляющий интерес CAR, такой как мезотелин, EGFR, HER2 и MICA/B, и/или имели одно или несколько изменений из списка А и/или таблицы 10 и одно или несколько изменений из списка В и/или табл. 11.

Список А.

Экзогенная экспрессия улучшенного варианта CD16, например, hnCD16a (высокоаффинный нерасщепляемый вариант CD16 - низкоаффинного рецептора Fc $\gamma$ , участвующего в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)). Обычно CD16 расщепляется во время ADCC протеазами, CAR hnCD16 не подвергается этому расщеплению и, таким образом, дольше поддерживает сигнал ADCC.

Экзогенная экспрессия IL-15/IL15RA.

Потеря функции TGFbR2 или экзогенная экспрессия доминантно-негативного варианта TGFbR2 (доминантно-негативный рецептор II TGF-бета экспрессируется из NK-специфического промотора, чтобы не мешать роли TGFbRII в дифференцировке CD34 клеток, которые могут происходить из iPS-клеток и обычно служат типом клеток, из которых дифференцируются клетки геновой линии дифференцировки (например, NK-клетки)).

Потеря функции ADORA2A.

Список В.

Потеря функции B2M (например, устранение экспрессии MHC класса I путем нацеливания на экспрессию B2M). Экзогенная экспрессия HLA-G.

Потеря функции SIPA (например, устранение экспрессии MHC класса II путем нацеливания на SIPA).

Потеря функции PD1.

Потеря функции TIGIT.

Потеря функции CISH (цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка).

Потеря функции предпочтительно включает в себя полное устранение поверхностной экспрессии соответствующего белка.

Например, могут быть созданы iNK-клетки с экзогенной экспрессией CAR и варианта CD16 (например, hnCD16) или CAR без варианта CD16. Также могут быть созданы клетки, не экспрессирующие CAR, но экспрессирующие вариант CD16. Любая клетка, экспрессирующая CD16 или его улучшенный вариант (например, hnCD16), может быть подходящей для комбинированной терапии с моноклональным антителом (например, моноклональным антителом, применяемым в терапии рака), или с Fc-слитым белком, нацеленным на патологические клетки.

Если осуществлен нокин более чем двух трансгенов, то мультицистронная экспрессионная конструкция или конструкция 2A могут быть полезными, чтобы избежать необходимости вставки отдельной конструкции для каждого трансгена. Такие iNK-клетки полезны для широкого диапазона видов применения в иммунотерапии, включая без ограничения лечение пролиферативных заболеваний, например, определенных форм рака. При использовании описанных выше CAR предполагалось применение при раке молочной железы, раке ободочной кишки, раке желудка, почечно-клеточной карциноме и NSCLC. Измененный репертуар молекул на поверхности таких клеток также дал бы возможность успешно лечить солидные опухоли, что оказалось трудным с текущими стратегиями, основанными на NK-клетках.

Иллюстративные iNK-клетки, полученные из репрограммированных/измененных Т-клеток (или их дочерних клеток), включали одну или несколько (например, одну или несколько, две или более, три или более, четыре или более, пять или более или шесть или более) из следующих характеристик.

Они содержали перестроенный эндогенный локус TCR (например, перестройку участка TCRa VJ и/или TCR $\beta$  V(D)J и полные экзоны V-домена);

они не экспрессировали эндогенный корецептор Т-клеток, например CD3, CD4 и/или CD8;

они экспрессировали биомаркер NK-клеток, например:

CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45;

рецептор III Fc-области иммуноглобулина гамма, являющийся рецептором NK-клеток (Fc $\gamma$ RIII, кластер дифференцировки 16 (CD16));

член D группы 2 белков естественных киллеров (NKG2D, рецептор стрессового лиганда MICAIB); CD69; естественный рецептор цитотоксичности (например, NKp30; NKp44; NKp46 и/или CD158b) или любую комбинацию двух или более из них.

Они могли экспрессировать:

химерный антигенный рецептор (CAR);

не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (FcγRIII, CD16);

агонист пути интерлейкина 15 (IL-15), например интерлейкин-15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант (например, конститутивно активный вариант IL-15R, например, IL-15R, слитый с агонистом IL-15R (IL-15RA)); также рассматривались другие агонисты пути интерлейкина либо в качестве альтернативы, либо в комбинации с агонистом пути IL-15, например, агонист пути интерлейкина 2 (IL-2), например, IL-2, рецептор интерлейкина 2 (IL-2R) или его вариант (например, конститутивно активный вариант IL-2R, например, IL-2R, слитый с агонистом IL-2R (IL-2RA)); и/или агонист пути интерлейкина 12 (IL12), например, IL-12, рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант (например, конститутивно активный вариант IL-12R, например, IL-12R, слитый с агонистом IL-12R (IL-12RA)); также рассматривалась комбинация двух или более интерлейкинов, например, комбинация агониста пути IL-15 или агониста IL-2 и агониста IL-12, например, IL-15R, слитый с агонистом IL-15R (IL-15RA) в комбинации с IL-12R, слитым с агонистом IL-12R (IL-15RA);

человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G) или любую комбинацию двух или более из них;

человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);

поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47) и

они могли демонстрировать потерю функции:

рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGfβR2, например, либо путем модификации кодирующей последовательности, либо путем экспрессии доминантно-негативного варианта);

рецептора аденозина A2a (ADORA2A);

T-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);

β-2 микроглобулина (B2M);

трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СИТА);

белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1, CD279) или могли экспрессировать антагонист PD-1;

цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH);

рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров);

двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II;

кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B);

константной области альфа-цепи T-клеточного рецептора (TRAC);

или любой комбинации двух или более из них.

Желательно достичь определенных комбинаций этих характеристик, например, iNK-клетки, экспрессирующие CAR, IL-15 и HLA-G, и демонстрирующие потерю функции в B2M и PD-1, путем минимизации количества редактирований. Например, экспрессионную конструкцию, кодирующую CAR, можно было вставить в локус B2M, а экспрессионную конструкцию, кодирующую IL-15 и HLA-G, можно было вставить в локус B2M. Аналогичные стратегии применимы и к другим комбинациям. iNK-клетки можно использовать в качестве монотерапии, и iNK-клетки, экспрессирующие CAR (например, CAR, связывающий мезотелин, EGFR или HER2), будут особенно подходящими для терапевтических подходов, специфически нацеленных на клетки, экспрессирующие поверхностный антиген, который связывает CAR. Некоторые предполагаемые iNK-клетки могут также подходить для подходов комбинированной терапии, например, в комбинации с моноклональным антителом, нацеленным на раковые клетки.

Получение iPS-клеток включало бы клональную экспансию репрограммированных клеточных линий, определение характеристик нескольких таких клональных линий iPS-клеток и выбор линии, которая включала все требуемые изменения, будучи кариотипически нормальной.

Конечным продуктом для клинического применения являлась популяция iNK-клеток с соответствующими изменениями. Количество клеток должно быть достаточным для того, чтобы вызвать требуемый иммунный ответ после введения субъекту. Точное количество будет зависеть, помимо других факторов, от конкретного требуемого клинического результата, пациента и подлежащего лечению заболевания и может сильно варьироваться. Ожидалось, что подходящая популяция клеток для введения могла составлять от приблизительно 1000 клеток до приблизительно 100000000 клеток. Популяция iNK-клеток для клинического применения не должна была содержать остающихся стволовых клеток, например, iPS-клеток, экспрессирующих Oct-4 и/или Sox2, в идеале не должна была содержать или содержать только минимальное количество клеток, несущих эписомальные экспрессионные конструкции, например, эписомальные экспрессионные конструкции, используемые во время репрограммирования T-клеток; не

должна была содержать или содержать не более чем 1%, 5% или 10% клеток, не экспрессирующих требуемую комбинацию клеточных маркеров и сверхэкспрессированных поверхностных молекул.

Пример 3. iPS/iNK-клетки для видов клинического применения.

Для клинического использования в качестве иммунотерапевтического средства, например, в контексте применения в иммуноонкологии, получали модифицированные лимфоциты, в данном случае iNK-клетки, которые характеризовались потерей функции B2M; потерей функции СИТА; и экзогенную экспрессионную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HLA-G. Эти изменения позволяли отредактированным клеткам и/или дифференцированным iNK-клеткам, происходящим из них, избегать иммунной системы неаутологичного хозяина. Для улучшения клинических свойств iNK-клеток могут вноситься дополнительные изменения. Эти iNK-клетки получают путем репрограммирования соматической донорской клетки от здорового донора, репрограммирования донорской клетки в плюрипотентное состояние и выполнения требуемых изменений. После редактирования плюрипотентные клетки дифференцировались в NK-клетки, в результате чего образовывалась популяция модифицированных iNK-клеток для клинического применения.

Пример 4. iPS/iNK-клетки для видов клинического применения.

Для клинического использования в качестве иммунотерапевтического средства, например, в контексте применения в иммуноонкологии, получали модифицированные лимфоциты, в данном случае iNK-клетки, которые характеризовались потерей функции B2M; потерей функции СИТА; и экзогенную экспрессионную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HLA-E. В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно характеризовались потерей функции NKG2A. Эти изменения позволяли отредактированным клеткам и/или дифференцированным iNK-клеткам, происходящим из них, избегать иммунной системы неаутологичного хозяина. Для улучшения клинических свойств iNK-клеток могут вноситься дополнительные изменения. Эти iNK-клетки получают путем репрограммирования соматической донорской клетки от здорового донора, репрограммирования донорской клетки в плюрипотентное состояние и выполнения требуемых изменений. После редактирования плюрипотентные клетки дифференцировались в NK-клетки, в результате чего образовывалась популяция модифицированных iNK-клеток для клинического применения.

Пример 5. iPS/iNK-клетки для видов клинического применения.

Для клинического использования в качестве иммунотерапевтического средства, например, в контексте применения в иммуноонкологии, получали модифицированные лимфоциты, в данном случае iNK-клетки, которые характеризовались потерей функции B2M; потерей функции СИТА; и экзогенную экспрессионную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CD47. Эти изменения позволяли отредактированным клеткам и/или дифференцированным iNK-клеткам, происходящим из них, избегать иммунной системы неаутологичного хозяина. Для улучшения клинических свойств iNK-клеток могут вноситься дополнительные изменения. Эти iNK-клетки получают путем репрограммирования соматической донорской клетки от здорового донора, репрограммирования донорской клетки в плюрипотентное состояние и выполнения требуемых изменений. После редактирования плюрипотентные клетки дифференцировались в NK-клетки, в результате чего образовывалась популяция модифицированных iNK-клеток для клинического применения.

Пример 6. iPS/iNK-клетки для видов клинического применения.

Для клинического использования в качестве иммунотерапевтического средства, например, в контексте применения в иммуноонкологии, получали модифицированные лимфоциты, в данном случае iNK-клетки, которые характеризовались потерей функции B2M; потерей функции HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, HLA-DQB1 и HLA-DPB1; и экзогенную экспрессионную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HLA-G. Эти изменения позволяли отредактированным клеткам и/или дифференцированным iNK-клеткам, происходящим из них, избегать иммунной системы неаутологичного хозяина. Для улучшения клинических свойств iNK-клеток могут вноситься дополнительные изменения. Эти iNK-клетки получают путем репрограммирования соматической донорской клетки от здорового донора, репрограммирования донорской клетки в плюрипотентное состояние и выполнения требуемых изменений. После редактирования плюрипотентные клетки дифференцировались в NK-клетки, в результате чего образовывалась популяция модифицированных iNK-клеток для клинического применения.

Пример 7. iPS/iNK-клетки для видов клинического применения.

Для клинического использования в качестве иммунотерапевтического средства, например, в контексте применения в иммуноонкологии, получали модифицированные лимфоциты, в данном случае iNK-клетки, которые характеризовались потерей функции B2M; потерей функции HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, HLA-DQB1 и HLA-DPB1; и экзогенную экспрессионную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HLA-E. В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно характеризовались потерей функции NKG2A. Эти изменения позволяли отредактированным клеткам и/или дифференцированным iNK-клеткам, происходящим из них, избегать иммунной системы неаутологичного хозяина. Для улучшения клинических свойств iNK-клеток могут вноситься дополнительные изменения. Эти iNK-клетки получают путем ре-

программирования соматической донорской клетки от здорового донора, репрограммирования донорской клетки в плюрипотентное состояние и выполнения требуемых изменений. После редактирования плюрипотентные клетки дифференцировались в NK-клетки, в результате чего образовывалась популяция модифицированных iNK-клеток для клинического применения.

