

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992700** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.26

(22) Дата подачи заявки
2018.06.15

(51) Int. Cl. *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) НАПРАВЛЕННОЕ РАЗРУШЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА И/ЛИ РЕЦЕПТОРА HLA

(31) 62/521,132; 62/542,052; 62/573,956

(32) 2017.06.16; 2017.08.07; 2017.10.18

(33) US

(86) PCT/US2018/037844

(87) WO 2018/232296 2018.12.20

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

(72) Изобретатель:
Конвэй Энтони, Джайн Сумити, Ли
Гэри К., Пашен Дэвид, Ребар Эдвард
Дж., Чжан Лэй (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем документе раскрыты способы и композиции для инактивации генов ТКР (Т-клеточного рецептора) и/или HLA (лейкоцитарного антигена человека) с применением сконструированных нуклеаз, содержащих по меньшей мере один ДНК-связывающий домен и домен расщепления или полудомен расщепления, в условиях, способных сохранить жизнеспособность клеток. Также предложены полинуклеотиды, кодирующие нуклеазы, векторы, которые содержат полинуклеотиды, кодирующие нуклеазы, и клетки, которые содержат полинуклеотиды, кодирующие нуклеазы, и/или клетки, которые содержат нуклеазы.

	FACS				
	D10				
	ТРАК-	B2M-	ДВОЙНОЙ-	Общий GFP+	ДВОЙНОЙ- GFP+
имитация	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0
только нокдаун ТРАК/ B2M	85.0	83.6	80.0	0.0	0.0
нокдаун ТРАК/ B2M + 1E5 вир. ген. / клетки AAu донора, locus ТРАК	91.9	92.7	89.3	80.8	83.0
нокдаун ТРАК/ B2M + 3E4 вир. ген. / клетки AAu донора, locus ТРАК	91.2	93.4	88.1	71.9	74.3
нокдаун ТРАК/ B2M + 1E5 вир. ген. / клетки AAu донора, locus B2M	88.2	90.5	86.4	54.9	59.6
нокдаун ТРАК/ B2M + 3E4 вир. ген. / клетки AAu донора, locus B2M	89.8	92.2	87.9	43.2	46.7

A1

201992700

201992700

A1

НАПРАВЛЕННОЕ РАЗРУШЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА И/ИЛИ РЕЦЕПТОРА HLA

5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/521,132, поданной 16 июня 2017 года; предварительной заявки на патент США № 62/542,052, поданной 7 августа 2017 года, и предварительной заявки на патент США № 62/573,956, поданной 18 октября 2017 года,
10 описания которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к области модификации генома клеток человека, включая лимфоциты и стволовые клетки.
15

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Генотерапия обладает огромным потенциалом в отношении начала новой эры терапевтических средств для лечения человека. Данные подходы позволят лечить состояния, которые не поддавались лечению стандартной медицинской практикой.
20 Генотерапия может включать множество разновидностей методик редактирования генома, таких как разрушение (инактивация) или коррекция локуса гена и/или вставка трансгена с возможностью экспрессии, которую можно контролировать специфичным экзогенным промотором, функционально связанным с трансгеном, или эндогенным промотором, присутствующим в участке вставки в геном.

25 [0004] Доставка и вставка трансгена являются примерами тех сложностей, которые необходимо преодолеть для любого применения данной технологии в реальной практике. Например, несмотря на то, что для терапевтического применения потенциально доступны множество способов доставки генов, все они сопряжены с существенным компромиссом между безопасностью, длительностью и уровнем
30 экспрессии. Способы, которые обеспечивают трансген в виде эписомы (например, аденовирус (Ad), аденоассоциированный вирус (AAV) и системы на основе плазмид), могут привести к высоким начальным уровням экспрессии, однако в данных способах отсутствует устойчивая эписомная репликация, что может ограничить длительность экспрессии в митотически активных тканях. Напротив, способы доставки, которые

приводят к случайной интеграции желаемого трансгена (например, интегрирующий лентивирус (LV)), обеспечивают более длительную экспрессию, но, в связи с ненаправленной природой случайной вставки, могут спровоцировать нерегулируемый рост клеток реципиента, что потенциально может привести к злокачественному новообразованию в результате активации онкогенов поблизости от случайным образом интегрированной трансгенной кассеты. Более того, несмотря на то, что интеграция трансгена позволяет избежать вызванной репликацией потери, она не предотвращает последующий сайленсинг экзогенного промотора, слитого с трансгеном. С течением времени такой сайленсинг приводит к снижению экспрессии трансгена для большинства событий неспецифичной вставки. Помимо этого, интеграция трансгена редко происходит в каждой клетке-мишени, что может затруднить достижение в достаточно высокого уровня экспрессии трансгена, представляющего интерес, для обеспечения желаемого терапевтического эффекта.

[0005] В последние годы была разработана новая стратегия генетической модификации (например, инактивации, коррекции и/или встраивания трансгена), в которой применяют расщепление сайт-специфичными нуклеазами (например, нуклеазой с доменом «цинковый палец» (zinc finger nucleases, ZFN), эффекторными доменными нуклеазами, подобными активаторам транскрипции (transcription activator-like effector domain nucleases, TALEN), системой CRISPR/Cas со сконструированной crRNA/tracrRNA (CRISPR-ПНК/транс-активационная ПНК, «одиночная направляющая ПНК»), чтобы направлять специфичное расщепление, и т.д.), для редактирования ошибок в выбранном геномном локусе. См., например, патенты США №№ 9,937,207; 9,255,250; 9,045,763; 9,005,973; 8,956,828; 8,945,868; 8,703,489; 8,586,526; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,067,317; 7,262,054; 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; публикации патентов США №№ 2017/0211075; 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2005/0064474; 2006/0063231; 2008/0159996; 2010/00218264; 2012/0017290; 2011/0265198; 2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983 и 2013/0177960 и 2015/0056705. Также направленные нуклеазы разрабатывают на основе системы Argonaute (например, из *T. thermophilus*, известной как «TtAgo», см. публикацию Swarts, *et al.* (2014) *Nature* 507(7491): 258-261), которая также может обладать потенциалом для применения при редактировании генома и генотерапии. Данный подход на основе нуклеаз для генетической модификации обеспечивает перспективу улучшенной экспрессии трансгена, повышенной безопасности и длительности экспрессии по сравнению с классическими подходами

интеграции, поскольку обеспечивает точное позиционирование трансгена для минимального риска сайленсинга гена или активации соседних онкогенов.

[0006] Т-клеточный рецептор (ТКР) представляет собой существенную часть селективной активации Т-клеток. Имея некоторое сходство с антителом, распознающая антиген часть ТКР обычно состоит из двух цепей, α и β , которые собираются с образованием гетеродимера. Подобие с антителом заключается в способе, которым формируется один ген, кодирующий комплекс ТКР альфа и бета. Каждая цепь ТКР альфа (ТКР α) и бета (ТКР β) состоит из двух областей, С-концевой константной области и N-концевой варибельной области. Геномный локус, который кодирует цепи ТКР альфа и бета, похож на локус, который кодирует антитело, тем, что ген ТКР α содержит сегменты V и J, в то время как локус β -цепи содержит, помимо сегментов V и J, D-сегменты. В случае локуса ТКР β дополнительно существуют две различные константные области, которые выбираются в ходе процесса селекции. В течение развития Т-клетки различные сегменты рекомбинируют, в результате чего каждая Т-клетка содержит уникальную варибельную часть ТКР в альфа- и бета-цепи, называемую участком, определяющим комплементарность (complementarity determining region, CDR), и организм содержит большой репертуар Т-клеток, которые, благодаря своим уникальным CDR, способны взаимодействовать с уникальными антигенами, которые экспонируются антигенпрезентирующими клетками. После того, как произошла реаранжировка гена ТКР α или β , экспрессия второго соответствующего ТКР α или ТКР β подавляется так, чтобы каждая Т-клетка экспрессировала только одну уникальную структуру ТКР, в процессе, который называют «аллельное исключение антигенного рецептора» (см. публикацию Brady, *et al.* (2010) *J Immunol* 185:3801-3808).

[0007] В течение активации Т-клетки ТКР взаимодействует с антигенами, экспонированными в виде пептидов на главном комплексе гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) антигенпрезентирующей клетки. Распознавание комплекса антиген-МНС ТКР приводит к стимуляции Т-клетки, которая в свою очередь приводит к дифференциации Т-хелперных клеток (CD4+) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) в лимфоциты памяти и эффекторные лимфоциты. Данные клетки затем могут размножаться клональным способом с образованием активированной субпопуляции в пределах популяции всех Т-клеток, способной вступать в реакцию с одним конкретным антигеном.

[0008] Белки МНС относятся к двум классам, I и II. Белки МНС класса I являются гетеродимерами двух белков: α -цепи, которая представляет собой

трансмембранный белок, кодируемый генами МНС1 класса I, и цепи β 2-микроглобулина (иногда обозначаемого B2M), который представляет собой небольшой внеклеточный белок, кодируемый геном, который находится за пределами кластера генов МНС. α -цепь сворачивается в три глобулярных домена, и, когда цепь β 2-микроглобулина присоединяется, комплекс глобулярной структуры становится функциональным и экспрессируется на поверхности клетки. Пептиды презентуются на двух наиболее N-концевых доменах, которые также являются наиболее вариабельными. Белки МНС класса II также являются гетеродимерами, но гетеродимеры содержат два трансмембранных белка, кодируемых генами в пределах комплекса МНС. Комплекс МНС класса I:антиген взаимодействует с цитотоксическими Т-клетками, тогда как МНС класса II презентует антигены хелперным Т-клеткам. Помимо этого, белки МНС класса I имеют тенденцию экспрессироваться практически во всех ядросодержащих клетках и тромбоцитах (и красных кровяных клетках у мышей), тогда как белок МНС класса II экспрессируется более селективно. Как правило, белки МНС класса II экспрессируются на В-клетках, некоторых макрофагах и моноцитах, клетках Лангерганса и дендритных клетках.

[0009] У человека главный комплекс гистосовместимости (МНС) обычно известен как лейкоцитарный антиген человека (human leukocyte antigen, HLA). Кластер генов HLA класса I у человека содержит три основных локуса: В, С и А, а также несколько меньших локусов (включая Е, G и F, все из которых присутствуют в области HLA на хромосоме 6). Кластер HLA класса II также содержит три основных локуса: DP, DQ и DR, и кластеры генов как класса I, так и класса II являются полиморфными по той причине, что в пределах популяции существует несколько различных аллелей генов как класса I, так и класса II. Также существует несколько вспомогательных белков, которые также играют роль в функционировании HLA. β 2-микроглобулин функционирует в качестве шаперона (кодируется B2M, расположен на хромосоме 15) и стабилизирует белок HLA А, В или С, экспрессированный на поверхности клетки, а также стабилизирует экспонирующую антиген бороздку на структуре класса I. В норме его обнаруживают в сыворотке и моче в небольших количествах.

[0010] HLA играет основную роль в отторжении трансплантата. Острая фаза отторжения трансплантата может возникать в течение приблизительно 1 – 3 недель и обычно включает действие Т-лимфоцитов хозяина на ткани донора по причине сенсibilизации системы хозяина к молекулам HLA класса I и класса II донора. В большинстве случаев антигенами, запускающими реакцию, являются HLA класса I.

Для достижения наибольшего успеха доноров типировать в отношении HLA и стараются достичь как можно более полного соответствия пациенту-реципиенту. Однако донорство даже между членами одной семьи, которые могут характеризоваться высоким процентом идентичности HLA, часто все еще остается неуспешным. Таким образом, чтобы сохранить трансплантированную ткань у реципиента, пациенту часто необходимо пройти сложную иммуносупрессивную терапию для предотвращения отторжения. Такая терапия может привести к осложнениям и значительной заболеваемости в связи с оппортунистическими инфекциями, которые пациенту может быть сложно побороть. Регуляция генов класса I или II может быть нарушена в присутствии некоторых опухолей, и такое нарушение может сопровождаться последствиями с точки зрения составления прогноза для пациентов. Например, снижение экспрессии B2M было обнаружено при метастазирующих типах рака толстой и прямой кишок (Shrout, *et al.* (2008) *Br J Canc* 98:1999). Поскольку B2M играет ключевую роль в стабилизации комплекса МНС класса I, было высказано предположение, что утрата B2M в определенных солидных типах рака является механизмом иммунного ускользания от управляемого Т-клетками иммунного надзора. Было показано, что подавленная экспрессия B2M является следствием подавления нормальной экспрессионной регуляции B2M ИФН (интерфероном) гамма и/или специфичных мутаций в последовательности, кодирующей B2M, что приводит к нокауту гена (Shrout, *et al.*, *там же*). В свою очередь, повышенный B2M также связан с некоторыми типами рака. Повышенные уровни B2M в моче выступают прогностическими факторами нескольких типов рака, включая рак предстательной железы, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и неходжкинские лимфомы.

[0011] Адоптивная клеточная терапия (АКТ) представляет собой развивающуюся форму противораковой терапии, основанную на доставке опухолевых специфичных иммунных клеток пациенту для того, чтобы доставленные клетки атаковали и уничтожили рак пациента. АКТ может включать применение опухолевых инфильтрующих лимфоцитов (ОИЛ), представляющих собой Т-клетки, которые выделяют из собственной опухолевой массы пациента и размножают *ex vivo* для повторного введения путем инфузии обратно пациенту. Данный подход зарекомендовал себя перспективным при лечении метастазирующей меланомы, причем в одном исследовании наблюдали уровень долгосрочного ответа, составляющий >50% (см. например, публикацию Rosenberg, *et al.* (2011) *Clin Canc Res* 17(13): 4550). ОИЛ представляют собой перспективный источник клеток, поскольку

являются смешанным набором собственных клеток пациента, которые содержат Т-клеточные рецепторы (ТКР), специфичные к опухоль-ассоциированным антигенам (ОАА), присутствующим на опухоли (Wu, *et al.* (2012) *Cancer J* 18(2):160). Другие подходы включают редактирование Т-клеток, выделенных из крови пациента, чтобы сконструировать их с обеспечением возможности некоторым образом реагировать на опухоль (Kalos, *et al.* (2011) *Sci Transl Med* 3(95):95ra73).

[0012] Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой молекулы, предназначенные для нацеливания иммунных клеток на специфичные молекулярные мишени, экспрессированные на поверхностях клеток. В своей наиболее основной форме они представляют собой рецепторы, введенные в клетку, которые объединяют домен специфичности, экспрессированный за пределами клетки, с путями передачи сигналов на внутренней стороне клетки, в результате чего, когда домен специфичности взаимодействует со своей мишенью, клетка становится активированной. Часто CAR получают в результате имитации функциональных доменов Т-клеточных рецепторов (ТКР), в которых антиген-специфичный домен, такой как scFv или некоторый тип рецептора, слит с сигнальным доменом, таким как ITAM и другие костимулирующие домены. Данные конструкции затем вводят в Т-клетку *ex vivo*, позволяя Т-клетке стать активированной в присутствии клетки, экспрессирующей антиген-мишень, что приводит к атаке активированной Т-клетки на клетку-мишень способом, не зависящим от МНС (см. публикацию Chicaybam, *et al.* (2011) *Int Rev Immunol* 30:294-311), когда Т-клетку повторно вводят пациенту. Таким образом, адоптивная клеточная терапия с применением Т-клеток, измененных *ex vivo* со сконструированным ТКР или CAR, является весьма перспективным клиническим подходом при многих типах заболеваний. Например, типы рака и их антигены, нацеливание на которые проводят, включают фолликулярную лимфому (CD20 или GD2), нейробластому (CD171), неходжкинскую лимфому (CD19 и CD20), лимфому (CD19), глиобластому (IL13R α 2), хронический лимфоцитарный лейкоз, или ХЛЛ, и острый лимфоцитарный лейкоз, или ОЛЛ (оба CD19). Также были разработаны вирус-специфичные CAR, чтобы атаковать клетки, несущие вирус, такой как ВИЧ (вирус иммунодефицита человека). Например, было начато клиническое исследование с применением CAR, специфичного к Gp100, для лечения ВИЧ (Chicaybam, *там же*).

[0013] ACTR (Antibody-coupled T-cell Receptors, Т-клеточные рецепторы, связывающиеся с антителами) представляют собой сконструированные компоненты Т-клеток, способные связываться с экзогенно поступающим антителом. Связывание

антитела с компонентом АСТР стимулирует Т-клетки взаимодействовать с антигеном, распознанным антителом, и, когда данный антиген встречается, содержащие АСТР Т-клетки запускаются для взаимодействия с антигеном (см. публикацию патента США № 2015/0139943).

- 5 [0014] Однако одним из недостатков адоптивной клеточной терапии является то, что источник клеточного продукта должен быть пациент-специфичным (аутологическим) во избежание потенциального отторжения трансплантированных клеток. Это вынудило исследователей разработать способы редактирования собственных Т-клеток пациента во избежание данного отторжения. Например, с Т-клетками пациента или гемопоэтическими стволовыми клетками можно манипулировать *ex vivo* с добавлением сконструированного CAR, АСТР и/или Т-клеточного рецептора (ТКР), а затем дополнительно обработать сконструированными нуклеазами, чтобы вызвать нокаут ингибиторов контрольных точек Т-клеток, таких как PD1 и/или CTLA4 (см. международную публикацию патента № WO 2014/059173). Для
- 10 применения данной технологии на большей популяции пациентов будет характеризоваться преимуществом разработка универсальной популяции клеток (аллогенных). Помимо этого, нокаут ТКР приведет к получению клеток, не способных после введения пациенту вызывать ответ по типу реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ).
- 15 [0015] Таким образом, сохраняется потребность в способах и композициях, которые можно применять, чтобы модифицировать (например, вызвать нокаут) экспрессию ТКР и/или HLA в эффекторных Т-клетках, регуляторных Т-клетках, В-клетках, клетках НК (природных киллерах) или стволовых клетках (например, гемопоэтических стволовых клетках, индуцированных плюрипотентных стволовых
- 20 клетках и эмбриональных стволовых клетках).
- 25

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- [0016] В настоящем документе раскрыты композиции и способы для частичной или полной инактивации либо разрушения гена ТКР и/или В2М и композиции и
- 30 способы для введения и экспрессии на желаемых уровнях экзогенных трансгенов в Т-лимфоцитах после разрушения эндогенного ТКР и/или В2М или одновременно с ним. Также в настоящем документе предложены способы и композиции для делетирования (инактивации) или репрессии гена ТКР и/или В2М для получения ТКР-«ноль» Т-клеток или ТКР- и HLA класса I-«ноль» Т-клеток, В-клеток, НК-клеток, стволовой

клетки, ткани или целого организма, например, клетки, которая не экспрессирует на своей поверхности один или более Т-клеточных рецепторов и/или один или более рецепторов HLA класса I. В ТКР- и/или HLA класса I-«ноль» клетках, описанных в настоящем документе, могут присутствовать дополнительные геномные модификации, включая, без ограничения, геномные модификации в другом гене (например, гене запрограммированной гибели клеток 1 (programmed death 1, PD1), гене антигена цитотоксического Т-лимфоцита 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CTLA-4), гене CISH, гене tet2, гене лейкоцитарного антигена человека (HLA) A, гене HLA B, гене HLA C, гене HLA-DPA, гене HLA-DQ, гене HLA-DRA, гене LMP7, гене транспортера, связанного с процессингом антигена (Transporter associated with Antigen Processing, TAP), 1, гене TAP2, гене тапасина (TAPBP), гене трансаактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СИТА), гене глюкокортикоидного рецептора (glucocorticoid receptor, GR), гене IL2RG, гене RFX5), вставку трансгена (например, CAR) в один или более данных либо других генов (например, в гены зоны безопасности) и любую комбинацию таких геномных модификаций. В определенных вариантах реализации ТКР-«ноль» клетки и/или HLA класса I-«ноль» клетки или ткани представляют собой клетки или ткани человека, которые характеризуются преимуществом при применении в трансплантации. В предпочтительных вариантах реализации ТКР-«ноль» Т-клетки и/или HLA класса I-«ноль» клетки получают для применения в адоптивной Т-клеточной терапии.

[0017] В одном аспекте в настоящем документе описана нуклеаза с цинковым пальцем, содержащая: ZFP (zinc finger protein, белок с цинковым пальцем) из ZFN, обозначенной 68957, 72678, 72732 или 72748; сконструированный домен расщепления FokI; и линкер между доменом расщепления FokI и ZFP. В определенных вариантах реализации ZFN содержит первую и вторую ZFN следующим образом (аминокислотные и полинуклеотидные последовательности раскрыты в примерах): ZFN, содержащая ZFP из ZFN, обозначенной 72678, и ZFN, содержащая ZFP из ZFN, обозначенной 72732. В определенных вариантах реализации ZFN содержит левую и правую (первую и вторую) ZFN следующим образом: ZFN, обозначенную 57531, и ZFN, обозначенную 72732; ZFN, обозначенную 57531, и ZFN, обозначенную 72748; ZFN, обозначенную 68957, и ZFN, обозначенную 57071; ZFN, обозначенную 68957, и ZFN, обозначенную 72732; ZFN, обозначенную 68957, и ZFN, обозначенную 72748; ZFN, обозначенную 72678, и ZFN, обозначенную 57071; ZFN, обозначенную 72678, и ZFN, обозначенную 72732; и содержащую ZFP ZFN, обозначенной 72678, и ZFN,

обозначенной 727482. Нуклеаза с цинковым пальцем (ZFN) содержит левую и правую (первую и вторую) ZFN следующим образом: ZFN, обозначенную 68796, и ZFN, обозначенную 68813; ZFN, обозначенную 68796, и ZFN, обозначенную 68861; ZFN, обозначенную 68812, и ZFN, обозначенную 68813; ZFN, обозначенную 68876, и ZFN, обозначенную 68877; ZFN, обозначенную 68815, и ZFN, обозначенную 55266; ZFN, обозначенную 68879, и ZFN, обозначенную 55266; ZFN, обозначенную 68798, и ZFN, обозначенную 68815; или ZFN, обозначенную 68846, и ZFN, обозначенную 53853. Также предложены полинуклеотиды (например, мРНК, плазмиды, вирусные векторы и т.д.), кодирующие ZFN (включая пару), как раскрыто в настоящем документе, включая полинуклеотид, содержащий последовательность 2A между последовательностями, кодирующими левую и ZFN. Также раскрыты генетически модифицированные клетки (например, стволовые клетки, клетки-предшественницы, Т-клетки (эффекторные и регуляторные) и т.д.), содержащие одну или более ZFN и/или полинуклеотидов, раскрытых в настоящем документе, и клетки, происходящие из данных клеток (например, генетически модифицированные клетки, которые не содержат ZFN, но содержат генетическую модификацию). Генетические модификации включают вставки, делеции и их комбинации в гене, на который направлена ZFN. В локусе-мишени и/или одном или более отличных локусах могут присутствовать дополнительные геномные модификации, например, модификация гена Т-клеточного рецептора (ТКР), модификация гена HLA-A, модификация гена HLA-B, модификация гена HLA-C, модификация гена TAP, модификация гена CTLA-4, модификация гена PD1, модификация гена CISH, модификация гена tet-2 и/или вставка трансгена (например, CAR). Также предложены фармацевтические композиции, содержащие любую из нуклеаз с цинковым пальцем, полинуклеотидов и/или клеток, описанных в настоящем документе. Также предложены способы модификации гена эндогенного бета-2-микроглобулина (B2M) и/или ТКР в клетке, причем указанный способ включает введение полинуклеотида или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе, в клетку так, чтобы эндогенный ген стал модифицированным (например, делецией, вставкой эндогенной последовательности, такой как трансген). Также предложены способы применения ZFN, полинуклеотидов, клеток и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, для лечения и/или предотвращения рака, аутоиммунного заболевания или реакции трансплантат против хозяина. Также предложены наборы, содержащие любые из ZFN, полинуклеотидов, клеток и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе.

[0018] В других аспектах в настоящем документе описана выделенная клетка (например, эукариотическая клетка, такая как клетка млекопитающего, включая лимфоидную клетку, стволовую клетку (например, иПСК – индуцированную плюрипотентную стволовую клетку, эмбриональную стволовую клетку, МСК – мезенхимальную стволовую клетку или ГСК – гемопоэтическую стволовую клетку) либо прогениторную клетку или клетку-предшественницу), в которой экспрессия гена ТКР модулирована путем модификации экзонных последовательностей гена ТКР. В определенных вариантах реализации модификация относится к последовательности, содержащей последовательность из 9 – 25 (включая сайты-мишени из 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25) или более нуклеотидов (непрерывных или не непрерывных) последовательности, представленной в сайтах-мишенях в настоящем документе) сайта-мишени, представленной в одной или более из таблиц 1, 2 или 6 (SEQ ID NO: 8-21 и/или 92-103); в пределах 1 – 5, в пределах 1 – 10 или в пределах 1 – 20 пар оснований с обеих сторон (фланкирующая геномная последовательность) сайтов-мишеней, представленных в таблицах 1, 2 или 6 (SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103); или в пределах AACAGT, AGTGCT, CTCCT, TTGAAA, TGGACTT и AATCCTC или сайта-мишени, содержащего AACAGT, AGTGCT, CTCCT, TTGAAA, TGGACTT и AATCCTC. В качестве альтернативы или дополнительно, модификации можно также осуществить в последовательностях (например, геномных последовательностях) между спаренными сайтами-мишенями, описанными в настоящем документе (например, сайтами-мишенями для пар нуклеаз, представленных в таблице 3, включая между сайтами-мишенями для 55204 и 53759 (между SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9); между сайтами-мишенями для 55229 и 53785 (между SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11); между сайтами-мишенями для 53810 и 55255 (между SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13); между сайтами-мишенями, представленными для 55248 и 55254/55260 (между SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:13); между сайтами-мишенями для 55266 и 53853 (между SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:16); между сайтами-мишенями для 53860 и 53863 (между SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:18); между сайтами-мишенями для 53856 и 55287 (между SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:18); или между сайтами-мишенями для 53885 или 52774 и 53909 или 52742 (между SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20). Модификацию можно осуществлять с помощью экзогенной молекулы слияния, содержащей функциональный домен (например, транскрипционный регуляторный домен, домен нуклеазы, включая любой домен расщепления FokI с одной или более мутациями по сравнению с диким типом), и ДНК-связывающий домен, включая, без ограничения: (i) клетку, которая содержит

экзогенный фактор транскрипции, содержащий ДНК-связывающий домен, который связывается с сайтом-мишенью, представленным в любой из SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103, и транскрипционный регуляторный домен, в котором фактор транскрипции модифицирует экспрессию гена TRAC, и/или (ii) клетку, содержащую вставку и/или делецию в пределах одного или более сайтов-мишеней, представленных в настоящем документе, включая SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103; в пределах 1 – 5, в пределах 1 – 10 или в пределах 1 – 20 пар оснований с обеих сторон (фланкирующая геномная последовательность) сайтов-мишеней, представленных в таблицах 1 и 2 (SEQ ID NO: 8-21 и/или 92-103); в пределах AACAGT, AGTGCT, CTCCT, TTGAAA, TGGACTT и AATCCTC; и/или между спаренными сайтами-мишенями, описанными в настоящем документе (например, сайтами-мишенями для пар нуклеаз, представленных в таблице 3). Также описаны клетки, содержащие данные модификации в гене или генах ТКР и дополнительные генетические модификации (например, модификацию гена B2M, модификации гена CTLA, CISH, PD1 и/или tet2, CAR, антиген-специфичный ТКР (альфа- и бета-цепи), вставки в данные или другие локусы, включая трансген, кодирующий Т-клеточный рецептор, связывающийся с антителами (ACTR), и/или трансген, кодирующий антитело, и т.д.).