Пример 8. iPS/iNK-клетки для видов клинического применения.

Для клинического использования в качестве иммунотерапевтического средства, например, в контексте применения в иммуноонкологии, получали модифицированные лимфоциты, в данном случае iNK-клетки, которые характеризовались потерей функции B2M; потерей функции HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, HLA-DQB1 и HLA-DPB1; и экзогенную экспрессионную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CD47. Эти изменения позволяли отредактированным клеткам и/или дифференцированным iNK-клеткам, происходящим из них, избегать иммунной системы неаутологичного хозяина. Для улучшения клинических свойств iNK-клеток могут вноситься дополнительные изменения. Эти iNK-клетки получают путем репрограммирования соматической донорской клетки от здорового донора, репрограммирования донорской клетки в плюрипотентное состояние и выполнения требуемых изменений. После редактирования плюрипотентные клетки дифференцировались в NK-клетки, в результате чего образовывалась популяция модифицированных iNK-клеток для клинического применения.

Пример 9. iPS/iNK-клетки для видов клинического применения.

В клетки, предусмотренные в примерах 3-8, вносили дополнительные изменения, которые повышали эффективность iNK-клетки в качестве терапевтического средства.

Эти изменения включали в некоторых вариантах осуществления нокин экзогенной экспрессионной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант IL-15R, в данном случае продукт слияния IL-15R с его лигандом (IL-15 или его фрагмент, связывающий IL-15), что приводило к конститутивно активному пути IL-15 в iNK-клетках.

Эти изменения дополнительно включали в некоторых вариантах осуществления нокин экзогенной экспрессионной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рецептор 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ R2), под контролем промотора, специфичного для NK-клеток, например, промотора CD45.

Эти изменения дополнительно включали в некоторых вариантах осуществления потерю функции CD32B (FCGR2).

Пример 10. NK-клетки с отредактированными генами, демонстрирующие потерю функции CISH и/или TGFBR2, демонстрировали улучшенную эффекторную функцию в ответ на опухолевые клетки.

Аллогенную терапию на основе NK-клеток следующего поколения разрабатывали с использованием редактирования генов CRISPR-Cpf1 для улучшения функции NK-клеток посредством нокаута генов CISH и TGFBR2.

NK-клетки размножали из культур CD3<sup>+</sup> PBMC в 20 нг/мл IL-15. Редактирование генов выполняли на разных стадиях размножения NK-клеток (в дни 8-21). Для редактирования CISH и TGFBR2 направляющие для любой мишени объединяли в комплекс с нуклеазой Cpf1 в соотношении 2:1 с образованием рибонуклеопротеинов (RNP). Когда клетки редактировали с обеими мишенями, комплексообразование RNP для каждой мишени проводили отдельно, а затем смешивали в соотношении 1:1 перед электропорацией.

Для электропорации NK-клетки суспендировали в буфере NuClone при плотности  $80 \times 10^6$  клеток/мл. Девяносто микролитров NK-клеток смешивали с 10 микролитрами соответствующих RNP. Затем смеси клеток и RNP переносили в кассету MaxCyte OC-100 или OC-400 для электропорации. Сразу после электропорации NK-клетки восстанавливали в 100 микролитрах культуральной среды в течение 10 минут при 37°C перед переносом в 24-луночный планшет Grex для восстановления после редактирования и функциональных анализов.

Для редактирования CISH и TGFBR2 использовали нижеследующие направляющие последовательности РНК: Обе направляющие получали с нацеливающим доменом, состоящим из РНК, каркасной структурой AsCpf1 с последовательностью

UAAUUUCUACUCUUGUAGAU

со стороны 5'-конца от нацеливающего домена и 25-мерного удлинения ДНК с последовательностью

ATGTGTTTTTGTCAAAGACSTTTT

на 5'-конце последовательности каркасной структуры.

Таблица 12

Мишень	Последовательность нацеливающего домена gRNA (ДНК)	Последовательность gRNA
CISH 7050	GGTGTACAGCAGTGGCTGGT	ATGTGTTTTTGTCAAAGACCTTTTrUrAr rArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUr ArGrArUrGrGrUrGrUrArCrArGrCrA rGrUrGrGrCrUrGrGrU
TGFBR2 24026	TGATGTGAGATTTTCCACCT	ATGTGTTTTTGTCAAAGACCTTTTrUrA rArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUr ArGrArUrUrGrArUrGrUrGrArGrArU rUrUrUrCrCrArCrCrU

Как показано на фиг. 1A-1B, в НК-клетках было достигнуто устойчивое редактирование одного и двух генов TGFBR2 и CISH. Как одиночное, так и одновременное нацеливание на TGFBR2 и CISH в НК-клетках с использованием CRISPR-Cpf1 приводило к вставкам/делециям в обоих мишенях в более чем 80% НК-клеток, при этом более 90% отредактированных НК-клеток были жизнеспособными через 72 ч после редактирования.

Эффективность эффекторных клеток оценивали *in vitro* с помощью 3D-анализа опухолевых сфероидов.

Для получения сфероидов 5000 меченых посредством NucLight Red опухолевых клеток PC-3 или SK-OV-3 высевали в одну лунку 96-луночных планшетов со сверхнизким уровнем прикрепления, центрифугировали при 1000 об/мин, в течение 10 мин и инкубировали в течение 96 ч при 37°C. Через 96 ч эффекторные клетки (первичные НК-клетки человека, обработанные различными RNP) добавляли к сфероидам в различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней с 10 нг/мл TGF-бета или без него. Интенсивность красных объектов измерялась каждые два часа в течение 6 дней с помощью системы визуализации IncuCyte. Показанные данные нормализованы к интенсивности красного объекта во время добавления эффектора. Нормализация кривых сфероидов сохраняла те же модели эффективности, которые наблюдались при ненормализованных данных (фиг. 2A, 2B). Кроме того, НК-клетки с КО CISH снижали рост опухолевых сфероидов яичников SK-OV-3 (фиг. 3A, 3B и фиг. 5A) и предстательной железы PC-3 (фиг. 4A, 4B и фиг. 5B) в среднем на 23% и 12% ( $p < 0,0001$  в обоих случаях) соответственно по сравнению с неотредактированными контролями. Однако активность НК-клеток с КО CISH подавлялась добавлением экзогенного TGF- $\beta$ .

Учитывая это наблюдение, получали нокаут гена рецептора TGF- $\beta$ , TGFBR2, вместе с КО CISH. Одиночный нокаут TGFBR2 делал НК-клетки устойчивыми к ингибированию посредством TGF- $\beta$  ( $p < 0,0001$ ). Важно отметить, что у 4 уникальных донора и в 7 независимых экспериментах НК-клетки с двойным нокаутом (DKO) TGFBR2/CISH продемонстрировали превосходящую эффекторную функцию и ослабили рост опухолевых сфероидов SK-OV-3 и PC-3 на более чем 60% для обоих типов опухолей, с добавкой экзогенного TGF- $\beta$  (фиг. 3A-3B и фиг. 4A-4B) и без добавки экзогенного TGF- $\beta$  (фиг. 5A-5B). Эти эффекторные функции были статистически выше, чем у контрольных НК-клеток или НК-клеток с одиночным нокаутом TGFBR2 и CISH ( $p < 0,0001$  во всех случаях). Кроме того, НК-клетки с DKO TGFBR2/CISH продуцировали более высокие концентрации TNF- $\alpha$  (фиг. 6A) и IFN- $\gamma$  (фиг. 6B),  $p < 0,01$ , в обоих случаях, как оценено с помощью ELISA.

НК-клетки с двойным КО экспрессировали значительно более высокие уровни маркеров активации CD25 и CD69 по сравнению с контрольными НК-клетками (фиг. 6C).

Противоопухолевую активность отредактированных НК-клеток измеряли на модели *in vivo*. Мышам NSG внутрибрюшинно вводили 500000 опухолевых клеток SKOV3, меченых люциферазой. Через семь дней после имплантации опухоли 10 миллионов отредактированных (двойной нокаут CISH/TGFBR2) или неотредактированных (контроль) НК-клеток вводили в брюшную полость мышей, имеющих опухоль. Бремя опухоли контролировали еженедельно путем IP введения люциферина и визуализации IVIS. Двухфакторный анализ ANOVA проводили в день 34 для определения статистической значимости между контрольной группой и группами НК-клеток с DKO (\*\*\*\*,  $P < 0,0001$ ) (фиг. 6D).

Эти результаты демонстрируют эффективное редактирование первичных НК-клеток человека в двух уникальных мишенях одновременно с помощью CRISPR-Cpf1. В совокупности повышенная эффекторная функция первичных НК-клеток человека с DKO CISH/TGFBR2 *in vitro* и *in vivo* по сравнению с НК-клетками с одиночным нокаутом или неотредактированными НК-клетками указывала на улучшенный и синергетический эффект DKO CISH/TGFBR2.

Пример 11. НК-клетки с отредактированными генами, демонстрирующие потерю функции TIGIT, NKG2A или ADORA2A, демонстрировали улучшенную эффекторную функцию в ответ на опухолевые клетки Аллогенную терапию на основе НК-клеток следующего поколения разрабатывали с использованием редактирования генов CRISPR-Cpf1 для улучшения функции НК-клеток посредством нокаута генов TIGIT, NKG2A или ADORA2A. НК-клетки размножали, как описано ранее в примере 10. Вкратце, НК-

клетки размножали *ex vivo* в течение 14 дней в IL15, а затем редактировали с помощью соответствующего нацеливающего комплекса RNP. Редактирование генов выполняли на разных стадиях размножения НК-клеток (в дни 8-21). Для редактирования TIGIT, NKG2A или ADORA2A направляющие для соответствующей мишени объединяли в комплекс с нуклеазой Cpf1 в соотношении 2:1 с образованием рибонуклеопротеинов (RNP). Когда клетки редактировали с обеими мишенями, комплексообразование RNP для каждой мишени проводили отдельно, а затем смешивали в соотношении 1:1 перед электропорацией. НК-клетки подвергали электропорации, как описано ранее в примере 10.

Для редактирования TIGIT, NKG2A или ADORA2A использовали нижеследующие направляющие последовательности РНК.

Таблица 13

Мишень	Последовательность нацеливающего домена gRNA (ДНК)	Последовательность gRNA
TIGIT	TGCAGAGAAAGGTGGCTCT A	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCT TTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCr UrUrGrUrArGrArUrUrGrCrArGrAr GrArArArGrGrUrGrGrCrUrCrUrA
NKG2A	GCAACTGAACAGGAAATAA CC	UAAUUUCUACUCUUGUAGAUG CAACUGAACAGGAAAUAAACC
ADORA2A	CCTGTGTGCTGGTGCCCTG	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCT TTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCr UrUrGrUrArGrArUrCrCrUrGrUrGr UrGrCrUrGrGrUrGrCrCrCrUrG

Как показано на фиг. 7A-7C, в НК-клетках было достигнуто устойчивое одиночное редактирование генов TIGIT, NKG2A и ADORA2A. Эффективность эффекторных клеток (первичных НК-клеток человека, обработанных различными RNP) оценивали *in vitro* для определения функции одиночного КО TIGIT (фиг. 8A, 8B), одиночного КО NKG2A (фиг. 9A, 9B) и одиночного КО ADORA2A (фиг. 10A, 10B) с помощью 3D-анализов опухолевых сфероидов.