[0019] В другом аспекте в настоящем документе описана выделенная клетка (например, эукариотическая клетка, такая как клетка млекопитающего, включая лимфоидную клетку, стволовую клетку (например, иПСК, эмбриональную стволовую клетку, МСК или ГСК) либо прогениторную клетку или клетку-предшественницу), в которой экспрессия гена B2M модулирована путем модификации гена B2M. В определенных вариантах реализации модификация относится к последовательности, содержащей последовательность из 9 – 25 (включая сайты-мишени из 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25) или более нуклеотидов (непрерывных или не непрерывных) последовательности, представленной в сайтах-мишенях в настоящем документе) сайта-мишени, представленного в одной или более из таблиц 5 и 8 (SEQ ID NO:117, 123, 126 и/или 127); в пределах 1 – 5, в пределах 1 – 10 или в пределах 1 – 20 пар оснований с обеих сторон (фланкирующая геномная последовательность) сайтов-мишеней, представленных в таблицах 5 и 8 (SEQ ID NO:117, 123, 126 и/или 127). В качестве альтернативы или дополнительно, модификации можно также осуществить в последовательностях (например, геномных последовательностях) между спаренными сайтами-мишенями, описанными в настоящем документе (например, сайтами-мишенями для пар нуклеаз, представленными в таблицах 5 и 8, включая между

сайтами-мишенями, представленными в таблице 8 (SEQ ID NO:126 и 127). Модификацию можно осуществить с помощью экзогенной молекулы слияния, содержащей функциональный домен (например, транскрипционный регуляторный домен, домен нуклеазы, включая любой домен расщепления FokI с одной или более мутациями по сравнению с диким типом) и ДНК-связывающий домен (например, ZFP, как представлено в таблице 8 (компонент ZFP (варианты дизайна) ZFN, обозначенных 72732; 72748; 68957; или 72678), включая, без ограничения: (i) клетку, которая содержит экзогенный фактор транскрипции, содержащий ДНК-связывающий домен, который связывается с сайтом-мишенью, представленным в любой из таблиц 5 или 8 (например, SEQ ID NO:126 или 127), и транскрипционный регуляторный домен, в котором фактор транскрипции модифицирует экспрессию гена B2M, и/или (ii) клетку, содержащую вставку и/или делецию в пределах одного или более сайтов-мишеней, представленных в настоящем документе, включая таблицы 5 и 8; в пределах 1 – 5, в пределах 1 – 10 или в пределах 1 – 20 пар оснований с обеих сторон (фланкирующая геномная последовательность); и/или между спаренными сайтами-мишенями, описанными в настоящем документе (например, сайтами-мишенями для пар нуклеаз, представленных в таблице 8). Также описаны клетки, содержащие данные модификации в генах B2M и дополнительные генетические модификации (например, модификацию гена ТКР, модификации гена CTLA, CISH, PD1 и/или tet2, модификацию PD1, вставку CAR, антиген-специфичный ТКР (альфа- и бета-цепи), вставки в данные или другие локусы, включая трансген, кодирующий Т-клеточный рецептор, связывающийся с антителами (ACTR), и/или трансген, кодирующий антитело, и т.д.).

[0020] Клетки с модифицированным ТКР и/или B2M, описанные в настоящем документе, могут содержать дополнительные модификации, например, один или более инактивированных генов Т-клеточного рецептора в клетках с модифицированным B2M, дополнительные инактивированные гены ТКР, ген PD1 и/или CTLA4, и/или трансген, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), трансген, кодирующий Т-клеточный рецептор, связывающийся с антителами (ACTR), и/или трансген, кодирующий антитело. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие любую клетку, описанную в настоящем документе, а также способы применения клеток и фармацевтических композиций в вариантах терапии *ex vivo* для лечения нарушения (например, рака) у субъекта. В определенных вариантах реализации предложена популяция клеток, содержащая одну или более модификаций

(редактирования ТКР, редактирования B2M, редактирования PD1, редактирования CISH, tet2 и/или CTLA4, редактирования гена HLA класса I и/или вставки трансгена (например, CAR) в данные или другие гены и т.д.), описанных в настоящем документе, включая популяцию клеток, в которой менее 5% (например, 0 – 5% или любое значение между ними), предпочтительно, менее 3%, еще более предпочтительно, менее 2% клеток содержат любые другие модификации (например, модификации в нецелевых сайтах). В определенных вариантах реализации популяция клеток содержит модификации в нецелевых сайтах на фоновых уровнях (например, в 2 – 10 раз меньше (или любое значение между ними)) по сравнению с клетками, модифицированными с помощью ZFN, которые не являются модифицированными, описанных в настоящем документе (причем немодифицированные ZFN также обозначаются «родитель» или «родительские» ZFN). Модификации, осуществленные с помощью ZFN, являются наследуемыми в том смысле, что *in vivo* или в культуре клетки, происходящие (включая дифференцированные клетки) из клеток, содержащих ZFN (и модификации), содержат модификации, описанные в настоящем документе.

[0021] Таким образом, в одном аспекте в настоящем документе описаны клетки, в которых экспрессия гена ТКР была модулирована (например, активирована, подавлена или инактивирована). В предпочтительных вариантах реализации экзонные последовательности гена ТКР были модулированы. Модуляцию можно осуществить с помощью экзогенной молекулы (например, сконструированного фактора транскрипции, содержащего ДНК-связывающий домен и транскрипционный домен активации или репрессии), который связывается с геном ТКР и регулирует экспрессию ТКР, и/или с помощью модификации последовательности гена ТКР (например, с применением нуклеазы, которая расщепляет ген ТКР и модифицирует последовательность гена с помощью вставок и/или делеций), включая, например, ZFN (например, пару ZFN из левой и правой ZFN), как представлено в таблице 6. В некоторых вариантах реализации описаны клетки, которые содержат сконструированную нуклеазу, чтобы вызвать нокаут гена ТКР. В других вариантах реализации описаны клетки, которые содержат сконструированный фактор транскрипции (ФТ), в результате чего экспрессия гена ТКР была модулирована. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой Т-клетки. Также описаны клетки, в которых экспрессия гена ТКР была модулирована, и причем клетки дополнительно были сконструированы так, чтобы содержать по меньшей мере один экзогенный трансген и/или дополнительный нокаут по меньшей мере одного

эндогенного гена (например, гена бета 2-микроглобулина (B2M) и/или иммунологической контрольной точки, такой как PD1 и/или CTLA4) или их комбинации.

[0022] В другом аспекте в настоящем документе описаны клетки, в которых экспрессия гена B2M была модулирована (например, активирована, подавлена или инактивирована). Модуляцию можно осуществить с помощью экзогенной молекулы (например, сконструированного фактора транскрипции, содержащего ДНК-связывающий домен и транскрипционный домен активации или репрессии), которая связывается с геном B2M и регулирует экспрессию B2M, и/или с помощью модификации последовательности гена B2M (например, с применением нуклеазы, которая расщепляет ген B2M и модифицирует последовательность гена с помощью вставок и/или делеций), включая, например, ZFN (например, пару ZFN из левой и правой ZFN), как представлено в таблице 8, или ZFN, содержащей ZFP, которая характеризуется дизайном (участок спирали распознавания и остов ZFP в ZFN, обозначенных 72732; 72748; 68957; или 72678), описанным в настоящем документе (например, таблица 8), в сочетании с любым доменом FokI (дикого типа или сконструированным) и необязательно – с любым линкером между доменом FokI и ZFP (например, L0, N7a, N7c и т.д.). В некоторых вариантах реализации описаны клетки, которые содержат сконструированную нуклеазу, чтобы вызвать нокаут гена B2M. В других вариантах реализации описаны клетки, которые содержат сконструированный фактор транскрипции (ФТ), в результате чего экспрессия гена B2M была модулирована. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой Т-клетки, включая эффекторные Т-клетки и регуляторные Т-клетки. Также описаны клетки, в которых экспрессия гена B2M была модулирована, и причем клетки дополнительно были сконструированы, чтобы содержать по меньшей мере один экзогенный трансген и/или дополнительный нокаут по меньшей мере одного эндогенного гена (например, одного или более генов ТКР и/или гена иммунологической контрольной точки, такой как PD1 и/или CTLA4) или их комбинации.

[0023] В любых клетках, описанных в настоящем документе, содержащих экзогенный трансген, экзогенный трансген может быть интегрирован в ген ТКР и/или B2M (например, когда ген ТКР и/или B2M нокаутирован), и/или может быть интегрирован в ген, такой как ген зоны безопасности. В некоторых случаях экзогенный трансген кодирует АСТР, антиген-специфичный ТКР и/или CAR. Конструкция

трансгена может быть встроена с помощью процессов на основе HDR (homology directed repair, репарации, направляемой гомологией) или NHEJ (non-homologous end-joining, негомологичного соединения концов). В некоторых аспектах клетки с модулированной экспрессией ТКР и/или В2М содержат по меньшей мере экзогенный АСТР, экзогенный ТКР и экзогенный САР. Некоторые клетки, содержащие модулятор ТКР, дополнительно содержат нокаут одного или более генов ингибитора контрольной точки. В некоторых вариантах реализации ингибитор контрольной точки представляет собой PD1. В других вариантах реализации ингибитор контрольной точки представляет собой CTLA4. В следующих аспектах клетки с модулированным ТКР и/или В2М содержат нокаут PD1 и нокаут CTLA4. В некоторых вариантах реализации модулированный ген ТКР представляет собой ген, кодирующий ТКР β (ТКРВ). В некоторых вариантах реализации модуляцию обеспечивают с помощью направленного расщепления константной области данного гена (константная область ТКР β , или ТРВК). В определенных вариантах реализации модулированный ген ТКР представляет собой ген, кодирующий ТКР α (ТКРА). В следующих вариантах реализации вставку обеспечивают посредством направленного расщепления константной области гена ТКР, включая направленное расщепление константной области гена ТКР α (обозначаются в настоящем документе как последовательности «ТРАК»). В некоторых вариантах реализации клетки с модифицированным геном ТКР дополнительно модифицированы в гене В2М, генах HLA-A, -B, -C или гене ТАР или в любой комбинации указанных генов. В других вариантах реализации регулятор HLA класса II, СРТА, также был модифицирован.

[0024] В определенных вариантах реализации клетки, описанные в настоящем документе, содержат модификацию (например, делецию и/или вставку, связывание сконструированного ФТ для подавления экспрессии ТКР) в гене ТКРА (например, модификацию экзонов). В определенных вариантах реализации модификация находится в пределах любых сайтов-мишеней, представленных в таблицах 1, 2 или 6 (SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103), и/или между спаренными сайтами-мишенями (например, сайтами-мишенями пар нуклеаз, представленных в таблице 3), включая модификацию путем связывания с, расщепления, встраивания и/или делетирования одного или более нуклеотидов в пределах любой из данных последовательностей и/или в пределах 1 – 50 пар оснований (включая любое значение между ними, такое как 1 – 5, 1 – 10 или 1 – 20 пар оснований) последовательностей гена (геномных), фланкирующих данные последовательности в гене ТКРА. В определенных вариантах

реализации модификации осуществляют с применением ZFN (например, одной или более пар ZFN), как представлено в таблице 6. В определенных вариантах реализации клетки содержат модификацию (связывание с, расщепление, вставки и/или делеции) в пределах одной или более из следующих последовательностей: AACAGT, AGTGCT, CTCCT, TTGAAA, TGGACTT и AATCCTC в пределах гена ТКРА (например, экзонов, см. фигуру 1B). В определенных вариантах реализации модификация включает связывание сконструированного ФТ, описанного в настоящем документе, в результате чего экспрессия гена ТКРА становится модулированной, например, подавленной или активированной.