Для получения сфероидов 5000 меченых посредством NucLight Red опухолевых клеток РС-3 или SK-OV-3 высевали в одну лунку 96-луночных планшетов со сверхнизким уровнем прикрепления, центрифугировали при 1000 об/мин. в течение 10 минут и инкубировали в течение 96 ч при 37°C. Через 96 ч эффекторные клетки (первичные НК-клетки человека, обработанные различными RNP) добавляли к сфероидам в различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней с 10 нг/мл TGF-бета или без него. Интенсивность красных объектов измерялась каждые два часа в течение 6 дней с помощью системы визуализации Incucyte. Показанные данные нормализованы к интенсивности красного объекта во время добавления эффектора. У 2 уникальных доноров и в 2 независимых экспериментах НК-клетки с одиночным КО TIGIT (фиг. 8A-8B), одиночным КО NKG2A (фиг. 9A-9B) и одиночным КО ADORA2A (фиг. 10A-10B) продемонстрировали превосходящую эффекторную функцию и ослабляли рост опухолевых сфероидов SK-OV-3 и РС-3. Эти данные продемонстрировали эффективное редактирование первичных НК-клеток человека в трех независимых уникальных мишенях с помощью CRISPR-Cpf1, что приводило к улучшению эффекторной функции одиночного КО TIGIT, одиночного КО NKG2A и одиночного КО ADORA2A первичных НК-клеток человека *in vitro* по сравнению с неотредактированными НК-клетками.

Пример 12. НК-клетки с отредактированными генами, демонстрирующие потерю функции CISH, TGFBR2 и TIGIT, продемонстрировали улучшенную эффекторную функцию в ответ на опухолевые клетки.

Аллогенную терапию на основе НК-клеток следующего поколения разработали с использованием редактирования генов CRISPR-Cpf1 для улучшения функции НК-клеток посредством нокаута генов CISH, TGFBR2 и TIGIT.

НК-клетки размножали, как описано ранее в примере 10. Вкратце, НК-клетки размножали *ex vivo* в течение 14 дней в IL15, а затем редактировали с помощью соответствующего нацеливающего комплекса RNP. Редактирование генов выполняли на разных стадиях размножения НК-клеток (в дни 8-21). Для редактирования CISH, TGFBR2 и TIGIT направляющие для соответствующей мишени объединяли в комплекс с нуклеазой Cpf1 с образованием рибонуклеопротеинов (RNP), комплексообразование RNP для каждой мишени проводили отдельно, а затем смешивали в соотношении 1:1 перед электропорацией. НК-клетки подвергали электропорации, как описано ранее в примере 10.

Направляющие последовательности РНК, которые использовали для редактирования CISH, TGFBR2 и TIGIT, указаны в табл. 14 ниже.

Таблица 14

Мишень	Последовательность нацеливающего домена gRNA (ДНК)	Последовательность gRNA
CISH	ACTGACAGCGTGAACAGGTAG	ATGTGTTTTTGTCAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrGrArCrArGrCrGrUrGrArArCrArGrGrUrArG
TGFBR2	TGATGTGAGATTTTCCACCT	ATGTGTTTTTGTCAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArUrGrUrGrArGrArUrUrUrUrCrCrArCrCrU
TIGIT	TGCAGAGAAAGGTGGCTCTA	ATGTGTTTTTGTCAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrArGrArGrArArGrGrUrGrGrCrUrCrUrA

Как показано на фиг. 11, в НК-клетках было достигнуто устойчивое тройное редактирование генов TGFBR2, CISH и TIGIT.

Эффективность эффекторных клеток оценивали *in vitro* с помощью 3D-анализов опухолевых сфероидов.

Для получения сфероидов 5000 меченых посредством NucLight Red опухолевых клеток PC-3 или SK-OV-3 высевали в одну лунку 96-луночных планшетов со сверхнизким уровнем прикрепления, центрифугировали при 1000 об/мин, в течение 10 минут и инкубировали в течение 96 ч при 37°C. Через 96 ч эффекторные клетки (первичные НК-клетки человека, обработанные различными RNP) добавляли к сфероидам в различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней с 10 нг/мл TGF-бета или без него. Интенсивность красных объектов измерялась каждые два часа в течение 6 дней с помощью системы визуализации Incucyte. Показанные данные нормализованы к интенсивности красного объекта во время добавления эффектора. Нормализация кривых сфероидов сохраняла те же модели эффективности, которые наблюдались при ненормализованных данных. НК-клетки с тройным нокаутом (ТКО) TGFBR2/CISH/TIGIT продемонстрировали превосходящую эффекторную функцию и ослабили рост опухолевых сфероидов SK-OV-3 и PC-3 (фиг. 12А-12В). Эти эффекторные функции были статистически выше, чем у контрольных НК-клеток. Эти результаты продемонстрировали эффективное редактирование первичных НК-клеток человека в трех уникальных мишенях одновременно с помощью CRISPR-Cpf1. В совокупности повышенная эффекторная функция первичных НК-клеток человека с ТКО CISH/TGFBR2/TIGIT *in vitro* и по сравнению с неотредактированными НК-клетками указывала на улучшенный эффект ТКО CISH/TGFBR2/TIGIT.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный лимфоцит, где модифицированный лимфоцит
  - (a) не экспрессирует эндогенные CD3, CD4 и/или CD8; и
  - (b) экспрессирует по меньшей мере один эндогенный ген, кодирующий
    - (i) CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45;
    - (ii) рецептор III Fc-области иммуноглобулина гамма, являющийся рецептором НК-клеток (FcγRIII, кластер дифференцировки 16 (CD16));
    - (iii) представителя D группы 2 белков естественных киллеров (NKG2D);
    - (iv) CD69; или
    - (v) естественный рецептор цитотоксичности; и
 где модифицированный лимфоцит включает потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGFβ2) и цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH).
2. Модифицированный лимфоцит по п. 1, где модифицированный лимфоцит дополнительно
  - (1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую
    - (i) химерный антигенный рецептор (CAR);
    - (ii) не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16);
    - (iii) интерлейкин 15 (IL-15);
    - (iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант;
    - (v) интерлейкин 12 (IL-12);
    - (vi) рецептор IL-12 (IL-12R) или его вариант;
    - (vii) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G);
    - (viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);
    - (ix) поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47);



или любую комбинацию двух или более из них; и/или  
 (2) демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного из  
 (i) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A);  
 (ii) Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);  
 (iii) микроглобулина  $\beta$ -2 (B2M);  
 (iv) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1);  
 (v) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СИТА);  
 (vi) рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров);  
 (vii) двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II;  
 (viii) кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B);  
 (ix) константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC)  
 или любой комбинации двух или более из них.

3. Модифицированный лимфоцит по п.2, где лимфоцит демонстрирует потерю функции

(i) TIGIT, ADORA2A или NKG2A;  
 (ii) TGF $\beta$ R2 и TIGIT, TGF $\beta$ R2 и ADORA2A, TGF $\beta$ R2 и NKG2A, CISH и TIGIT, CISH и ADORA2A, CISH и NKG2A, TIGIT и ADORA2A, TIGIT и NKG2A или ADORA2A и NKG2A; или  
 (iii) TGF $\beta$ R2, CISH и TIGIT; TGF $\beta$ R2, CISH и ADORA2A; TGF $\beta$ R2, CISH и NKG2A; TGF $\beta$ R2, TIGIT и ADORA2A; TGF $\beta$ R2, TIGIT и NKG2A; TGF $\beta$ R2, ADORA2A и NKG2A; CISH, TIGIT и ADORA2A; CISH, TIGIT и NKG2A; CISH, ADORA2A и NKG2A или TIGIT, ADORA2A и NKG2A;

необязательно где лимфоцит содержит перестроенный эндогенный локус Т-клеточного рецептора (TCR), необязательно где перестроенный TCR содержит перестройки в частях VJ TCR $\alpha$  и/или V(D)J TCR $\beta$  и полные экзоны V-домена;

необязательно где естественный рецептор цитотоксичности представляет собой NKp30, NKp44, NKp46 и/или CD158b;

необязательно где вариант IL-15R представляет собой конститутивно активный вариант IL-15R, и/или где вариант IL12-R представляет собой конститутивно активный вариант IL12-R, необязательно где конститутивно активный вариант IL-15R представляет собой продукт слияния IL-15R и агониста IL-15R (IL-15RA), и/или где конститутивно активный вариант IL-12R представляет собой продукт слияния IL-12R и агониста IL-12R (IL-12RA), необязательно где агонист IL-15R представляет собой IL-15 или его вариант, связывающий IL-15R; и/или где агонист IL-12R представляет собой IL-12 или его вариант, связывающий IL-12R; и/или

необязательно где потеря TGF $\beta$ R2 связана с экзогенной экспрессией доминантно-негативного варианта рецептора II TGF $\beta$  (DN-TGF $\beta$ R2).

4. Модифицированный лимфоцит по любому из пп.2, 3,

где два или более гена альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II выбраны из HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-DQA2 и HLA-DOA; или

где два или более гена бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II выбраны из HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DQB3, HLA-DQB2, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 и HLA-DRB5.

5. Модифицированный лимфоцит по п.3, где CAR способен связывать мезотелин, EGFR, HER2, MICA/B, BCMA, CD19, CD22, CD20, CD33, CD123, андрогенный рецептор, PSMA, PSCA, Muc1, вирусные пептиды HPV (т.е. E7), вирусные пептиды EBV, CD70, WT1, CEA, EGFRvIII, IL13R $\alpha$ 2 и GD2, CA125, CD7, EpCAM, Muc16 или CD30;

необязательно где лимфоцит происходит из плюрипотентной или мультипотентной стволовой клетки, необязательно где мультипотентная стволовая клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (HSC), плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку (ESC);

необязательно где лимфоцит происходит из плюрипотентной или мультипотентной стволовой клетки, которая содержит по меньшей мере одну или более экзогенных конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих любой из (1)(i)-(1)(ix) или любую их комбинацию; и/или по меньшей мере одно геномное изменение, которое обуславливает потерю функции любого из (2)(i)-(2)(ix) или любой их комбинации в лимфоците;

необязательно где лимфоцит происходит из плюрипотентной или мультипотентной стволовой клетки, которая содержит по меньшей мере одно геномное изменение, которое обуславливает потерю функции любого из (2)(i)-(2)(ix) или любой их комбинации в лимфоците;

необязательно где по меньшей мере одно геномное изменение, которое обуславливает потерю функции одного или более из (2)(i)-(2)(ix) в лимфоците, включает вставку экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты,

необязательно где экзогенная конструкция нуклеиновой кислоты кодирует любой из (1)(i)-(1)(ix)

или любую их комбинацию,

необязательно где лимфоцит демонстрирует потерю функции по двум или более генам/белкам, указанным в (2),

необязательно где лимфоцит содержит вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеотидной конструкции в геномный локус, несущий ген или кодирующий белок, указанные в (2),

необязательно где лимфоцит содержит вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеотидной конструкции в два или более геномных локуса, несущих ген или кодирующих белок, указанные в (2),

необязательно где лимфоцит получен путем редактирования геномного локуса с помощью РНК-направляемой нуклеазы,

необязательно где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas,

необязательно где РНК-направляемая нуклеаза выбрана из группы, состоящей из SpCas9, SaCas9, (KKH) SaCas9, AsCpf1 (AsCas12a), LbCpf1, (LbCas12a), CasX, CasY, Cas12h1, Cas12i1, Cas12c1, Cas12c2, eSpCas9, Cas9-HF1, НупаCas9, dCas9-Fok1, Sniper-Cas9, xCas9, AaCas12b, evoCas9, SpCas9-NG, VRQR, VRER, NmeCas9, CjCas9, BhCas12b и BhCas12b V4,

необязательно где лимфоцит получен путем редактирования двух или более геномных локусов, несущих гены, кодирующие любой из белков, указанных в (2),

необязательно где по меньшей мере два из двух или более геномных локусов, несущих гены, кодирующие любой из белков, указанных в (2), были отредактированы другой РНК-направляемой нуклеазой;

или где по меньшей мере один из двух или более геномных локусов, несущих гены, кодирующие любой из белков, указанных в (2), был отредактирован с помощью Cas9, и где по меньшей мере один из локусов был отредактирован с помощью Cpf1,

необязательно где модифицированный лимфоцит экспрессирует эндогенные CD56, CD49 и CD45, и/или

необязательно где лимфоцит представляет собой естественную клетку-киллера (NK).

6. Модифицированная клетка, где модифицированная клетка включает потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGFβR2) и цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH).

7. Модифицированная клетка по п.6, где модифицированная клетка дополнительно

(1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую

(i) химерный антигенный рецептор (CAR);

(ii) не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16);

(iii) интерлейкин 15 (IL-15);

(iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант;

(v) интерлейкин 12 (IL-12);

(vi) рецептор IL-12 (IL-12R) или его вариант;

(vii) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G);

(viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);

(ix) поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них; и/или

(2) демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного из

(i) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A);

(ii) Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);

(iii) микроглобулина β-2 (B2M);

(iv) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1);

(v) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СІТА);

(vi) рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров);

(vii) двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II;

(viii) кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B);

(ix) константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC);

или любой комбинации двух или более из них.

8. Модифицированная клетка по п.7, где

(A) модифицированная клетка демонстрирует потерю функции:

(i) TIGIT, ADORA2A или NKG2A;

(ii) TGFβR2 и TIGIT, TGFβR2 и ADORA2A, TGFβR2 и NKG2A, CISH и TIGIT, CISH и ADORA2A, CISH и NKG2A, TIGIT и ADORA2A, TIGIT и NKG2A или ADORA2A и NKG2A; или

(iii) TGFβR2, CISH и TIGIT; TGFβR2, CISH и ADORA2A; TGFβR2, CISH и NKG2A; TGFβR2, TIGIT и ADORA2A; TGFβR2, TIGIT и NKG2A; TGFβR2, ADORA2A и NKG2A; CISH, TIGIT и ADORA2A; CISH, TIGIT и NKG2A; CISH, ADORA2A и NKG2A или TIGIT, ADORA2A и NKG2A,

необязательно где модифицированная клетка представляет собой иммунную клетку, необязательно

где иммунная клетка представляет собой лимфоцит, необязательно где лимфоцит представляет собой НК-клетку или Т-клетку, необязательно где модифицированная клетка не экспрессирует эндогенный Т-клеточный рецептор;

(В) клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку или происходящую от нее дифференцированную дочернюю клетку, необязательно где модифицированная клетка не экспрессирует эндогенный Т-клеточный рецептор; или

(С) клетка содержит перестроенный эндогенный локус TCR, где перестроенный TCR содержит перестройки в частях VJ TCR $\alpha$  и/или V(D)J TCR $\beta$  и полные экзоны V-домена,

необязательно где модифицированная клетка экспрессирует по меньшей мере один эндогенный ген, кодирующий

(i) CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45;

(ii) Fc $\gamma$ RIII (CD16);

(iii) представителя D группы 2 белков естественных киллеров (NKG2D);

(iv) CD69;

(v) естественный рецептор цитотоксичности;

или любую комбинацию двух или более из них,

необязательно где естественный рецептор цитотоксичности представляет собой NKp30, NKp44, NKp46 и/или CD158b,

необязательно где клетка экспрессирует по меньшей мере один биомаркер NK-клеток, и/или

необязательно где биомаркер NK-клеток представляет собой CD56, CD49 и/или CD45.

9. Популяция клеток, содержащая модифицированный лимфоцит по любому из пп.1-5 или модифицированную клетку по любому из пп.6-8.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток по п.9.

11. Выделенная популяция лимфоцитов, где популяция содержит по меньшей мере  $1 \times 10^3$ , по меньшей мере  $1 \times 10^4$ , по меньшей мере  $1 \times 10^5$ , по меньшей мере  $2 \times 10^5$ , по меньшей мере  $3 \times 10^5$ , по меньшей мере  $4 \times 10^5$ , по меньшей мере  $5 \times 10^5$ , по меньшей мере  $1 \times 10^6$ , по меньшей мере  $2 \times 10^6$ , по меньшей мере  $3 \times 10^6$ , по меньшей мере  $4 \times 10^6$ , по меньшей мере  $5 \times 10^6$ , по меньшей мере  $1 \times 10^7$ , по меньшей мере  $2 \times 10^7$ , по меньшей мере  $3 \times 10^7$ , по меньшей мере  $4 \times 10^7$ , по меньшей мере  $5 \times 10^7$ , по меньшей мере  $1 \times 10^8$ , по меньшей мере  $2 \times 10^8$ , по меньшей мере  $3 \times 10^8$ , по меньшей мере  $4 \times 10^8$ , по меньшей мере  $5 \times 10^8$ , по меньшей мере  $1 \times 10^9$ , по меньшей мере  $2 \times 10^9$ , по меньшей мере  $3 \times 10^9$ , по меньшей мере  $4 \times 10^9$ , по меньшей мере  $5 \times 10^9$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $2 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $3 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $4 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  или по меньшей мере  $1 \times 10^{12}$  клеток и где по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,9%, по меньшей мере 99,99%, по меньшей мере 99,999% или практически 100% лимфоцитов в популяции

(a) содержат перестроенный локус Т-клеточного рецептора (TCR);

(b) не экспрессируют эндогенный CD3;

(c) экспрессируют эндогенные CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45; и

(d) экспрессируют, по меньшей мере, эндогенный ген, кодирующий

(i) Fc $\gamma$ RIII (CD16);

(ii) представителя D группы 2 белков естественных киллеров (NKG2D);

(iii) CD69;

(iv) естественный рецептор цитотоксичности;

или любую комбинацию двух или более из них; и

где лимфоциты включают потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGFBR2) и цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH).

12. Выделенная популяция лимфоцитов по п.11, где лимфоциты в популяции дополнительно

(1) содержат по меньшей мере одну экзогенную конструкцию экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую

(i) химерный антигенный рецептор (CAR);

(ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (Fc $\gamma$ RIII, CD16);

(iii) интерлейкин 15 (IL-15);

(iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант;

(v) интерлейкин 12 (IL-12);

(vi) рецептор IL-12 (IL-12R) или его вариант;

(vii) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G);

(viii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);

(ix) поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них; и/или

(2) демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного из

- (i) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A);
- (ii) Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);
- (iii) микроглобулина  $\beta$ -2 (B2M);
- (iv) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1);
- (v) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СИТА);
- (vi) рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров);
- (vii) двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II;
- (viii) кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B);
- (ix) константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) или любую комбинацию двух или более из них.

13. Выделенная популяция лимфоцитов по п.12, где

(А) модифицированный лимфоцит демонстрирует потерю функции:

- (i) TIGIT, ADORA2A или NKG2A;
- (ii) TGF $\beta$ R2 и TIGIT, TGF $\beta$ R2 и ADORA2A, TGF $\beta$ R2 и NKG2A, CISH и TIGIT, CISH и ADORA2A, CISH и NKG2A, TIGIT и ADORA2A, TIGIT и NKG2A или ADORA2A и NKG2A; или
- (iii) TGF $\beta$ R2, CISH и TIGIT; TGF $\beta$ R2, CISH и ADORA2A; TGF $\beta$ R2, CISH и NKG2A; TGF $\beta$ R2, TIGIT и ADORA2A; TGF $\beta$ R2, TIGIT и NKG2A; TGF $\beta$ R2, ADORA2A и NKG2A; CISH, TIGIT и ADORA2A; CISH, TIGIT и NKG2A; CISH, ADORA2A и NKG2A или TIGIT, ADORA2A и NKG2A,

необязательно где перестроенный локус TCR содержит перестройки в частях VJ TCR $\alpha$  и/или V(D)J TCR $\beta$  и полные экзоны V-домена,

необязательно где перестроенный эндогенный локус TCR состоит из не более чем двух перестроенных аллелей, или

(В) естественный рецептор цитотоксичности представляет собой NKp30, NKp44, NKp46 и/или CD158b,

необязательно где популяция не содержит более чем 1%, более чем 0,1%, более чем 0,001%, более чем 0,0001%, более чем 0,00001%, более чем 0,000001%, более чем 0,0000001%, более чем 0,00000001%, более чем 0,000000001% или более чем 0,0000000001% клеток, экспрессирующих фактор репрограммирования из экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты,

необязательно где популяция не содержит клетку, экспрессирующую фактор репрограммирования из экзогенной конструкции нуклеиновой кислоты,

необязательно где фактор репрограммирования представляет собой Oct-4 и/или Sox-2,

необязательно где популяция не содержит клетки, несущие эписомные экспрессионные конструкции, кодирующие фактор репрограммирования,

необязательно где каждая клетка в популяции клеток содержит одну и ту же комбинацию (1) и (2), и/или

необязательно где популяция клеток содержит менее чем 0,001%, менее чем 0,002%, менее чем 0,003%, менее чем 0,004%, менее чем 0,005%, менее чем 0,006%, менее чем 0,007%, менее чем 0,008%, менее чем 0,009%, менее чем 0,01%, менее чем 0,02%, менее чем 0,03%, менее чем 0,04%, менее чем 0,05%, менее чем 0,06%, менее чем 0,07%, менее чем 0,08%, менее чем 0,09%, менее чем 0,1%, менее чем 0,2%, менее чем 0,3%, менее чем 0,4%, менее чем 0,5%, менее чем 0,6%, менее чем 0,7%, менее чем 0,8%, менее чем 0,9%, менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 6%, менее чем 7%, менее чем 8%, менее чем 9% или менее чем 10% клеток, несущих хромосомную транслокацию.

14. Применение лимфоцита по любому из пп.1-5, модифицированной клетки по любому из пп.6-8, популяции клеток по п.9, фармацевтической композиции по п.10 или выделенной популяции лимфоцитов по любому из пп.11-13 в лечении заболевания у нуждающегося в этом субъекта,

где заболевание представляет собой пролиферативное заболевание.

15. Применение по п.14, где пролиферативное заболевание представляет собой рак, необязательно где рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, колоректального рака, рака желудка, почечно-клеточной карциномы (RCC) или мелкоклеточного рака легкого (NSCLC), солидной опухоли, рака мочевого пузыря, гепатоцеллюлярной карциномы, рака предстательной железы, рака яичников/матки, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, меланомы, глиобластомы, HPV-ассоциированных и/или HPV-положительных видов рака, таких как рак шейки матки и HPV+ рак головы и шеи, рака полости рта, рака глотки, рака щитовидной железы, рака желчного пузыря, видов саркомы мягких тканей и форм гематологического рака, таких как ALL, CLL, NHL, DLBCL, AML, CML или множественной миеломы (MM).

16. Способ получения лимфоцита по любому из пп.1-5, модифицированной клетки по любому из пп.6-8, популяции клеток по п.9 или выделенной популяции лимфоцитов по любому из пп.11-13, где способ включает

- (а) получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC);

(b) модификацию iPSC или ее недифференцированной или дифференцированной дочерней клетки для обеспечения экспрессии по меньшей мере одной экзогенной конструкции экспрессии нуклеиновой кислоты, указанной в (1), и/или обеспечения потери функции по меньшей мере одного гена, указанного в (2);

(c) направление дифференцировки iPSC на клетки гемопоэтической линии дифференцировки, где клетки гемопоэтической линии дифференцировки сохраняют отредактированные генетические локусы, содержащиеся в iPSC.