10 **[0025]** В определенных вариантах реализации клетки, описанные в настоящем документе, содержат модификацию (например, делецию и/или вставку, связывание сконструированного ФТ для подавления экспрессии B2M) гена B2M. В определенных вариантах реализации модификация расположена в пределах любых сайтов-мишеней, представленных в таблицах 5 или 8, и/или между спаренными сайтами-мишенями

15 (например, сайтами-мишенями пар нуклеаз, представленных в таблице 8), включая модификацию путем связывания с, расщепления, встраивания и/или делетирования одного или более нуклеотидов в пределах любой из данных последовательностей и/или в пределах 1 – 50 пар оснований (включая любое значение между ними, такое как 1 – 5, 1 – 10 или 1 – 20 пар оснований) последовательностей гена (геномных), фланкирующих данные последовательности в гене B2M. В определенных вариантах

20 реализации модификации осуществляют с применением ZFN, содержащей ZFP, который содержит участки спирали распознавания и остов вариантов дизайна ZFP из ZFN, представленных в таблице 8, домен FokI (любой домен FokI дикого типа или сконструированный) и необязательно линкер (любой линкер между N- или C-концами домена FokI и N- или C-концами представленных вариантов дизайна ZFP, включая, без

25 ограничения, L0, N7a, N7c и т.д.). В определенных вариантах реализации ZFN содержит ZFN (например, пару первой и второй ZFN), как представлено в таблице 8. В определенных вариантах реализации клетки содержат модификацию (связывание с, расщепление, вставки и/или делеции) в пределах одной или более из следующих

30 последовательностей: SEQ ID NO:126 и 127. В определенных вариантах реализации модификация включает связывание сконструированного ФТ, описанного в настоящем документе, в результате чего экспрессия гена B2M становится модулированной, например, подавленной или активированной.

[0026] В других вариантах реализации модификация представляет собой генетическую модификацию (изменение последовательности нуклеотидов) в сайтах связывания и/или расщепления нуклеазы (или нуклеаз) либо поблизости от данных сайтов (сайтов-мишеней), включая, без ограничения, модификации в последовательностях в пределах 1 – 300 (или любого числа пар оснований между ними) пар оснований в направлении 3'-5', в направлении 5'-3' и/или включая 1 или более пар оснований сайта (сайтов) расщепления и/или сайта связывания; модификации в пределах 1 – 100 пар оснований (или любого числа пар оснований между ними), включая и/или с обеих сторон от сайта (сайтов) связывания и/или расщепления; модификации в пределах от 1 до 50 пар оснований (или любого числа пар оснований между ними), включая и/или с обеих сторон (например, от 1 до 5, от 1 до 10, от 1 до 20 или более пар оснований) от сайта (сайтов) связывания и/или расщепления; и/или модификации в одной или более парах оснований в пределах сайта связывания и/или сайта расщепления нуклеазы. В определенных вариантах реализации модификация расположена в спаренных сайтах-мишенях или поблизости от них (например, 1 – 300 пар оснований, 1 – 50, 1 – 20, 1 – 10 или 1 – 5 или любого числа пар оснований между ними) и/или между спаренными сайтами-мишенями (например, таблицы 3 или 8) последовательности гена, окружающими или находящимися между любыми сайтами-мишенями, раскрытыми в настоящем документе. В определенных вариантах реализации модификация включает модификации гена ТКРА и/или В2М в пределах одной или более из последовательностей, представленных в сайтах-мишенях таблиц 1, 2 и 6 (ТКРА) и/или таблиц 5 и 8 (В2М), например, модификацию 1 или более пар оснований в одной или более из данных последовательностей. В определенных вариантах реализации опосредованные нуклеазой генетические модификации находятся между спаренными сайтами-мишенями (когда для расщепления мишени используется димер). Опосредованные нуклеазой генетические модификации могут включать вставки и/или делеции любого числа пар оснований, включая вставки не кодирующих последовательностей любой длины и/или трансгенов любой длины, и/или делеции от 1 пары оснований до более 1000 т.п.о. (тысяч пар оснований, или любое значение между ними, включая, без ограничения, 1 – 100 пар оснований, 1 – 50 пар оснований, 1 – 30 пар оснований, 1 – 20 пар оснований, 1 – 10 пар оснований или 1 – 5 пар оснований).

[0027] Модифицированные клетки согласно настоящему изобретению могут представлять собой эукариотическую клетку, включая клетку млекопитающего,

отличного от человека, и клетку человека, такую как лимфоидная клетка (например, Т-клетка (включая эффекторные Т-клетки (Teff) и регуляторные Т-клетки (Treg)), В-клетка или NK-клетка), стволовую/прогениторную клетку (например, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (иПСК), эмбриональную стволовую клетку (например, ЭС человека), мезенхимальную стволовую клетку (МСК) или гемопоэтическую стволовую клетку (ГСК). Стволовые клетки могут быть тотипотентными или плюрипотентными (например, частично дифференцированными, такими как ГСК, которые являются плюрипотентными миелоидными или лимфоидными стволовыми клетками). В других вариантах реализации в настоящем изобретении предложены способы получения клеток, которые характеризуются «ноль»-генотипом в отношении экспрессии ТКР и или HLA. Любые из модифицированных стволовых клеток, описанных в настоящем документе (модифицированных в локусе ТКРА и/или В2М), можно затем дифференцировать для получения дифференцированных (*in vivo* или *in vitro* (культура)) клеток, происходящих из стволовой клетки, описанной в настоящем документе, с модификациями, описанными в настоящем документе, включая модифицированную экспрессию гена ТКРА и/или В2М.

[0028] В другом аспекте композиции (модифицированные клетки) и способы, описанные в настоящем документе, можно применять, например, при лечении или предотвращении либо уменьшении интенсивности нарушения. Способы, как правило, включают (а) расщепление или понижающую регуляцию эндогенного гена ТКР и/или В2М в выделенной клетке (например, Т-клетке или других лимфоцитах) с применением нуклеазы (например, ZFN или TALEN) или системы нуклеаз, такой как CRISPR/Cas со сконструированными crRNA/tracrRNA, либо с применением сконструированного фактора транскрипции (например, ZFP-ФТ, TALE-ФТ, Cfp1-ФТ или Cas9-ФТ) так, чтобы ген ТКР и/или В2М был инактивирован или понижающе модулирован; и (б) введение клетки субъекту, посредством этого осуществляя лечение или предотвращение нарушения. В некоторых вариантах реализации ген, кодирующий ТКР β (ТКРВ), был инактивирован или понижающе модулирован. В некоторых вариантах реализации ген, кодирующий В2М, был инактивирован или понижающе модулирован. В некоторых вариантах реализации инактивацию достигают посредством направленного расщепления константной области данного гена (константная область ТКР β , или ТРВК). В предпочтительных вариантах реализации ген, кодирующий ТКР α (ТКРА) и/или В2М, был инактивирован или понижающе

модулирован. В следующих предпочтительных вариантах реализации нарушение представляет собой рак, инфекционное заболевание или аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах реализации модификации осуществляют, чтобы вызвать иммунную толерантность. В следующих предпочтительных вариантах реализации

5 инактивацию достигают посредством направленного расщепления константной области данного гена (константная область ТКР α или сокращенно обозначается ТРАК). В некоторых вариантах реализации ген B2M расщепляют. В следующих вариантах реализации модулируют (подвергают нокауту) дополнительные гены (помимо ТКР и/или B2M), например, двойной нокаут ТКР/B2M, дополнительных генов

10 ТКР, PD1 и/или CTLA4, и/или в клетке присутствуют один или более терапевтических трансгенов (эписомные, случайным образом интегрированные или интегрированные с помощью направленной интеграции, такой как опосредованная нуклеазой интеграция). Модифицированные клетки могут содержать одну или более ZFN (например, пар

15 ZFN), описанных в настоящем документе, включая, без ограничения, нуклеазу с цинковым пальцем (ZFN), содержащую первую и вторую ZFN, причем каждая ZFN содержит домен расщепления (например, любой домен расщепления FokI дикого типа или сконструированный) и ДНК-связывающий домен ZFP. В определенных вариантах реализации модификации осуществляют с применением ZFN, содержащей ZFP (участки спирали распознавания и остов) «вариантов дизайна», описанных в

20 настоящем документе (например, в таблице 6 или таблице 8, включая ZFP ZFN, обозначенных 68846, 53853, 72732; 72748; 68957; 55266, 68798, 68879, 68815, 68799 или 72678), домен FokI (любой домен FokI дикого типа или сконструированный) и необязательно линкер (любой линкер между N- или C-концами домена FokI и между N- или C-концами домена вариантов дизайна ZFP, описанных в настоящем документе).

25 В некоторых вариантах реализации ZFN содержит пару ZFN, в которой одна ZFN содержит ZFP из 68846 (SEQ ID NO:177), функционально связанный с доменом FokI, и другая ZFN пары содержит ZFP из 53853 (SEQ ID NO:178), функционально связанный с доменом FokI. В некоторых вариантах реализации ZFN содержит пару ZFN, в которой одна ZFN содержит ZFP из 72732 (SEQ ID NO:175), функционально связанный

30 с доменом FokI, и другая ZFN пары содержит ZFP из 72678 (SEQ ID NO:176), функционально связанный с доменом FokI. В определенных вариантах реализации ZFN содержит ZFN (например, пару первой и второй (также обозначаются левая и правая) ZFN-партнера), описанную в настоящем документе следующим образом: ZFN, обозначенную 68796, и ZFN, обозначенную 68813; ZFN, обозначенную 68796, и ZFN,

обозначенную 68861; ZFN, обозначенную 68812, и ZFN, обозначенную 68813; ZFN, обозначенную 68876, и ZFN, обозначенную 68877; ZFN, обозначенную 68815, и ZFN, обозначенную 55266; ZFN, обозначенную 68879, и ZFN, обозначенную 55266; ZFN, обозначенную 68798, и ZFN, обозначенную 68815; или ZFN, обозначенную 68846, и ZFN, обозначенную 53853; ZFN, обозначенную 57531, и ZFN, обозначенную 72732; ZFN, обозначенную 57531, и ZFN, обозначенную 72748; ZFN, обозначенную 68957, и ZFN, обозначенную 57071; ZFN, обозначенную 68957, и ZFN, обозначенную 72732; ZFN, обозначенную 68957, и ZFN, обозначенную 72748; ZFN, обозначенную 72678, и ZFN, обозначенную 57071; ZFN, обозначенную 72678, и ZFN, обозначенную 72732; и содержащую ZFP ZFN, обозначенной 72678, и ZFN, обозначенной 72748. Таким образом, ZFN (например, каждая ZFN-партнер спаренной ZFN) содержит участки спирали распознавания и может содержать дополнительные модификации ZFP (например, в участках остова), описанные ниже (например, варианты дизайна, представленные в таблицах 1, 2, 5, 6 и 8), и дополнительно содержит любой домен расщепления FokI дикого типа или сконструированный (включая любую комбинацию мутантов FokI с заменой, добавлением и/или делецией). Например, ZFN-партнер может содержать специфичный домен с цинковым пальцем, связывающий ДНК, слитый с любым доменом расщепления FokI, включая домен расщепления (SEQ ID NO:139) из белка дикого типа или из мутированной последовательности (как представлено в примерах, SEQ ID NO:140-174). В2М-специфичный ZFN-партнер может содержать В2М-специфичный домен с цинковым пальцем, связывающий ДНК (например, 72732), слитый с доменом расщепления FokI, который выбран из SEQ ID NO:139-174. Также В2М-специфичный ZFN-партнер может содержать В2М-специфичный домен с цинковым пальцем, связывающий ДНК (например, 72678), слитый с доменом расщепления FokI, который выбран из SEQ ID NO:139-174. Аналогично, ТРАК-специфичный ZFN-партнер может содержать ТРАК-специфичный домен с цинковым пальцем, связывающий ДНК (например, 68846), слитый с доменом расщепления FokI, который выбран из SEQ ID NO:139-174, и ТРАК-специфичный домен с цинковым пальцем, связывающий ДНК, 53853 может быть слит с доменом расщепления FokI, который выбран из любого представленного домена расщепления FokI дикого типа или сконструированного, например, с доменом, как представлено в прилагаемых примерах (SEQ ID NO:139-174). В некоторых вариантах реализации домен FokI слит с N-терминальным концом ДНК-связывающего домена ZFP, тогда как в других он слит с С-терминальным концом ДНК-связывающего домена ZFP. Также для присоединения

ДНК-связывающего домена к домену расщепления FokI можно применять любой линкер.

[0029] Также предложены клетки, которые происходят из клеток, модифицированных, как описано в настоящем документе (например, клеток, содержащих ZFN, описанные в настоящем документе), включая, без ограничения, частично или полностью дифференцированные из стволовых клеток, модифицированных, как описано в настоящем документе. Данные клетки, как правило, не содержат ZFN, но содержат генетические модификации, осуществленные ZFN.

[0030] Фактор или факторы транскрипции и/или нуклеазу (нуклеазы) можно ввести в клетку или окружающую культуральную среду в виде мРНК, в форме белка и/или в виде последовательности ДНК, кодирующей нуклеазу (нуклеазы). В определенных вариантах реализации выделенная клетка, которую вводят субъекту, также содержит дополнительную геномную модификацию, например, интегрированную экзогенную последовательность (в расщепленный ген ТКР и/или B2M или отличный ген, например, ген либо локус зоны безопасности) и/или инактивацию (например, опосредованную нуклеазой) дополнительных генов, например, одного или более генов HLA либо генов CTLA-4, CISH, PD1 или tet2. Экзогенная последовательность (например, CAR или экзогенный ТКР) либо белок могут быть введены с помощью вектора (например, Ad, AAV, LV) или с применением методики, такой как электропорация или временная трансфекция. В некоторых вариантах реализации белки вводят в клетку путем индукции механического стресса, такого как сжатие клеток (см. публикацию Kollmannsperger, *et al.* (2016) *Nat Comm* 7, 10372 doi:10.1038/ncomms10372). В некоторых аспектах композиция может содержать фрагменты выделенной клетки и/или дифференцированные (частично или полностью) клетки.

[0031] В некоторых аспектах модифицированные клетки можно применять для клеточной терапии, например, для адоптивного переноса клеток. В других вариантах реализации клетки для применения в трансплантации Т-клеток содержат другую модификацию гена, представляющего интерес. В одном аспекте Т-клетки содержат встроенный химерный антигенный рецептор (CAR), специфичный в отношении маркера, обнаруженного на раковых клетках. В следующем аспекте встроенный CAR является специфичным в отношении маркера CD19, характерного для В-клеток, включая злокачественные новообразования В-клеток. Такие клетки будут подходящими в терапевтической композиции для лечения пациентов без

необходимости в совпадении HLA, и, следовательно, их можно будет применять как «готовое к применению» терапевтическое средство для любого пациента, который нуждается в таком лечении. В других случаях стволовые клетки или клетки-предшественницы, например, гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественницы (ГСК/КП) либо индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), содержащие модификации, описанные в настоящем документе, размножают перед введением. В других аспектах генетически модифицированные ГСК/КП вводят субъекту в трансплантате костного мозга, причем ГСК/КП прививаются, дифференцируют и созревают *in vivo*. В некоторых вариантах реализации ГСК/КП выделены от субъекта после вызванной Г-КСФ (гранулоцитарным колониестимулирующим фактором) мобилизации, вызванной плериксафором мобилизации и комбинаций вызванной Г-КСФ и плериксафором мобилизации, а в других случаях клетки выделены из костного мозга человека или пупочных канатиков человека. В других вариантах реализации иПСК получены из клеток пациента или здорового донора. В некоторых аспектах субъект получает лечение умеренной миелоаблативной процедурой перед введением трансплантата, содержащего модифицированные ГСК/КП или модифицированные клетки, полученные из иПСК, тогда как в других аспектах субъект получает лечение интенсивным режимом миелоаблативного кондиционирования. В некоторых вариантах реализации способы и композиции согласно настоящему изобретению применяют для лечения или предотвращения рака.

[0032] В другом аспекте Т-клетки с модулированным (модифицированным) ТКР и/или В2М содержат встроенную донорную последовательность Т-клеточного рецептора, связывающегося с антителами (АСТР). В некоторых вариантах реализации донорная последовательность АСТР встроена в ген ТКР для нарушения экспрессии данного гена ТКР после вызванного нуклеазой расщепления. В других вариантах реализации донорная последовательность встроена в локус «зоны безопасности», такой как гены AAVS1, HPRT, альбумина и CCR5. В некоторых вариантах реализации последовательность АСТР встроена с помощью направленной интеграции, причем донорная последовательность АСТР содержит фланкирующие плечи гомологии, которые характеризуются гомологией с последовательностью, фланкирующей сайт расщепления сконструированной нуклеазы. В некоторых вариантах реализации донорная последовательность АСТР дополнительно содержит промотор и/или другие транскрипционные регуляторные последовательности. В других вариантах реализации

в донорной последовательности ASTR отсутствует промотор. В некоторых вариантах реализации донор ASTR встроен в ген, кодирующий ТКР β (ТКРВ). В некоторых вариантах реализации вставку обеспечивают посредством направленного расщепления константной области данного гена (константная область ТКР β , или ТРВК). В

5 предпочтительных вариантах реализации донор ASTR встроен в ген, кодирующий ТКР α (ТКРА). В следующих предпочтительных вариантах реализации вставку обеспечивают посредством направленного расщепления константной области данного гена (константная область ТКР α , сокращенно обозначается ТРАК). В некоторых вариантах реализации донор встроен в последовательность экзона в ТКРА, тогда как в

10 других донор встроен в интронную последовательность в ТКРА. В еще одних вариантах реализации донор ASTR встроен в ген В2М. В некоторых вариантах реализации клетки с модулированным В2М и/или ТКР дополнительно содержат CAR. В еще одних вариантах реализации клетки с модулированным В2М и/или ТКР были дополнительно модулированы в гене HLA или гене ингибитора контрольной точки.

15 **[0033]** Также предложены фармацевтические композиции, содержащие модифицированные клетки, описанные в настоящем документе (например, Т-клетки или стволовые клетки с инактивированным геном ТКР), или фармацевтические композиции, содержащие одну или более молекул, связывающих ген ТКР и/или В2М (например, сконструированных факторов транскрипции и/или нуклеаз), как описано в

20 настоящем документе. В определенных вариантах реализации фармацевтические композиции дополнительно содержат одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Модифицированные клетки, молекулы, связывающие ген ТКР и/или В2М (или полинуклеотиды, кодирующие данные молекулы), и/или фармацевтические композиции, содержащие данные клетки или молекулы, вводят

25 субъекту способами, известными в данной области техники, например, с помощью внутривенной инфузии, инфузии в конкретный сосуд, такой как печеночная артерия, или путем прямой инъекции в ткань (например, мышцу). В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой взрослого человека с заболеванием или состоянием, которое можно лечить или облегчить с помощью композиции. В других

30 вариантах реализации субъект представляет собой субъекта-ребенка, причем композицию вводят для предотвращения, лечения или облегчения заболевания либо состояния (например, рака, реакции «трансплантат против хозяина» и т.д.).

[0034] В некоторых аспектах композиция (клетки с модулированным ТКР и/или В2М, содержащие ASTR) дополнительно содержит экзогенное антитело. См. также

публикацию патента США № 2017/0196992. В некоторых аспектах антитело является подходящим для активизации ACTR-содержащей Т-клетки для предотвращения или лечения состояния. В некоторых вариантах реализации антитело распознает антиген, связанный с опухолевой клеткой или со связанными с раком процессами, такой как

5 EpCAM, CEA, gpA33, муцины, TAG-72, CAIX, PSMA, фолат-связывающие антитела, CD19, EGFR, ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, VEGF, VEGFR, интегрины $\alpha V\beta 3$ и $\alpha 5\beta 1$, CD20, CD30, CD33, CD52, CTLA4 и энасин (Scott, *et al.* (2012) *Nat Rev Cancer* 12:278). В других вариантах реализации антитело распознает антиген, связанный с инфекционным заболеванием, таким как

10 ВИЧ, ВГС (вирус гепатита С) и т.п.

[0035] В другом аспекте в настоящем документе предложены ДНК-связывающие домены, связывающиеся с геном ТКР (например, ZFP, TALE и sgRNA – single guide RNA, одиночная направляющая РНК), которые связываются с сайтом-мишенью в гене ТКР. В определенных вариантах реализации ДНК-связывающий

15 домен содержит ZFP с участками спирали распознавания в порядке, представленном в одной строке в таблице 1; ДНК-связывающий белок домена TAL-эффектора с RVD (repeat variable diresidue, повторяющийся вариабельный двойной остаток), который связывается с сайтом-мишенью, как представлено в первом столбце таблицы 1 или третьем столбце таблицы 2; и/или sgRNA, как представлено в одной строке таблицы 2.

20 Данные ДНК-связывающие белки могут быть связаны с транскрипционными регуляторными доменами с образованием сконструированных факторов транскрипции, которые модулируют экспрессию ТКР. В качестве альтернативы, данные ДНК-связывающие белки могут быть связаны с одним или более доменами нуклеазы с образованием сконструированных нуклеаз с цинковым пальцем (ZFN), TALEN и/или

25 систем CRISPR/Cas, которые связываются с геном ТКР и расщепляют его. В определенных вариантах реализации ZFN, TALEN или одиночные направляющие РНК (sgRNA) системы CRISPR/Cas связываются с сайтами-мишенями в гене ТКР человека. ДНК-связывающий домен фактора транскрипции или нуклеазы (например, ZFP, TALE, sgRNA) может связываться с сайтом-мишенью в гене ТКРА, содержащем 9, 10, 11, 12

30 или более (например, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов любых сайтов-мишеней, представленных в настоящем документе (например, сайтов-мишеней таблицы 1 или 2, как представлено в SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103). Белки с цинковым пальцем могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более цинковых пальцев, причем каждый цинковый палец содержит спираль распознавания, которая специфично осуществляет

контакт с субсайтом-мишенью гена-мишени. В определенных вариантах реализации белки с цинковым пальцем содержат 4 или 5, или 6 пальцев (обозначаемых F1, F2, F3, F4, F5 и F6 и расположенных в порядке от F1 до F4 или F5, или F6 от N-конца к С-концу), например, как представлено в таблице 1. ZFP, описанные в настоящем документе, могут также содержать одну или более мутаций в остатках фосфатного контакта белка с цинковым пальцем, например, мутант nR-5Qabc, описанный в публикации патента США № 2018/0087072. В других вариантах реализации одиночные направляющие РНК или ДНК-связывающие домены TAL-эффектора могут связываться с сайтом-мишенью, описанным в настоящем документе (например, с сайтами-мишенями таблицы 1 или таблицы 2, или таблицы 6, как представлено в любой из SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103), либо с 12 или более пар оснований в пределах любого из данных сайтов-мишеней либо между спаренными сайтами-мишенями. Иллюстративные сайты-мишени sgRNA представлены в таблице 2 (SEQ ID NO:92-103). Также предложены sgRNA, которые связываются с 12 или более нуклеотидов сайтов-мишеней, представленных в таблице 1 или таблице 2. TALEN могут быть разработаны для сайтов-мишеней, описанных в настоящем документе (сайты-мишени таблицы 1 или таблицы 2, или таблицы 6), с применением канонических или неканонических RVD, как описано в патентах США №№ 8,586,526 и 9,458,205. Нуклеазы, описанные в настоящем документе (содержащие ДНК-связывающий домен ZFP, TALE или sgRNA), способны осуществлять генетические модификации в пределах гена ТКРА, содержащего любую из SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103, включая модификации (вставки и/или делеции) в пределах любой из данных последовательностей (SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103) и/или модификации в последовательностях гена ТКРА, фланкирующих последовательности сайта-мишени, представленные в SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103, например, модификации в пределах экзонных последовательностей гена ТКР в пределах одной или более из следующих последовательностей: AACAGT, AGTGCT, CTCCT, TTGAAA, TGGACTT и AATCCTC.

[0036] В другом аспекте в настоящем документе предложены ДНК-связывающие домены, связывающие ген B2M (например, ZFP, TALE и sgRNA), которые связываются с сайтом-мишенью в гене B2M. В определенных вариантах реализации ДНК-связывающий домен содержит ZFP с участками спирали распознавания в порядке, как представлено в одной строке таблицы 5 или таблицы 8 (столбцы, подписанные «варианты дизайна», включая ZFP ZFN, обозначенных 72732;

72748; 68957; или 72678); ДНК-связывающий белок домена TAL-эффектора с RVD, который связывается с сайтом-мишенью, как представлено в первом столбце таблицы 5 или таблицы 8; и/или sgRNA, которая связывается с сайтом-мишенью B2M, описанным в настоящем документе (таблица 5 или таблица 8). Данные ДНК-связывающие белки могут быть связаны с транскрипционными регуляторными доменами с образованием сконструированных факторов транскрипции, которые модулируют экспрессию B2M. В качестве альтернативы, данные ДНК-связывающие белки могут быть связаны с одним или более доменами нуклеазы (доменами расщепления) с образованием сконструированных нуклеаз с цинковым пальцем (ZFN), TALEN и/или систем CRISPR/Cas, которые связываются с геном B2M и расщепляют его. В определенных вариантах реализации ZFN, TALEN или одиночные направляющие РНК (sgRNA) системы CRISPR/Cas связываются с сайтами-мишенями в гене B2M человека. ДНК-связывающий домен фактора транскрипции или нуклеазы (например, ZFP, TALE, sgRNA) может связываться с сайтом-мишенью в гене B2M, содержащем 9, 10, 11, 12 или более (например, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов любых сайтов-мишеней, представленных в настоящем документе (например, в таблице 5 или таблице 8, как представлено в SEQ ID NO: 117, 123, 126 или 127). Белки с цинковым пальцем могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более цинковых пальцев, причем каждый цинковый палец содержит спираль распознавания, которая специфично осуществляет контакт с субсайтом-мишенью гена-мишени. В определенных вариантах реализации белки с цинковым пальцем содержат 4 или 5, или 6 пальцев (обозначаемых F1, F2, F3, F4, F5 и F6 и расположенных в порядке от F1 до F4 или F5, или F6 от N-конца к С-концу), например, как представлено в таблице 5 или таблице 8. ZFP, описанные в настоящем документе, могут также содержать одну или более мутаций в остатках фосфатного контакта белка с цинковым пальцем, например, мутант nR-5Qabc, описанный в публикации патента США № 2018/0087072, включая варианты дизайна ZFP (мутанты участков спирали распознавания и остова) таблицы 8. В других вариантах реализации одиночные направляющие РНК или ДНК-связывающие домены TAL-эффектора могут связываться с сайтом-мишенью, описанным в настоящем документе (например, с сайтом-мишенью таблиц 5 или 8), либо с 12 или более пар оснований в пределах любого из данных сайтов-мишеней или между спаренными сайтами-мишенями. Домены TALE могут быть разработаны для сайтов-мишеней, описанных в настоящем документе (сайтов-мишеней таблиц 5 или 8), с применением канонических или неканонических RVD, как описано в патентах США

№№ 8,586,526 и 9,458,205. Нуклеазы, описанные в настоящем документе (содержащие ДНК-связывающий домен ZFP, TALE или sgRNA), способны осуществлять генетические модификации в пределах гена B2M, содержащего любой из сайтов-мишеней B2M, раскрытых в настоящем документе, включая модификации (вставки и/или делеции) в пределах любой из данных последовательностей и/или модификации в последовательностях гена B2M, фланкирующих последовательности сайта-мишени, представленные в таблицах 5 и 8 (SEQ ID NO:117, 123, 126 или 127).