17. Способ по п.16, где стадия (c) включает

(i) приведение iPSC в контакт с композицией, содержащей активатор пути BMP и необязательно bFGF, для получения мезодермальных клеток; и

(ii) приведение в контакт мезодермальных клеток с композицией, содержащей активатор пути BMP, bFGF и активатор пути WNT, для получения мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный гемогенный эндотелий (HE), где мезодермальные клетки, обладающие потенциалом превращения в дефинитивный гемогенный эндотелий (HE), способны обеспечивать образование клеток гемопоэтической линии;

где мезодермальные клетки и мезодермальные клетки, обладающие потенциалом превращения в дефинитивный HE, получают на стадиях (i) и (ii) без стадии образования эмбрионидных телц;

где клетки гемопоэтической линии включают клетки дефинитивного гемогенного эндотелия, гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSC), гемопоэтические мультипотентные клетки-предшественники (MPP), клетки-предшественники пре-Т-клеток, клетки-предшественники пре-НК-клеток, клетки-предшественники Т-клеток, клетки-предшественники НК-клеток, Т-клетки, НК-клетки, NKT-клетки или В-клетки,

необязательно где стадия (c) дополнительно включает приведение мезодермальных клеток, обладающих потенциалом превращения в дефинитивный HE, в контакт с композицией, содержащей bFGF и ингибитор ROCK, с получением клеток дефинитивного HE,

необязательно где способ дополнительно включает приведение клеток дефинитивного HE в контакт с композицией, содержащей активатор BMP, и необязательно ингибитор ROCK, и один или более факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из TPO, IL3, GMCSF, EPO, bFGF, VEGF, SCF, IL6, Flt3L и IL11, с получением гемопоэтических мультипотентных клеток-предшественников (MPP),

необязательно где способ дополнительно включает приведение клеток дефинитивного HE в контакт с композицией, содержащей один или более факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L и IL7; и необязательно один или более из активатора BMP, ингибитора ROCK, TPO, VEGF и bFGF, с получением предшественников пре-Т-клеток, предшественников Т-клеток и/или Т-клеток,

необязательно где способ дополнительно включает приведение клеток дефинитивного HE в контакт с композицией, содержащей один или более факторов роста и цитокинов, выбранных из группы, состоящей из SCF, Flt3L, TPO, IL7 и IL15; и необязательно один или более из активатора BMP, ингибитора ROCK, VEGF и bFGF, с получением предшественников пре-НК-клеток, предшественников НК-клеток и/или НК-клеток,

необязательно где способ дополнительно включает:

перед стадией (c) приведение плюрипотентных стволовых клеток в контакт с композицией, содержащей ингибитор MEK, ингибитор GSK3 и ингибитор ROCK, для посева и размножения клеток, и/или

обнаружение перестроенного локуса Т-клеточного рецептора (TCR) в клетках гемопоэтической линии, необязательно где способ дополнительно включает отбор клеток гемопоэтической линии, содержащих перестроенный локус TCR, на основе связывания представляющего интерес антигена с помощью TCR, кодируемого перестроенным локусом TCR, необязательно где представляющий интерес антиген представляет собой опухолевый антиген.

18. Способ получения модифицированного лимфоцита по п.1, где способ включает репрограммирование донорской клетки до плюрипотентного состояния;

редактирование целевого локуса в геноме донорской клетки и

дифференцировку репрограммированной донорской клетки в модифицированный лимфоцит.

19. Способ по п.18, где редактирование выполняют до или во время стадии репрограммирования донорской клетки до плюрипотентного состояния,

необязательно где донорская клетка представляет собой фибробласт, клетку периферической крови, лимфоцит или Т-клетку.

20. Способ получения лимфоцита, где способ включает дифференцировку генетически модифицированной плюрипотентной стволовой клетки в лимфоцит, где генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка включает потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ R2) и цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH).

21. Способ по п.20, где генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка дополнительно содержит

(1) экзогенную конструкцию экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащую

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR);

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16);

(iii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую интерлейкин 15 (IL-15);

(iv) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант;

(v) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую интерлейкин 12 (IL-12);

(vi) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант;

(vii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G);

(viii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);

(ix) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую поверхностный лейкоцитарный антиген кластера дифференцировки CD47 (CD47);

или любую комбинацию двух или более из них; и

(2) вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты в один или несколько из следующих генетических локусов:

(i) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A);

(ii) T-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);

(iii) микроглобулина β-2 (B2M);

(iv) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1, CD279);

(v) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (CITA);

(vi) рецептора естественных клеток-киллеров NKG2A (группа 2A естественных киллеров);

(vii) двух или более генов альфа-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II

и/или двух или более генов бета-цепи антигена гистосовместимости HLA класса II;

(viii) кластера дифференцировки 32B (CD32B, FCGR2B);

(ix) константной области альфа-цепи T-клеточного рецептора (TRAC);

или любую комбинацию двух или более из них,

при этом вставка/делеция или вставка приводят к потере функции продукта гена, кодируемого соответствующим генетическим локусом или локусами.

22. Способ по п.21, где вставка/делеция или вставка экзогенной нуклеиновой кислоты находятся в следующих генетических локусах:

(i) TIGIT, ADORA2A или NKG2A;

(ii) TGFβR2 и TIGIT, TGFβR2 и ADORA2A, TGFβR2 и NKG2A, CISH и TIGIT, CISH и ADORA2A, CISH и NKG2A, TIGIT и ADORA2A, TIGIT и NKG2A или ADORA2A и NKG2A; или

(iii) TGFβR2, CISH и TIGIT; TGFβR2, CISH и ADORA2A; TGFβR2, CISH и NKG2A; TGFβR2, TIGIT и ADORA2A; TGFβR2, TIGIT и NKG2A; TGFβR2, ADORA2A и NKG2A; CISH, TIGIT и ADORA2A; CISH, TIGIT и NKG2A; CISH, ADORA2A и NKG2A или TIGIT, ADORA2A и NKG2A,

при этом вставка/делеция или вставка приводят к потере функции продукта гена, кодируемого соответствующим генетическим локусом или локусами,

необязательно где экзогенная нуклеиновая кислота, указанная в (2), представляет собой экзогенную нуклеиновую кислоту, указанную в (1), и/или

необязательно где плюрипотентная стволовая клетка представляет собой iPS-клетку, или где дифференцировка включает приведение плюрипотентных стволовых клеток в контакт со средой для дифференцировки или последовательностью сред для дифференцировки.

23. Модифицированный лимфоцит по любому из пп.1-5, где экзогенная конструкция экспрессии нуклеиновой кислоты содержит кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в (1), под контролем гетерологичного промотора.

24. Модифицированный лимфоцит по п.23, где гетерологичный промотор представляет собой промотор, специфичный в отношении NK-клеток, и/или

необязательно где промотор, специфичный в отношении NK-клеток, представляет собой

(a) промотор гена, который, как известно, экспрессируется специфически в NK-клетках, или его вариант;

(b) промотор CD56 (NCAM), CD49 или CD45 или его вариант; или

(c) промотор FcγRIII, промотор NKG2D, промотор CD69 или промотор естественного рецептора цитотоксичности или его вариант.

25. Способ лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает введение модифицированного лимфоцита по любому из пп.1-5 или 23, 24, модифицированной клетки по любому из пп.6-8 или популяции клеток по п.9 субъекту,

где субъект страдает пролиферативным заболеванием или это заболевание диагностировано у него.

26. Способ по п.25, где пролиферативное заболевание представляет собой рак, необязательно где

рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, колоректального рака, рака желудка, почечно-клеточной карциномы (RCC) или немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), солидной опухоли, рака мочевого пузыря, гепатоцеллюлярной карциномы, рака предстательной железы, рака яичников/матки, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, меланомы, глиобластомы, HPV-ассоциированных и/или HPV-положительных видов рака, таких как рак шейки матки и HPV+ рак головы и шеи, рака полости рта, рака глотки, рака щитовидной железы, рака желчного пузыря, видов саркомы мягких тканей и форм гематологического рака, таких как ALL, CLL, NHL, DLBCL, AML, CML, множественной миеломы (MM).

27. Модифицированный лимфоцит, где модифицированный лимфоцит

- (a) не экспрессирует эндогенные CD3, CD4 и/или CD8; и
- (b) экспрессирует по меньшей мере один эндогенный ген, кодирующий
  - (i) CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45;
  - (ii) рецептор NK-клеток (кластер дифференцировки 16 (CD16));
  - (iii) представителя D группы 2 белков естественных киллеров (NKG2D);
  - (iv) CD69; или

(v) естественный рецептор цитотоксичности;

или любую комбинацию двух или более из них;

где модифицированный лимфоцит включает потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ R2) и цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH), и дополнительно

(1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую

(i) химерный антигенный рецептор (CAR);

(ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (Fc $\gamma$ RIII, CD16);

(iii) интерлейкин 15 (IL-15);

(iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант;

(v) интерлейкин 12 (IL-12);

(vi) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G);

(vii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);

или любую комбинацию двух или более из них; и/или

(2) демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного из

(i) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A);

(ii) T-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);

(iii) микроглобулина  $\beta$ -2 (B2M);

(iv) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1);

(v) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СІТА);

или любую комбинацию двух или более из них.

28. Модифицированная клетка, где модифицированная клетка включает потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ R2) и цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH), и дополнительно

(1) содержит по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую

(i) химерный антигенный рецептор (CAR);

(ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (Fc $\gamma$ RIII, CD16);

(iii) интерлейкин 15 (IL-15);

(iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант;

(v) интерлейкин 12 (IL-12);

(vi) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G);

(vii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);

или любую комбинацию двух или более из них; и/или

(2) демонстрирует потерю функции по меньшей мере одного из

(i) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A);

(ii) T-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);

(iii) микроглобулина  $\beta$ -2 (B2M);

(iv) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1);

(v) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СІТА);

или любую комбинацию двух или более из них.

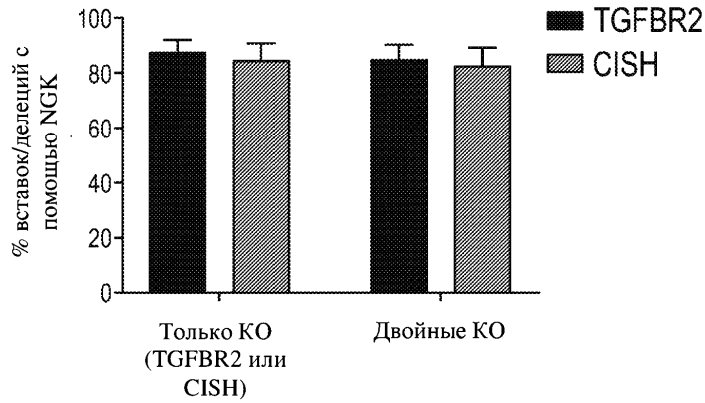
29. Выделенная популяция лимфоцитов, где популяция содержит по меньшей мере  $1 \times 10^3$ , по меньшей мере  $1 \times 10^4$ , по меньшей мере  $1 \times 10^5$ , по меньшей мере  $2 \times 10^5$ , по меньшей мере  $3 \times 10^5$ , по меньшей мере  $4 \times 10^5$ , по меньшей мере  $5 \times 10^5$ , по меньшей мере  $1 \times 10^6$ , по меньшей мере  $2 \times 10^6$ , по меньшей мере  $3 \times 10^6$ , по меньшей мере  $4 \times 10^6$ , по меньшей мере  $5 \times 10^6$ , по меньшей мере  $1 \times 10^7$ , по меньшей мере  $2 \times 10^7$ , по меньшей мере  $3 \times 10^7$ , по меньшей мере  $4 \times 10^7$ , по меньшей мере  $5 \times 10^7$ , по меньшей мере  $1 \times 10^8$ , по меньшей мере  $2 \times 10^8$ , по меньшей мере  $3 \times 10^8$ , по меньшей мере  $4 \times 10^8$ , по меньшей мере  $5 \times 10^8$ , по мень-

шей мере  $1 \times 10^9$ , по меньшей мере  $2 \times 10^9$ , по меньшей мере  $3 \times 10^9$ , по меньшей мере  $4 \times 10^9$ , по меньшей мере  $5 \times 10^9$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $2 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $3 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $4 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{10}$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  или по меньшей мере  $1 \times 10^{12}$  клеток, и где по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,9%, по меньшей мере 99,99%, по меньшей мере 99,999% или практически 100% лимфоцитов в популяции:

- (a) содержат перестроенный локус Т-клеточного рецептора (TCR);
  - (b) не экспрессируют эндогенный CD3;
  - (c) экспрессируют эндогенные CD56 (NCAM), CD49 и/или CD45; и
  - (d) экспрессируют по меньшей мере эндогенный ген, кодирующий
    - (i) рецептор NK-клеток (кластер дифференцировки 16 (CD16))
    - (ii) представителя D группы 2 белков естественных киллеров (NKG2D);
    - (iii) CD69;
    - (iv) естественный рецептор цитотоксичности;
 или любую комбинацию двух или более из них; и
    - где модифицированные лимфоциты включают потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ R2) и цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH), и дополнительно
      - (1) содержат по меньшей мере одну экзогенную конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую
        - (i) химерный антигенный рецептор (CAR);
        - (ii) не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (Fc $\gamma$ RIII, CD16);
        - (iii) интерлейкин 15 (IL-15);
        - (iv) рецептор IL-15 (IL-15R) или его вариант;
        - (v) интерлейкин 12 (IL-12);
        - (vi) человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G);
        - (vii) человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E);
 или любую комбинацию двух или более из них; и/или
      - (2) демонстрируют потерю функции по меньшей мере одного из
        - (i) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A);
        - (ii) Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);
        - (iii) микроглобулина  $\beta$ -2 (B2M);
        - (iv) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1);
        - (v) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СІТА);
 или любую комбинацию двух или более из них.
30. Способ получения лимфоцита, где способ включает дифференцировку генетически модифицированной плюрипотентной стволовой клетки в лимфоцит, где генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка включает потерю функции рецептора 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ R2) и цитокин-индуцируемого SH2-содержащего белка (CISH) и дополнительно содержит
- (1) экзогенную нуклеиновую кислоту, содержащую
    - (i) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR);
    - (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую не встречающийся в природе вариант рецептора III Fc-области иммуноглобулина гамма (Fc $\gamma$ RIII, CD16);
    - (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую интерлейкин 15 (IL-15) и/или интерлейкин 12 (IL-12);
    - (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G);
    - (v) нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E); и
  - (2) вставку/делецию или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты в один или несколько из следующих генетических локусов:
    - (i) аденозинового рецептора A2a (ADORA2A);
    - (ii) Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT);
    - (iii) микроглобулина  $\beta$ -2 (B2M);
    - (iv) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1, CD279);
    - (v) трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СІТА);
 или любую комбинацию двух или более из них,
    - при этом вставка/делеция или вставка приводят к потере функции продукта гена, кодируемого соответствующим генетическим локусом или локусами.