[0037] Любая из нуклеаз, описанных в настоящем документе, может содержать ДНК-связывающий домен (например, варианты дизайна ZFP таблицы 6 или 8, TALE или sgRNA), как описано в настоящем документе, и домен расщепления и/или полудомен расщепления (например, полудомен расщепления FokI дикого типа или сконструированный). Таким образом, в любой из нуклеаз (например, ZFN, TALEN, систем CRISPR/Cas), описанных в настоящем документе, домен нуклеазы может включать домен нуклеазы или полудомен нуклеазы дикого типа (например, полудомен расщепления FokI). В других вариантах реализации нуклеазы (например, нуклеазы ZFN, TALEN, CRISPR/Cas) содержат сконструированные домены или полудомены нуклеазы, например, полудомены расщепления сконструированного FokI, которые образуют обязательные гетеродимеры. См., например, патенты США № 7,914,796 и 8,034,598. В определенных вариантах реализации один или более эндонуклеазных доменов FokI нуклеаз, описанных в настоящем документе, могут также содержать мутанты фосфатного контакта (например, R416S и/или K525S), как описано в публикации патента США № 2018/0087072. Таким образом, домен FokI нуклеаз, описанных в настоящем документе (например, ZFN, содержащих: (i) варианты дизайна ZFP, как представлено в таблице 8, включая ZFP ZFN, обозначенных 72732; 72748; 68957; или 72678 и (ii) домен FokI), могут содержать любую комбинацию мутаций в домене FokI (положения пронумерованы относительно полноразмерного FokI), включая последовательность каталитического домена FokI дикого типа, а также, без ограничения, домены FokI, указанные в таблице 8, FokI-Sharkey (S418P+K441E); FokI ELD (Q->E в положении 486, I->L в 499, N->D в положении 496); FokI ELD, Sharkey (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E); FokI ELD, R416E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, R416E); FokI ELD, Sharkey, R416E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, R416E); FokI ELD, R416Y (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, R416Y); FokI ELD, Sharkey, R416E

(Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, R416E); FokI ELD, S418E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418E); FokI ELD, частично Sharkey, S418E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, K441E, S418E); FokI ELD, K525S (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, K525S); FokI ELD, Sharkey K525S (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, K525S); FokI ELD, I479T (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, I479T); FokI ELD, Sharkey, I479T (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, I479T); FokI ELD, P478D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, P478D); FokI ELD, Sharkey, P478D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, P478D); FokI ELD, Q481D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, Q481D); FokI ELD, Sharkey, Q481D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, Q481D); FokI KKR (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537); FokI KKR Sharkey, (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E); FokI KKR, Q481E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, Q481E); FokI KKR, Sharkey Q481E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, Q481E); FokI KKR, R416E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, R416E); FokI KKR, Sharkey, R416E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, R416E); FokI KKR, K525S (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, K525S); FokI KKR, Sharkey, K525S (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, K525S); FokI KKR, R416Y (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, R416Y); FokI KKR, Sharkey, R416Y (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, R416Y); FokI, KKR I479T (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, I479T); FokI, KKR Sharkey I479T (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, I479T); FokI, KKR P478D (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, P478D); FokI KKR Sharkey P478D (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, P478D); FokI DAD (R->D в положении 487, N->D в положении 496, I->A в положении 499); FokI DAD Sharkey (R->D в положении 487, N->D в положении 496, I->A в положении 499, S418P+K441E); FokI

RVR (D->R в положении 483, H->R в положении 537, I->V в положении 538); FokI RVR Sharkey (D->R в положении 483, H->R в положении 537, I->V в положении 538, S418P+K441E). ZFN, описанные в настоящем документе, могут также содержать любую линкерную последовательность, включая, без ограничения, последовательности, раскрытые в патентах США № 7,888,121; 7,914,796; 8,034,598; 8,623,618; 9,567,609; и публикации США № 2017/0218349, которые можно применять между N- или C-концом ДНК-связывающего домена (например, ZFP) и N- или C-концом домена расщепления FokI.

[0038] В другом аспекте в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий любой из белков, слитых молекул и/или их компонентов (например, sgRNA или другой ДНК-связывающий домен), описанных в настоящем документе. Полинуклеотид может быть частью вирусного вектора, невирусного вектора (например, плазмиды) или может находиться в форме мРНК. Любые из полинуклеотидов, описанных в настоящем документе, могут также содержать последовательности (донор, плечи гомологии или последовательностей «пэтчей») для направленной вставки в ген ТКР α и/или ТКР β . В еще одном аспекте предложен вектор для доставки гена, содержащий любой из полинуклеотидов, описанных в настоящем документе. В определенных вариантах реализации вектор представляет собой аденовирусный вектор (например, вектор Ad5/F35) или лентивирусный вектор (LV), включая компетентные по интеграции или не способные к интеграции лентивирусные векторы либо аденоассоциированный вектор (AAV). Таким образом, в настоящем документе также предложены вирусные векторы, содержащие последовательность, кодирующую нуклеазу (например, ZFN или TALEN) и/или системы нуклеаз (CRISPR/Cas или Ttago), и/или донорную последовательность для направленной интеграции в ген-мишень. В некоторых вариантах реализации донорная последовательность и последовательности, кодирующие нуклеазу, находятся на различных векторах. В других вариантах реализации нуклеазы обеспечивают в виде полипептидов. В предпочтительных вариантах реализации полинуклеотиды представляют собой мРНК. В некоторых аспектах мРНК могут быть химически модифицированными (См. например, публикацию Kormann, *et al.* (2011) *Nature Biotechnology* 29(2):154-157). В других аспектах мРНК может содержать «кэп» ARCA (см. патенты США №№ 7,074,596 и 8,153,773). В некоторых аспектах мРНК может содержать «кэп», введенный с помощью ферментативной модификации. Введенный ферментативным способом «кэп» может содержать Cap0, Cap1 или Cap2 (см.,

например, публикацию Smietanski, *et al.* (2014) *Nature Communications* 5:3004). В следующих аспектах мРНК может быть экспрессированной в результате химической модификации. В следующих вариантах реализации мРНК может содержать смесь немодифицированных и модифицированных нуклеотидов (см. публикацию патента США № 2012/0195936). В еще одних вариантах реализации мРНК может содержать элемент WPRE (см. публикацию патента США № 2016/0326548). В некоторых вариантах реализации мРНК является двухцепочечной (см., например, публикацию Kariko, *et al.* (2011) *Nucl Acid Res* 39:e142).

[0039] В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложена выделенная клетка, содержащая любой из белков, полинуклеотидов и/или векторов, описанных в настоящем документе. В определенных вариантах реализации клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой/прогениторной клетки или Т-клетки (например, эффективной или регуляторной Т-клетки). В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложена клетка или линия клеток, которая происходит из клетки или линии, содержащей любые из нуклеаз, факторов транскрипции, полинуклеотидов и/или векторов, описанных в настоящем документе, а именно – клетка или линия клеток, произошедшая (например, в культуре) из клетки, в которой ТКР и/или В2М был инактивирован с помощью одной или более ZFN и/или в которой донорный полинуклеотид (например, АСТР и/или САР) был стабильно интегрирован в геном клетки. Таким образом, потомки клеток, описанных в настоящем документе, сами по себе могут не содержать молекулу, полинуклеотиды и/или векторы, описанные в настоящем документе, но в данных клетках ген ТКР и/или В2М был инактивирован, и/или донорный полинуклеотид был интегрирован в геном и/или экспрессирован.

[0040] В другом аспекте в настоящем документе описаны способы инактивации гена ТКР и/или В2М в клетке путем введения одного или более белков, полинуклеотидов и/или векторов в клетку, как описано в настоящем документе. В определенных вариантах реализации один или более полинуклеотидов, кодирующих ZFN (например, пару ZFN), как представлено в таблице 6, применяют для модификации гена ТКР в клетке, и клетки, происходящие из данных клеток (включая дифференцированные клетки), содержат модификацию или модификации. В других вариантах реализации один или более полинуклеотидов, кодирующих ZFN (например, пару ZFN), как представлено в таблице 8, применяют для модификации гена В2М в клетке, и клетки, происходящие из данных клеток (включая дифференцированные клетки), содержат модификацию. В любом из способов, описанных в настоящем

документе, нуклеазы могут вызывать направленный мутагенез, делеции последовательностей клеточной ДНК и/или могут способствовать направленной рекомбинации в заранее определенном локусе хромосомы. Таким образом, в определенных вариантах реализации нуклеазы делетируют и/или вставляют один или

5 более нуклеотидов из гена-мишени или в ген-мишень. В некоторых вариантах реализации ген ТКР и/или В2М был инактивирован путем расщепления нуклеазой с последующим негомологичным соединением концов. В других вариантах реализации геномная последовательность в гене-мишени (например, ТКР или В2М) заменяется, например, с применением нуклеазы (или вектора, кодирующего указанную нуклеазу),

10 как описано в настоящем документе, и «донорной» последовательности, которая встроена в ген после направленного расщепления нуклеазой. Донорная последовательность может присутствовать в векторе нуклеазы, присутствовать в отдельном векторе (например, плазмиде, линейной одно- или двухцепочечной ДНК, AAV, Ad или LV векторе) или, в качестве альтернативы, может быть введена в клетку

15 с применением отличного механизма доставки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации способы дополнительно включают инактивацию одного или более дополнительных генов (например, В2М) и/или интеграцию одного или более трансгенов в геном клетки, включая, без ограничения, интеграцию одного или более трансгенов в инактивированный ген ТКР и/или В2М, и/или в один или более генов

20 зоны безопасности. В определенных вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, приводят к получению популяции клеток, в которой по меньшей мере 80 – 100% (или любое значение между ними), включая по меньшей мере 90 – 100% (или любое значение между ними) клеток содержат нокаут или нокауты и/или интегрированный трансген или трансгены.

25 **[0041]** Более того, любой из способов, описанных в настоящем документе, можно реализовать на практике *in vitro*, *in vivo* и/или *ex vivo*. В определенных вариантах реализации способы реализуют на практике *ex vivo*, например, для модификации Т-клеток (эффекторных или регуляторных), чтобы сделать их подходящими в качестве терапевтических средств в аллогенном формате для лечения

30 субъекта (например, субъекта, страдающего от рака или аутоиммунного заболевания). Неограничивающие примеры типов рака, которые можно лечить и/или предотвратить, включают карциномы легких, типы рака поджелудочной железы, типы рака печени, типы рака костей, типы рака молочной железы, типы рака толстой и прямой кишок, лейкозы, типы рака яичников, лимфомы, типы рака головного мозга и т.п.

Неограничивающие примеры аутоиммунного заболевания включают отторжение трансплантата, диабет 1 типа, заболевание/нарушение раздраженного кишечника, множественный склероз, волчанку, склеродермию, ревматоидный артрит и т.п. Клетки можно также применять для вызова иммунной толерантности.

5 **[0042]** В другом аспекте в настоящем документе описан способ интеграции одного или более трансгенов в геном выделенной клетки, причем указанный способ включает: введение в клетку, (а) одного или более донорных векторов (например, плазмиды, линейной одно- или двухцепочечной ДНК, AAV, плазмид, Ad, мРНК и т.д.), содержащих один или более трансгенов, и (б) по меньшей мере одной не
10 встречающейся в природе нуклеазы в форме мРНК, причем по меньшей мере одна нуклеаза расщепляет геном клетки, в результате чего один или более трансгенов интегрируются в геном клетки (например, в рецептор ТКР), причем донорный вектор вводят в буфере для электропорации, содержащем выделенную клетку и мРНК, непосредственно до или непосредственно после электропорации нуклеазы в клетку. В
15 определенных вариантах реализации донорный вектор вводят в буфере для электропорации после электропорации и перед переносом клеток в культуральную среду. См., например, публикации патентов США №№ 2015/0174169 и 2015/0110762. Способы можно применять для введения трансгена или трансгенов в любое геномное расположение, включая, без ограничения, ген ТКР, ген B2M и/или ген зоны
20 безопасности (например, AAVS1, Rosa, альбумина, CCR5, CXCR4 и т.д.).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0043] **Фигуры 1А и 1В** представляют собой иллюстрацию гена ТКРА, демонстрирующую расположение сайтов, на которые направлены нуклеазы. **Фигура**
25 **1А** представляет собой иллюстрацию процессинга гена ТКРА из зародышевой формы в форму зрелой Т-клетки и демонстрирует обычную мишень нуклеазы. На **фигуре 1В** (SEQ ID NO:116 (экзон c1), 117 (экзон c2) и 118 (экзон c3)) представлены участки между сайтами-мишенями в последовательности константной области. Последовательность, представленная прописными черными буквами, представляет собой последовательность указанной последовательности экзона, тогда как
30 последовательность, представленная строчными серыми буквами, представляет собой последовательность прилегающего интрона.

[0044] **Фигуры 2А и 2В** представляют собой графики, иллюстрирующие процент каждого сайта, модифицированного в Т-клетках, обработанных ZFN,

специфичными в отношении сайтов ТКРА А, В и D (**фигура 2А**) и сайтов Е, F и G (**фигура 2В**). Многие пары позволяют получить степень модификации 80% или выше.

[0045] **Фигура 3** иллюстрирует процент CD3-отрицательных Т-клеток после обработки ТКРА-специфичными парами ZFN согласно результатам анализа методом FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting, сортировки клеток с активированной флуоресценцией).

[0046] **Фигура 4** представляет собой график, демонстрирующий высокую степень корреляции между уровнями модификации последовательности ТКРА, которая была измерена с помощью высокопроизводительного секвенирования, и утратой экспрессии CD3, которая была измерена методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией, в Т-клетках.

[0047] **Фигуры 5А – 5D** представляют собой графики, иллюстрирующие рост Т-клеток после обработки ТКРА-специфичной ZFN, сгруппированные в зависимости от сайта-мишени в гене ТКРА.

[0048] На **фигуре 6** представлены результаты двойного нокаута ТРАК (ТКРА) и В2М и направленной интеграции донора в локус ТРАК (ТКРА) или В2М.

[0049] На **фигуре 7** представлены результаты FACS двойного нокаута ТРАК (ТКРА) и В2М и направленной интеграции донора в локус ТРАК (ТКРА) или В2М. Результаты FACS представлены для указанных условий (слева направо для верхних чертежей: контроль (имитация); ZFN для ТРАК и В2М без донора; ZFN для ТРАК и В2М с донором, направленным на В2М; и ZFN для ТРАК и В2М с донором, направленным на ТРАК). В нижнем левом квадранте верхней строки графиков FACS представлены клетки с двойным (ТРАК/В2М) нокаутом, а в правой половине нижней строки графиков FACS представлены клетки с двойным нокаутом и направленной интеграцией. Также процент клеток показан с помощью стрелок, указывающих на соответствующую часть графика FACS. Как показано стрелками, 85 – 90% или более клеток являлись двойными нокаутами и были также положительными в отношении направленной интеграции.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0050] В настоящем документе раскрыты композиции и способы для получения клеток, в которых экспрессия гена ТКР была модулирована, в результате чего клетки больше не содержат на своей поверхности ТКР, и/или в которых экспрессия гена В2М была модулирована, в результате чего клетки больше не экспрессируют В2М. Клетки,

модифицированные данным способом, можно применять в качестве терапевтических средств, например, трансплантатов, поскольку отсутствие комплекса ТКР предотвращает или снижает иммунный ответ на основе HLA. Дополнительно, в клетки, в которых были проведены манипуляции с геном ТКР и/или В2М, можно встроить другие гены, представляющие интерес (например, трансгены). Один или более дополнительных (отличных от ТКР и/или В2М) генов (например, генов другого ТКР, В2М, PD1, CTLA4, HLA, генов зоны безопасности и т.д.) можно модифицировать с помощью нокаута и/или направленной вставки экзогенных последовательностей. Экзогенные последовательности могут содержать химерные антигенные рецепторы для интеграции в модифицированные клетки, которые можно применять для лечения рака и аутоиммунных нарушений.

Общие сведения

[0051] При реализации на практике способов, а также получении и применении композиций, раскрытых в настоящем документе, если не указано обратное, применяют общепринятые методики молекулярной биологии, биохимии, структуры и анализа хроматина, вычислительной химии, культивирования клеток, рекомбинантной ДНК и смежных областей, которые находятся в пределах знаний специалистов в данной области техники. Данные методики полностью объяснены в литературе. См., например, руководства Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 и третье издание, 2001; Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 и периодические обновленные издания; серию METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, третье издание, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; и METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

30 Определения

[0052] Термины «нуклеиновая кислота», «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» используются взаимозаменяемо и обозначают полимерный дезоксирибонуклеотид или рибонуклеотид в линейной или кольцевой конформации и в одно- или двухцепочечной

форме. Для целей настоящего изобретения данные термины не следует истолковывать как ограничивающие применительно к длине полимера. Термины могут охватывать известные аналоги природных нуклеотидов, а также нуклеотиды, которые являются модифицированными в фрагментах основания, сахара и/или фосфата (например, фосфотиоатные остовы). Как правило, аналог конкретного нуклеотида характеризуется такой же специфичностью спаривания оснований; т.е. аналог А будет образовывать пару оснований с Т.

[0053] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используют взаимозаменяемо для обозначения полимера из оснований аминокислот. Данный термин также относится к полимерам аминокислот, в которых одна или более аминокислот являются химическими аналогами или модифицированными производными соответствующих встречающихся в природе аминокислот.

[0054] «Связывание» обозначает последовательность-специфичное нековалентное взаимодействие между макромолекулами (например, между белком и нуклеиновой кислотой). Не все компоненты взаимодействия должны быть последовательность-специфичными (например, контакты с фосфатными остатками в остовах ДНК), при условии, что взаимодействие в целом является последовательность-специфичным. Такие взаимодействия обычно характеризуются константой диссоциации (K_d), составляющей 10^{-6} M^{-1} или ниже. «Аффинность» обозначает силу связывания: повышенная аффинность связывания коррелирует с меньшей K_d . «Неспецифичное связывание» обозначает нековалентные взаимодействия, которые возникают между любой молекулой, представляющей интерес (например, сконструированной нуклеазой), и макромолекулой (например, ДНК), и которые не зависят от последовательности-мишени.

[0055] «ДНК-связывающая молекула» представляет собой молекулу, которая может связываться с ДНК. Такая ДНК-связывающая молекула может представлять собой полипептид, домен белка, домен в пределах большего белка или полинуклеотид. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид представляет собой ДНК, тогда как в других вариантах реализации полинуклеотид представляет собой РНК. В некоторых вариантах реализации ДНК-связывающая молекула представляет собой белковый домен нуклеазы (например, домен FokI), тогда как в других вариантах реализации ДНК-связывающая молекула представляет собой компонент направляющей РНК нуклеазы, направляемой РНК (например, Cas9 или Cpf1).

- [0056]** «Связывающий белок» представляет собой белок, который способен нековалентно связываться с другой молекулой. Связывающий белок может связываться, например, с молекулой ДНК (ДНК-связывающий белок), молекулой РНК (РНК-связывающий белок) и/или молекулой белка (белок-связывающий белок). В случае белок-связывающего белка он может связываться сам с собой (с образованием гомодимеров, гомотримеров и т.д.) и/или может связываться с одной или более молекулами другого белка или белков. Связывающий белок может обладать более чем одним типом связывающей активности. Например, белки с цинковым пальцем обладают ДНК-связывающей, РНК-связывающей и белок-связывающей активностью.
- [0057]** «ДНК-связывающий белок (или связывающий домен) с цинковым пальцем» представляет собой белок или домен в пределах большего белка, который связывается с ДНК последовательность-специфичным образом посредством одного или более цинковых пальцев, которые представляют собой участки аминокислотной последовательности в пределах связывающего домена, структура которого стабилизирована путем координации иона цинка. Таким образом, каждый цинковый палец ZFP с множеством пальцев содержит участок спирали распознавания для связывания с ДНК в пределах остова. Термин «ДНК-связывающий белок с цинковым пальцем» часто сокращенно обозначается как «белок с цинковым пальцем» или ZFP. Термин «нуклеаза с цинковым пальцем» включает одну ZFN, а также пару ZFN (члены пары обозначаются «левая и правая» или «первая и вторая», или «пара»), которые димеризуются для расщепления гена-мишени.
- [0058]** «ДНК-связывающий домен TALE» или «TALE» представляет собой полипептид, содержащий один или более повторов доменов/единиц TALE. Домены повторов, каждый содержащий повторяющийся варибельный двойной остаток (repeat variable diresidue, RVD), вовлечены в связывание TALE с его когнатной последовательностью-мишенью ДНК. Единичная «единица повтора» (также обозначаемая «повтор»), как правило, составляет 33 – 35 аминокислот в длину и демонстрирует по меньшей мере некоторую гомологию последовательности с другими последовательностями повтора TALE в пределах встречающегося в природе белка TALE. Белки TALE можно разработать так, чтобы они связывались с сайтом-мишенью, с применением канонических или неканонических RVD в пределах единиц повтора. См., например, патенты США №№ 8,586,526 и 9,458,205. Цинковый палец и ДНК-связывающие домены TALE могут быть «сконструированы», чтобы они связывались с заранее определенной нуклеотидной последовательностью, например, путем

конструирования (изменения одной или более аминокислот) спирального участка распознавания встречающегося в природе белка с цинковым пальцем или путем конструирования аминокислот, вовлеченных в связывание с ДНК (повторяющийся переменный двойной остаток или участок RVD). Вследствие этого сконструированные белки с цинковым пальцем или белки TALE представляют собой белки, которые не встречаются в природе. Неограничивающие примеры способов конструирования белков с цинковым пальцем и TALE представляют собой разработку (дизайн) и отбор. Разработанный белок представляет собой белок, не встречающийся в природе, дизайн/композиция которого в первую очередь обусловлена рациональными критериями. Рациональные критерии для разработки (дизайна) включают применение правил замены и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, в которой хранится информация о существующих вариантах дизайна ZFP или TALE (канонические и неканонические RVD) и данных о связывании. См., например, патенты США №№ 9,458,205; 8,586,526; 6,140,081; 6,453,242; и 6,534,261; см. также международные публикации патентов №№ WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; и WO 03/016496. Термин «TALEN» включает один TALEN, а также пару TALEN (члены пары обозначаются «левая и правая» или «первая и вторая», или «пара»), которые димеризуются для расщепления гена-мишени.

[0059] «Выбранный» белок с цинковым пальцем, белок TALE или система CRISPR/Cas не обнаруживаются в природе, и их продукция в первую очередь обусловлена эмпирическим процессом, таким как фаговый дисплей, ловушка взаимодействия или гибридный отбор. См., например, патенты США №№ 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759 и международные публикации патентов №№ WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; и WO 02/099084.

[0060] «TtAgo» представляет собой прокариотический белок Argonaute, который, как считают, вовлечен в сайленсинг генов. TtAgo получают из бактерии *Thermus thermophilus*. См., например, публикации Swarts, *et al.*, там же, G. Sheng, *et al.* (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 652). «Система TtAgo» представляет собой все необходимые компоненты, включая, например, направляющие ДНК, для расщепления ферментом TtAgo.

[0061] «Рекомбинация» обозначает процесс обмена генетической информацией между двумя полинуклеотидами. Для целей настоящего изобретения «гомологичная рекомбинация (ГР)» обозначает специальную форму такого обмена, которая

происходит, например, в течение восстановления двухцепочечных разрывов в клетках с помощью механизмов репарации, направляемой гомологией. Для данного процесса требуются гомология нуклеотидной последовательности, в нем используется «донорная» молекула для восстановления молекулы-«мишени» (т.е. той, в которой
5 произошел двухцепочечный разрыв) на основании матрицы, и данный процесс известен под различными названиями как «некрссоверная конверсия генов» или «конверсия генов короткого участка», поскольку он приводит к переносу генетической информации от донора к мишени. Не опираясь на какую-либо конкретную теорию, считают, что в такой перенос может быть вовлечена коррекция ошибочного
10 спаривания гетеродуплексной ДНК, которая образуется между разорванной мишенью и донором, и/или «зависимый от синтеза отжиг цепей», в котором донор применяют для повторного синтеза генетической информации, которая станет частью мишени, и/или связанных процессов. Такая специализированная ГР часто приводит к изменению последовательности молекулы-мишени, в результате чего часть или вся
15 последовательность донорного полинуклеотида встраивается в полинуклеотид-мишень.

[0062] В способах согласно настоящему изобретению одна или более направленных нуклеаз, описанных в настоящем документе, создают двухцепочечный разрыв (ДЦР) в последовательности-мишени (например, хроматине клетки) в заранее
20 определенном сайте (например, гене или локусе, представляющем интерес), и в клетку может быть введен «донорный» полинуклеотид, обладающий гомологией с нуклеотидной последовательностью в участке разрыва. Было показано, что присутствие ДЦР способствует интеграции донорной последовательности. Необязательно, конструкция обладает гомологией с нуклеотидной
25 последовательностью в участке разрыва. Донорную последовательность можно физически интегрировать или, в качестве альтернативы, донорный полинуклеотид применяют в качестве матрицы для восстановления разрыва с помощью гомологичной рекомбинации, что приводит к введению всей или части нуклеотидной последовательности, как в доноре, в хроматин клетки. Таким образом, первую
30 последовательность в клеточном хроматине можно изменить и в определенных вариантах реализации можно преобразовать в последовательность, присутствующую в донорном полинуклеотиде. Таким образом, использование терминов «заменить» или «замена» следует понимать как представляющее замену одной нуклеотидной последовательности другой (т.е. замену последовательности в информационном

смысле), и для данных терминов не обязательно требуется физическая или химическая замена одного полинуклеотида другим.

[0063] В любом из способов, описанных в настоящем документе, дополнительные пары белков с цинковым пальцем можно применять для
5 дополнительного двухцепочечного расщепления дополнительных сайтов-мишеней в пределах клетки.

[0064] В определенных вариантах реализации способов направленной рекомбинации и/или замены, и/или изменения последовательности в участке, представляющем интерес, в клеточном хроматине хромосомная последовательность
10 изменена путем гомологичной рекомбинации с экзогенной «донорной» нуклеотидной последовательностью. Такая гомологичная рекомбинация стимулируется присутствием двухцепочечного разрыва в клеточном хроматине, если присутствуют последовательности, гомологичные участку разрыва.