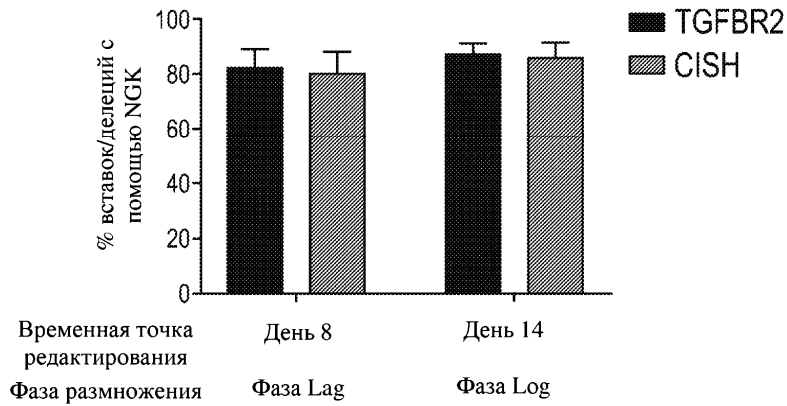


Редактирование одного и двух генов TGFBR2 и CISH  
(в среднем 5 доноров, разные временные точки размножения; планки погрешностей: SD)

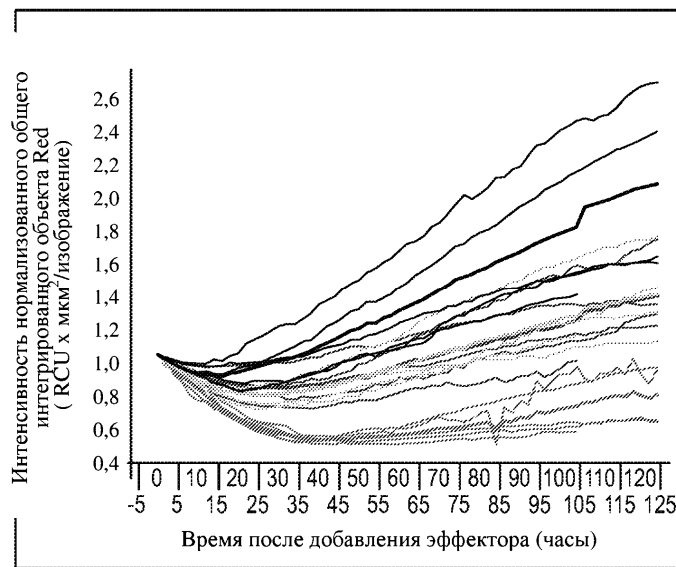


Фиг. 1А

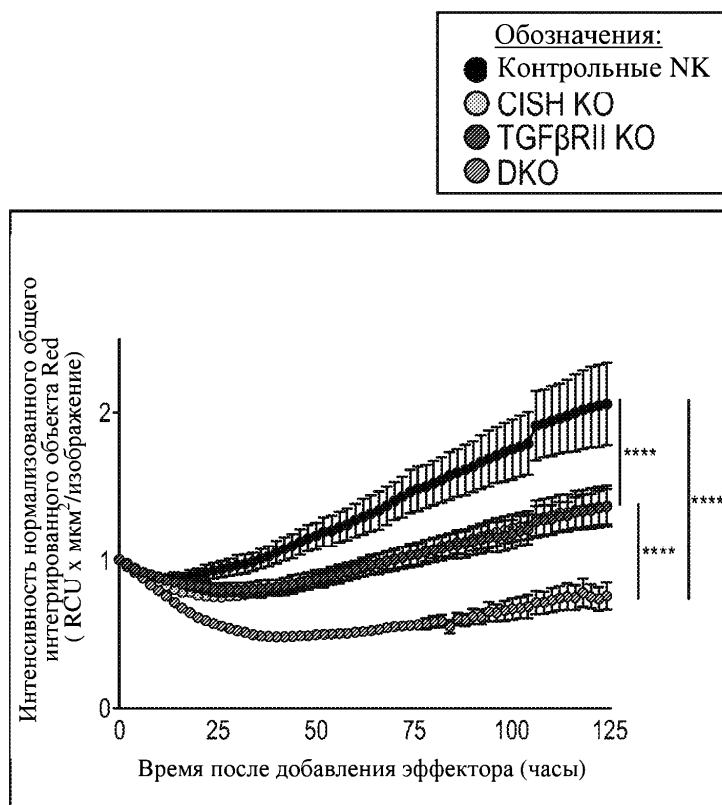
Редактирование одного и двух генов TGFBR2 и CISH в НК-клетках из разных временных точек размножения  
(в среднем 4 донора, планки погрешностей: SD)



Фиг. 1В



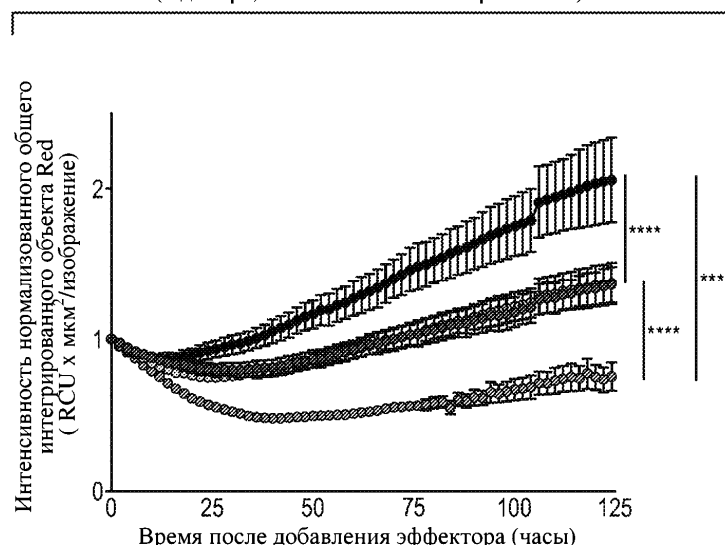
Фиг. 2А



Фиг. 2В

20:1 E:T

(3 донора, 5 независимых экспериментов)



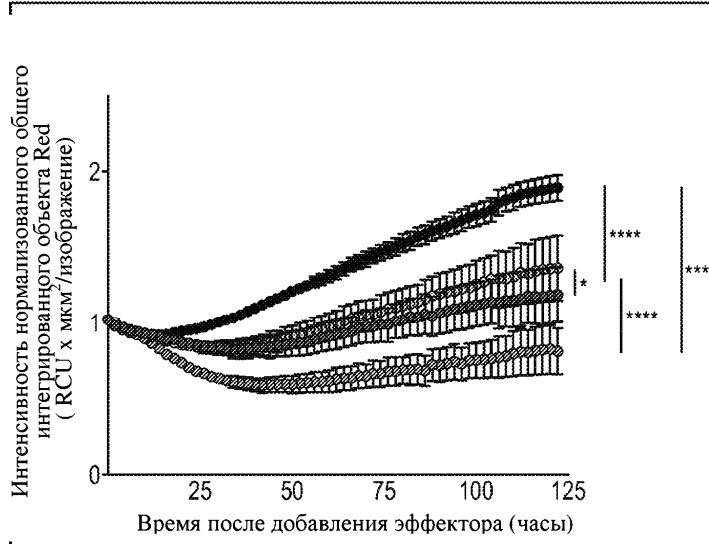
Анализ сфероидов SK-OV-3 при E:T 20:1 с 10 нг/мл TGF- $\beta$   
(3 донора, 5 независимых экспериментов)

Фиг. 3А

- Обозначения:**
- Контрольные NK
  - CISH KO
  - TGFβRII KO
  - DKO

10:1 E:T

(4 донора, 7 независимых экспериментов)

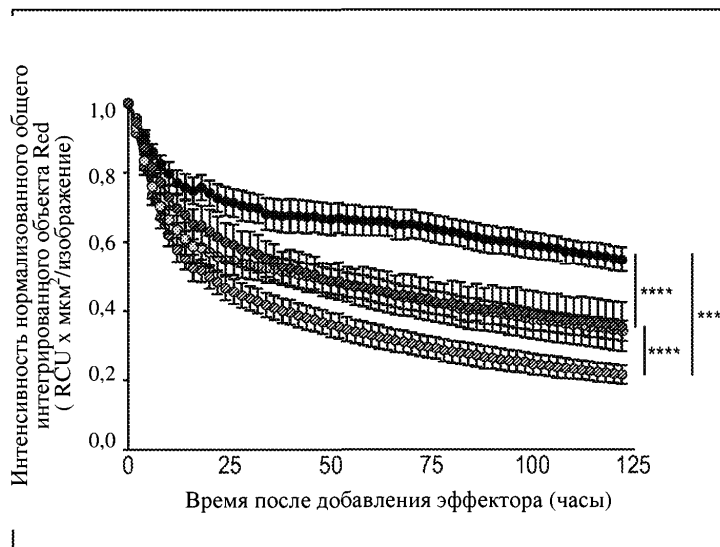


Анализ сфероидов SK-OV-3 при E:T 10:1 с 10 нг/мл TGF-β  
(4 донора, 7 независимых экспериментов)

Фиг. 3В

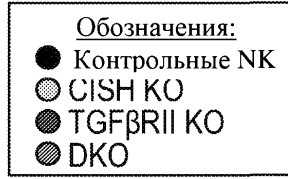
20:1 E:T

(3 донора, 5 независимых экспериментов)



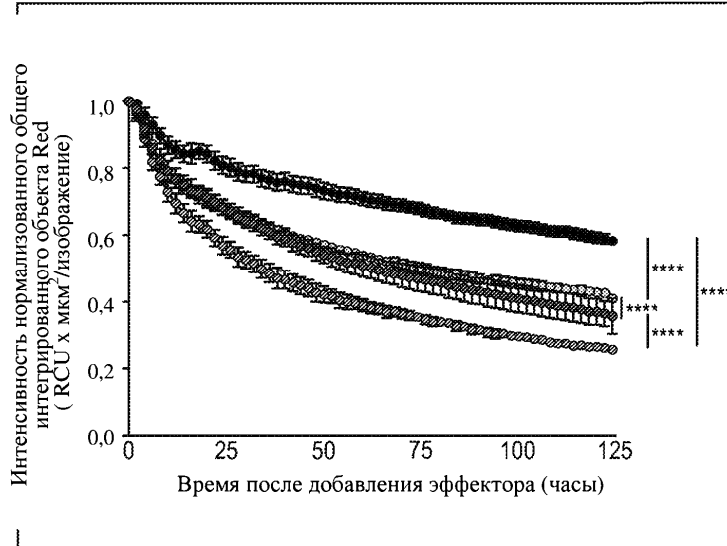
Анализ сфероидов PC-3 с 10 нг/мл TGF-β

Фиг. 4А



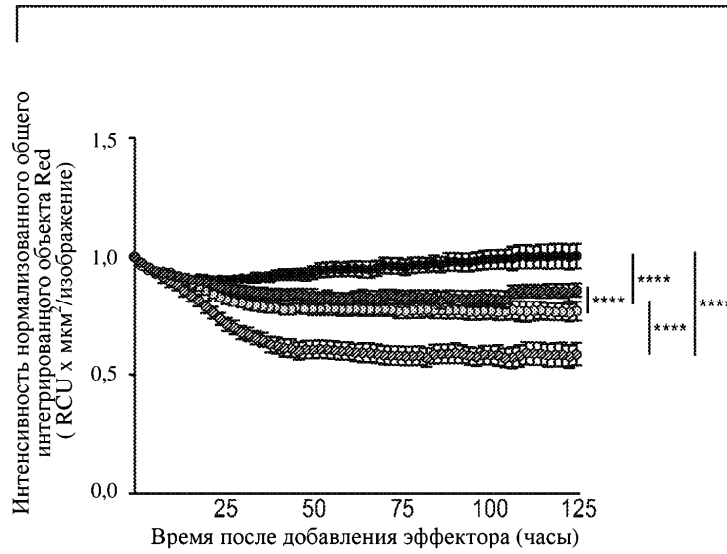
10:1 E:T

(4 донора, 7 независимых экспериментов)



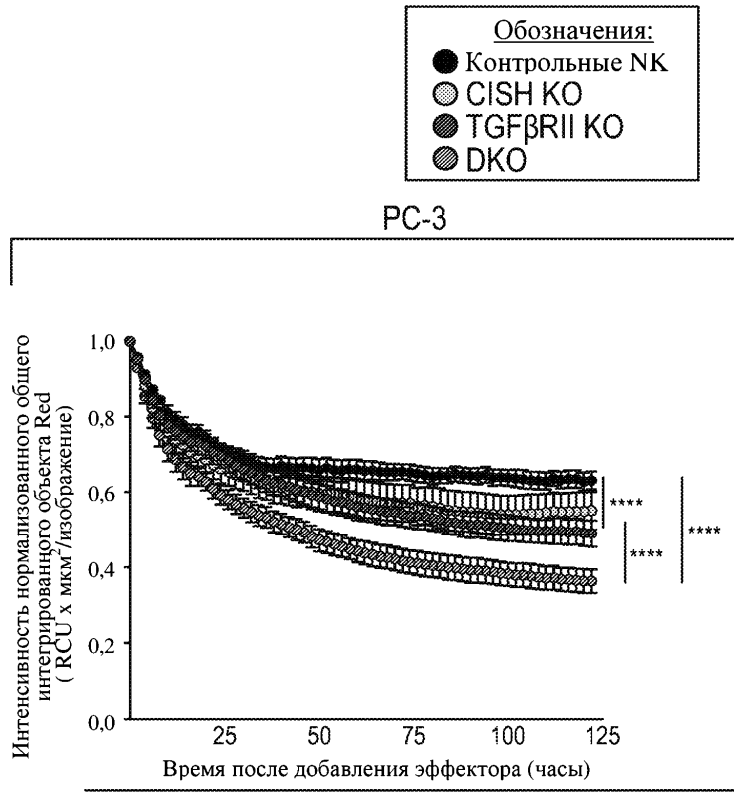
Фиг. 4В

SK-OV-3

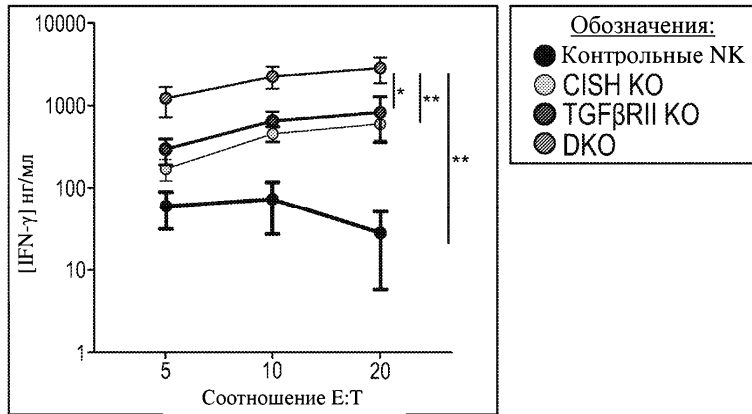


Анализ сфероидов SK-OV-3 при E:T 10:1 (без экзогенного цитокина)  
(4 донора, 7 независимых экспериментов)

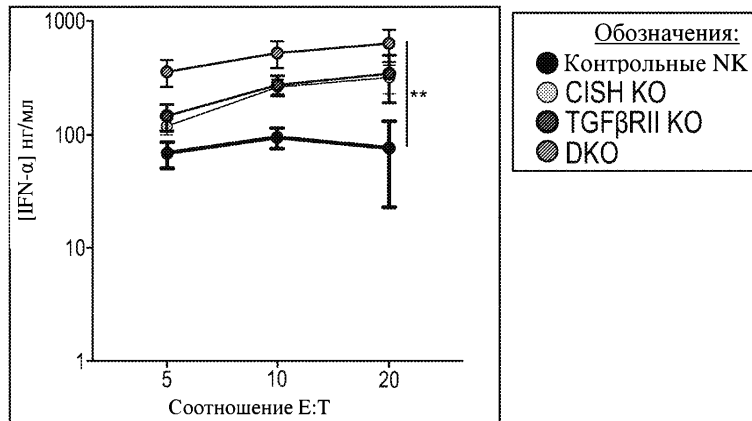
Фиг. 5А



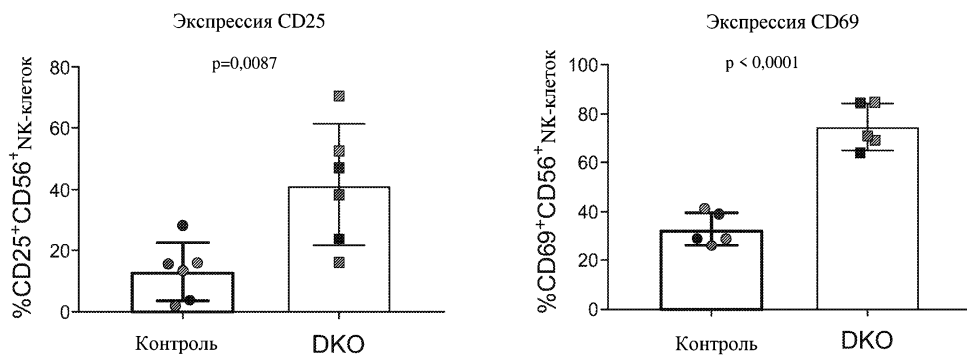
Фиг. 5В



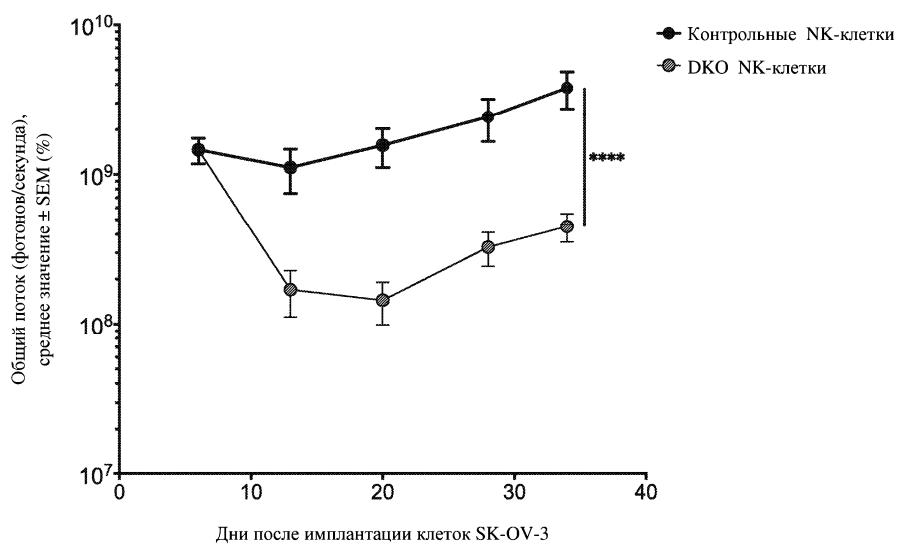
Фиг. 6А



Фиг. 6В

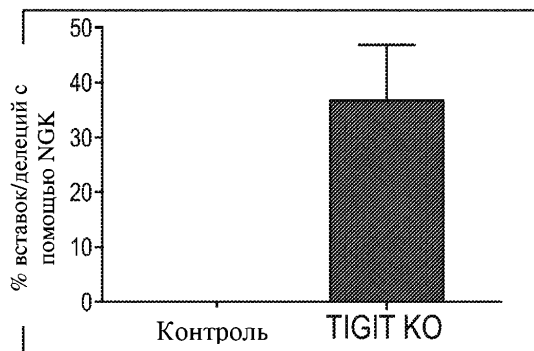


Фиг. 6С



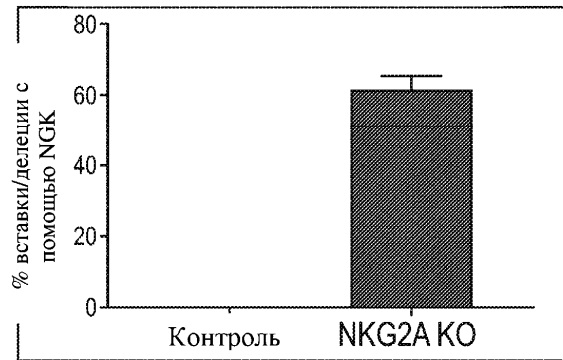
Фиг. 6D

Редактирование TIGIT в 2  
независимых экспериментах,  
3 донора



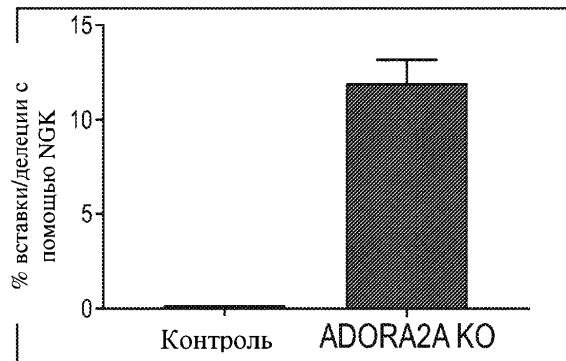
Фиг. 7А

Редактирование NKG2A в 2  
независимых экспериментах,  
3 донора

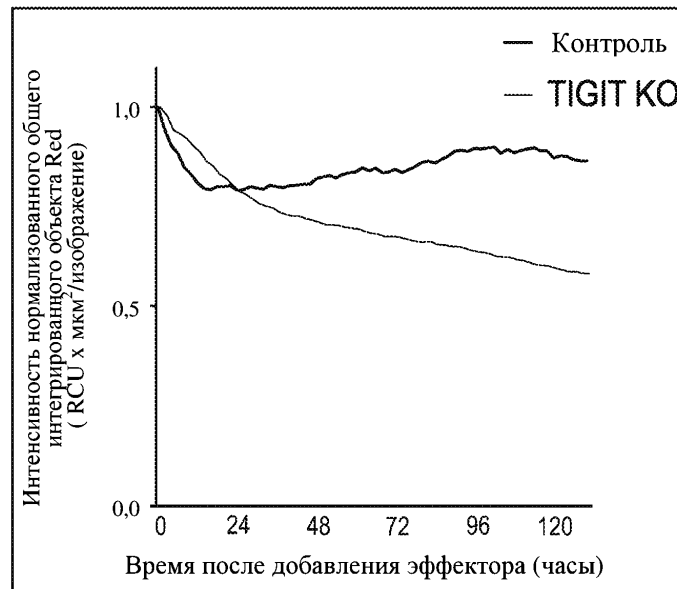


Фиг. 7B

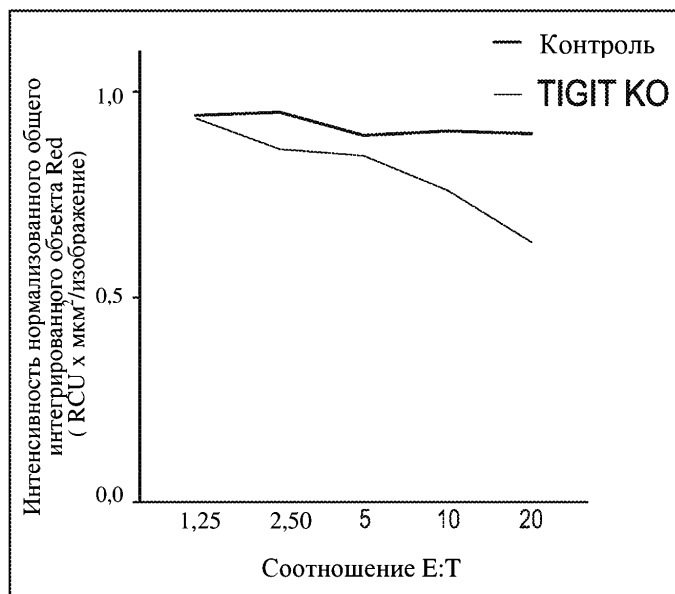
Редактирование ADORA2A в 3  
независимых экспериментах,  
3 донора



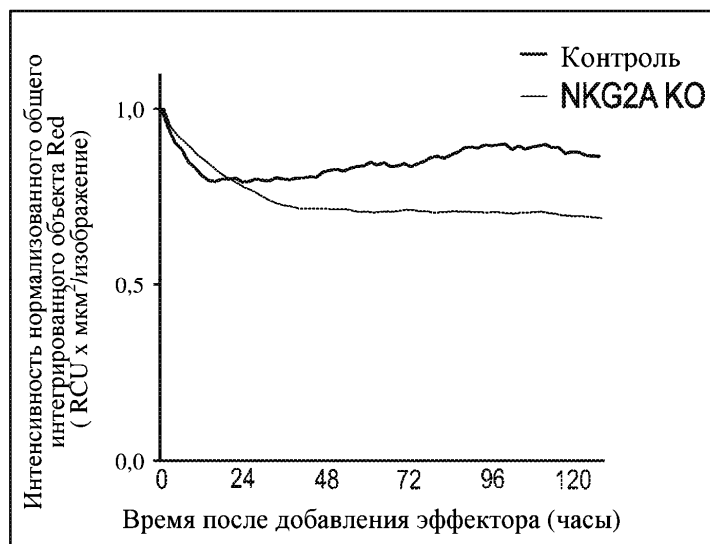
Фиг. 7C



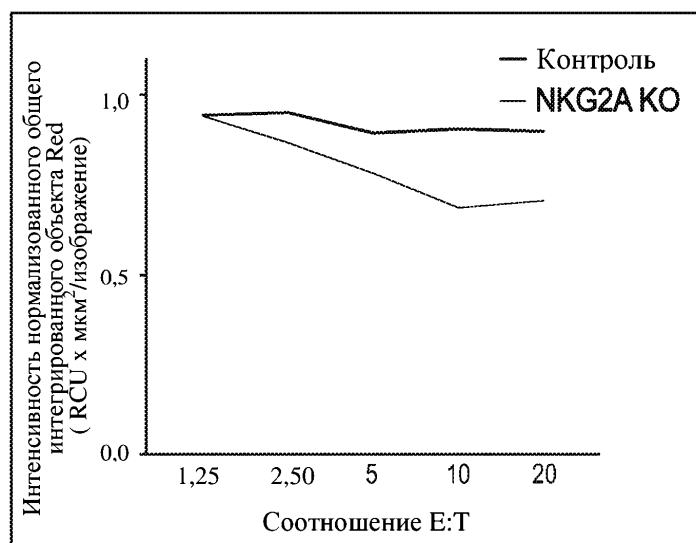
Фиг. 8A



Фиг. 8В

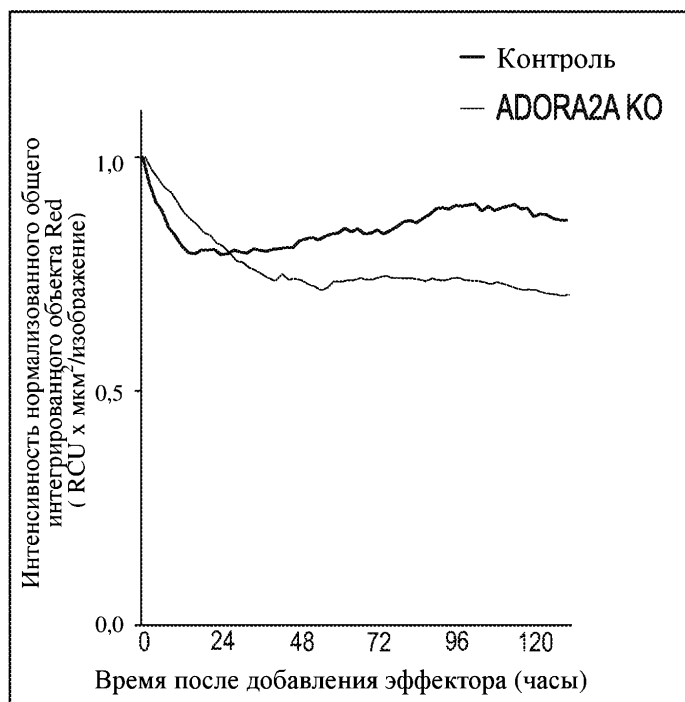


Фиг. 9А

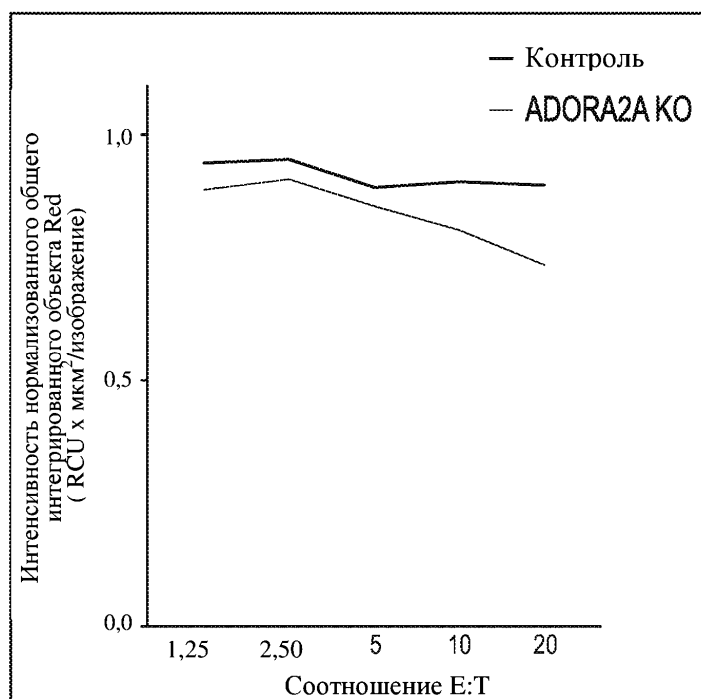


Фиг. 9В



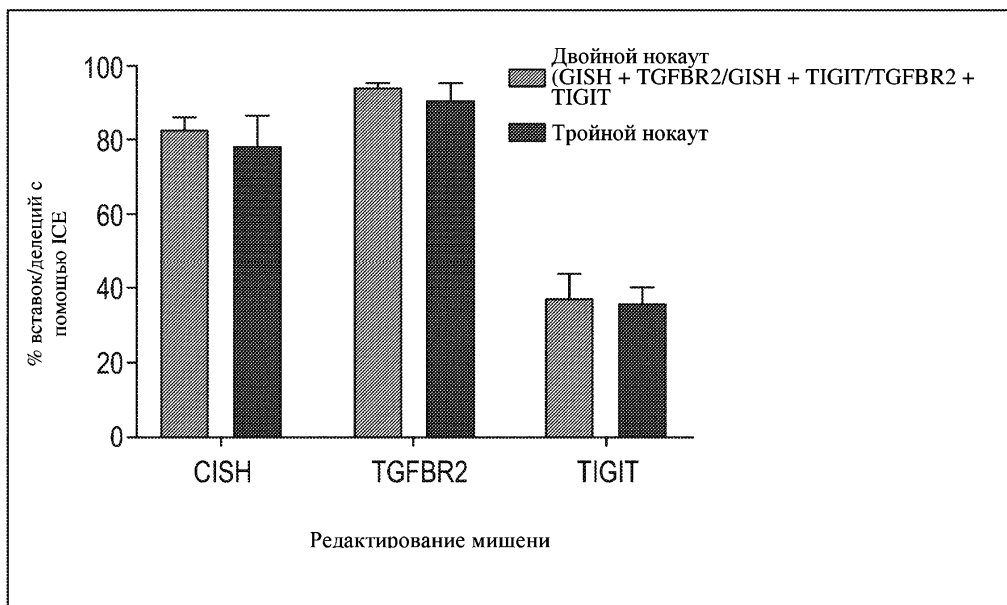


Фиг. 10А

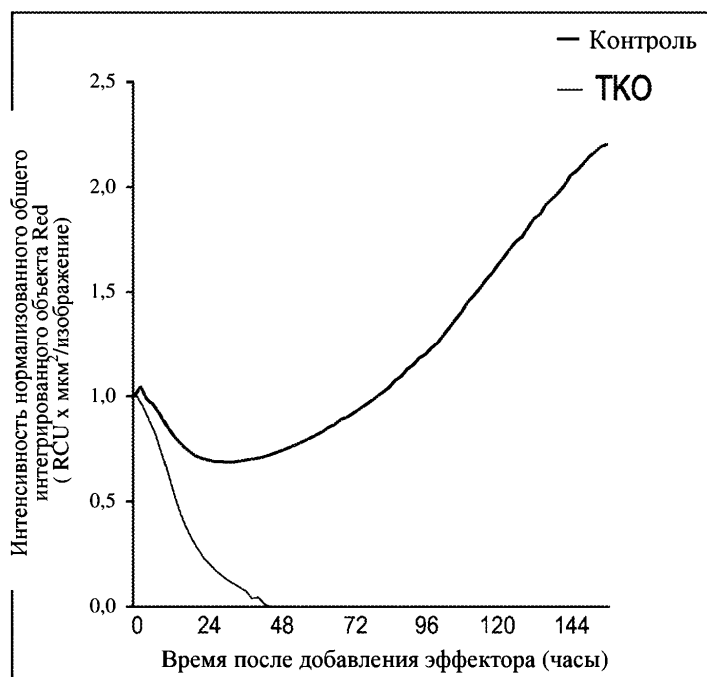


Фиг. 10В

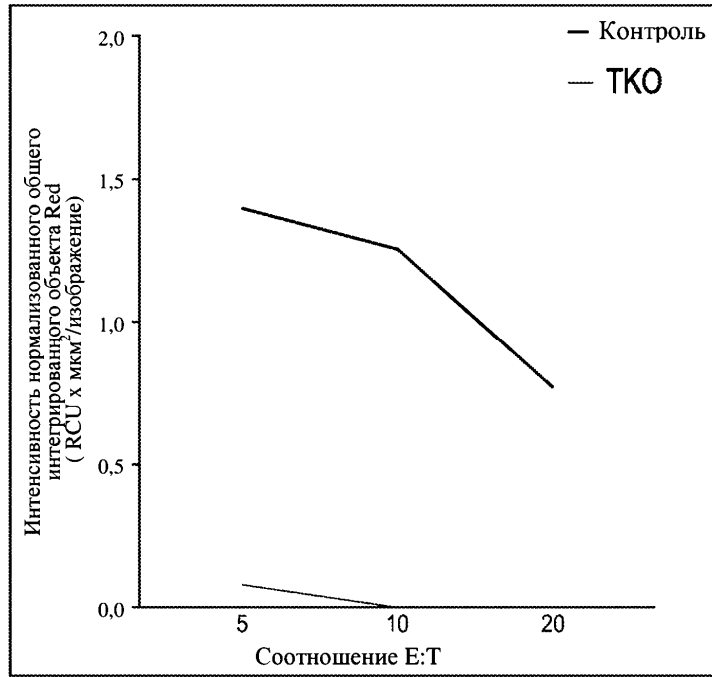
Двойное по сравнению с тройным  
редактирование CISH, TGFB2 и TIGIT в  
NK-клетках (2 донора)



Фиг. 11



Фиг. 12А



Фиг. 12В