[0065] В любом из способов, описанных в настоящем документе, первая
15 нуклеотидная последовательность («донорная последовательность») может содержать последовательности, которые являются гомологичными, но не идентичными, геномным последовательностям в участке, представляющем интерес, посредством этого стимулируя гомологичную рекомбинацию для встраивания неидентичной последовательности в участке, представляющем интерес. Таким образом, в
20 определенных вариантах реализации части донорной последовательности, которые являются гомологичными последовательностям в участке, представляющем интерес, демонстрируют от приблизительно 80 до 99% (или любое целое число между ними) идентичности последовательности с геномной последовательностью, которую заменяют. В других вариантах реализации гомология между донорной и геномной
25 последовательностью превышает 99%, например, если донорная и геномная последовательности отличаются только 1 нуклеотидом из более 100 непрерывных пар оснований. В определенных случаях негомологичная часть донорной последовательности может содержать последовательности, не присутствующие в участке, представляющем интерес, в результате чего новые последовательности вводят
30 в участок, представляющий интерес. В данных случаях негомологичная последовательность обычно фланкирована последовательностями из 50 – 1000 пар оснований (или любое целочисленное значение между ними) или любого числа пар оснований более чем 1000, которые являются гомологичными либо идентичными последовательностям в участке, представляющем интерес. В других вариантах

реализации донорная последовательность является негомологичной первой последовательности и встроена в геном с помощью механизмов негомологичной рекомбинации.

- 5 **[0066]** Любой из способов, описанных в настоящем документе, можно применять для частичной или полной инактивации одной или более последовательностей-мишеней в клетке путем направленной интеграции донорной последовательности, которая нарушает экспрессию гена (генов), представляющих интерес. Также предложены линии клеток с частично или полностью инактивированными генами.
- 10 **[0067]** Более того, способы направленной интеграции, описанные в настоящем документе, можно также применять для интеграции одной или более экзогенных последовательностей. Экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты может содержать, например, один или более генов либо молекул кДНК, или любой тип кодирующей либо не кодирующей последовательности, а также один или более
- 15 контрольных элементов (например, промоторов). Помимо этого, экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты может продуцировать одну или более молекул РНК (например, малые шпилечные РНК (мшРНК), ингибиторные РНК (РНКи), микроРНК (miRNA) и т.д.).

- [0068]** «Расщепление» обозначает разрыв ковалентного остова молекулы ДНК.
- 20 Расщепление можно вызвать множеством способов, включая, без ограничения, ферментативный или химический гидролиз фосфодиэфирной связи. Возможно как одноцепочечное расщепление, так и двухцепочечное расщепление, и двухцепочечное расщепление может возникнуть в результате двух отдельных событий одноцепочечного расщепления. Расщепление ДНК может привести к образованию
- 25 тупых концов или ступенчатых концов. В определенных вариантах реализации слитые полипептиды применяют для направленного двухцепочечного расщепления ДНК.

- [0069]** «Полудомен расщепления» представляет собой полипептидную последовательность, которая в сочетании со вторым полипептидом (идентичным или
- 30 отличным) образует комплекс, обладающий активностью расщепления (предпочтительно, активностью двухцепочечного расщепления). Термины «первый и второй полудомены расщепления», «+ и – полудомены расщепления» и «левый и правый полудомены расщепления» применяют взаимозаменяемо для обозначения пар полудоменов расщепления, которые димеризуются.

[0070] «Сконструированный полудомен расщепления» представляет собой полудомен расщепления, который был модифицирован для того, чтобы образовывать обязательные гетеродимеры с другим полудоменом расщепления (например, другим сконструированным полудоменом расщепления). См. также патенты США №№ 7,888,121; 7,914,796; 8,034,598; 8,623,618 и публикацию патента США № 2011/0201055, полностью включенные в настоящий документ посредством ссылки.

[0071] Термин «последовательность» обозначает нуклеотидную последовательность любой длины, которая может представлять собой ДНК или РНК; может быть линейной, кольцевой или разветвленной и может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Термин «донорная последовательность» обозначает нуклеотидную последовательность, которая встроена в геном. Донорная последовательность может быть любой длины, например, от 2 до 10000 нуклеотидов в длину (или любое целочисленное значение между ними либо более), предпочтительно, от приблизительно 100 до 1000 нуклеотидов в длину (или любое целое число между ними), более предпочтительно, от приблизительно 200 до 500 нуклеотидов в длину.

[0072] «Хроматин» представляет собой нуклеопротеиновую структуру, содержащую геном клетки. Клеточный хроматин содержит нуклеиновую кислоту, преимущественно, ДНК, и белок, включая гистоны и негистоновые хромосомные белки. Большая часть хроматина эукариотических клеток существует в форме нуклеосом, причем сердцевина (кор) нуклеосом содержит приблизительно 150 пар оснований ДНК, связанных с октамером, содержащим по два каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4; а линкерная ДНК (варьирующей длины в зависимости от организма) выступает между сердцевинами нуклеосом. Молекула гистона H1 обычно связана с линкерной ДНК. Для целей настоящего изобретения термин «хроматин» охватывает все типы клеточного нуклеопротеина как прокариотического, так и эукариотического. Клеточный хроматин включает как хромосомный, так и эписомный хроматин.

[0073] «Хромосома» представляет собой хроматиновый комплекс, содержащий весь геном клетки или его часть. Геном клетки часто характеризуется его кариотипом, представляющим собой совокупность всех хромосом, которые содержит геном клетки. Геном клетки может содержать одну или более хромосом.

[0074] «Эписома» представляет собой реплицирующуюся нуклеиновую кислоту, нуклеопротеиновый комплекс или другую структуру, содержащую

нуклеиновую кислоту, которая не является частью хромосомного кариотипа клетки. Примеры эписом включают плазмиды и определенные вирусные геномы.

5 [0075] «Сайт-мишень» или «последовательность-мишень» представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая определяет часть нуклеиновой кислоты, с которой свяжется связывающая молекула, при условии, что присутствуют достаточные условия для связывания. Например, последовательность 5' GAATTC 3' представляет собой сайт-мишень для рестрикционной эндонуклеазы Eco RI.

10 [0076] «Экзогенная» молекула представляет собой молекулу, которая в норме не присутствует в клетке, но может быть введена в клетку одним или более генетическими, биохимическими или другими способами. «Присутствие в клетке в норме» определяют применительно к конкретной стадии развития и окружающим условиям клетки. Таким образом, например, молекула, которая присутствует исключительно во время эмбрионального развития мышцы, является экзогенной молекулой применительно к взрослой мышечной клетке. Аналогично, молекула, индуцированная тепловым шоком, является экзогенной молекулой применительно к клетке, которая не подверглась тепловому шоку. Экзогенная молекула может включать, например, функционирующую версию ненадлежащим образом функционирующей эндогенной молекулы или ненадлежащим образом функционирующую версию нормально функционирующей эндогенной молекулы.

20 [0077] Экзогенная молекула может представлять собой, среди прочего, малую молекулу, такую как получаемая с помощью процесса комбинаторной химии, или макромолекулу, такую как белок, нуклеиновая кислота, углевод, липид, гликопротеин, липопротеин, полисахарид, любое модифицированное производное вышеуказанных молекул или любой комплекс, содержащий одну или более вышеуказанных молекул.

25 Нуклеиновые кислоты включают ДНК и РНК, могут быть одно- или двухцепочечными; могут быть линейными, разветвленными или кольцевыми; могут быть любой длины. См., например, патенты США №№ 8,703,489 и 9,255,259. Нуклеиновые кислоты включают таковые, способные образовывать дуплексы, а также нуклеиновые кислоты, образующие триплексы. См., например, патенты США №№ 5,176,996 и 5,422,251. Белки включают, без ограничения, ДНК-связывающие белки, факторы транскрипции, факторы, ремоделирующие хроматин, белки, связывающие метилированную ДНК, полимеразы, метилазы, деметилазы, ацетилазы, деацетилазы, киназы, фосфатазы, интегразы, рекомбиназы, лигазы, топоизомеразы, гиразы и геликазы.

[0078] Экзогенная молекула может представлять собой тот же тип молекулы, что и эндогенная молекула, например, экзогенный белок или нуклеиновая кислота. Например, экзогенная нуклеиновая кислота может включать инфицирующий вирусный геном, плазмиду или эписому, введенные в клетку, или хромосому, которая в норме не присутствует в клетке. Способы введения экзогенной молекулы в клетки известны специалистам в данной области техники и включают, без ограничения, перенос, опосредованный липидами (т.е. липосомы, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние клеток, бомбардировку частицами, копреципитацию с фосфатом кальция, перенос, опосредованный DEAE-декстраном, и перенос, опосредованный вирусным вектором. Экзогенная молекула может также представлять собой тот же тип молекулы, что и эндогенная молекула, но полученный из отличного вида, чем вид, из которого была получена клетка. Например, последовательность нуклеиновой кислоты человека может быть введена в линию клеток, изначально полученную из мыши или хомяка.

[0079] Напротив, «эндогенная» молекула представляет собой таковую, которая в норме присутствует в конкретной клетке на конкретной стадии развития при конкретных окружающих условиях. Например, эндогенная нуклеиновая кислота может включать хромосому, геном митохондрия, хлоропласта или другой органеллы либо встречающуюся в природе эписомную нуклеиновую кислоту. Дополнительные эндогенные молекулы могут включать белки, например, факторы транскрипции и ферменты.

[0080] «Слитая» молекула представляет собой молекулу, в которой две или более субъединицы молекулы соединены, предпочтительно, ковалентно. Субъединицы молекулы могут являться одним химическим типом молекул или могут являться различными химическими типами молекул. Примеры слитой молекулы первого типа включают, без ограничения, слитые белки (например, слияние между ДНК-связывающим доменом ZFP или TALE и одним или более доменами активации) и слитые нуклеиновые кислоты (например, нуклеиновые кислоты, кодирующие слитый белок, описанные выше). Примеры слитой молекулы второго типа включают, без ограничения, слияние между нуклеиновой кислотой, образующей триплекс, и полипептидом и слияние между молекулой, связывающейся с малой бороздкой, и нуклеиновой кислотой. Данный термин также включает системы, в которых полинуклеотидный компонент связывается с полипептидным компонентом с образованием функциональной молекулы (например, система CRISPR/Cas, в которой

одинокая направляющая РНК связывается с функциональным доменом, чтобы модулировать экспрессию гена).

[0081] Экспрессия слитого белка в клетке может быть следствием доставки слитого белка в клетку или доставки полинуклеотида, кодирующего слитый белок, в клетку, где полинуклеотид транскрибируется, а транскрипт транслируется для получения слитого белка. Транс-сплайсинг, расщепление полипептида и лигирование полипептида могут также участвовать в экспрессии белка в клетке. Способы доставки полинуклеотида и полипептида в клетки представлены в другом месте в настоящем изобретении.

10 **[0082]** «Ген» для целей настоящего изобретения включает участок ДНК, кодирующий продукт гена (см. ниже), а также все участки ДНК, которые регулируют образование продукта гена, независимо от того, прилегают ли такие регуляторные последовательности к кодирующей и/или транскрибируемой последовательностям. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничивается ими, 15 последовательности промотора, терминаторы, трансляционные регуляторные последовательности, такие как участки связывания рибосомы и внутренние участки посадки рибосомы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, точки начала репликации, участки присоединения к матриксу и контрольные участки локуса.

[0083] Локус «зоны безопасности» представляет собой локус в пределах генома, 20 в который можно встроить ген без каких-либо вредных эффектов в отношении клеток-хозяев. Наиболее предпочтительным является локус зоны безопасности, в котором экспрессия встроенной последовательности гена не нарушается какой-либо экспрессией со сквозным прочитыванием с соседних генов. Неограничивающие примеры локусов зоны безопасности, на которые направлена нуклеаза (нуклеазы), 25 включают CCR5, CCR5, HPRT, AAVS1, *Rosa* и альбумин. См., например, патенты США №№ 8,771,985; 8,110,379; 7,951,925; публикации патентов США №№ 2010/0218264; 2011/0265198; 2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983; 2013/0177960; 2015/0056705; и 2015/0159172).

[0084] «Экспрессия гена» обозначает преобразование информации, 30 содержащейся в гене, в продукт гена. Продукт гена может представлять собой прямой транскрипционный продукт гена (например, мРНК, тРНК, рРНК, антисмысловую РНК, рибозим, структурную РНК или любой другой тип РНК) либо белок, образованный в результате трансляции мРНК. Продукты гена также включают РНК, которые были модифицированы в результате процесса, такого как кэпирование, полиаденилирование,

метилирование и редактирование, и белки, модифицированные с помощью, например, метилирования, ацетилирования, фосфорилирования, убиквитинирования, АДФ-рибозилирования, миристилирования и гликозилирования.

5 «Модуляция» или «модификация» экспрессии гена обозначает изменение активности гена. Модуляция экспрессии может включать, без ограничения, активацию гена и репрессию гена, в том числе путем модификации гена с помощью связывания экзогенной молекулы (например, сконструированного фактора транскрипции). Модуляции можно также достичь путем модификации последовательности гена с помощью редактирования генома (например, расщепление, изменение, инактивация, 10 случайная мутация). Инактивация гена обозначает любое снижение экспрессии гена по сравнению с клеткой, которая не была модифицирована, как описано в настоящем документе. Таким образом, инактивация гена может быть частичной или полной.

[0085] «Участок, представляющий интерес», представляет собой любой участок клеточного хроматина, такой как, например, ген или некодирующая 15 последовательность в пределах или поблизости от гена, с которым, желательно, должна связаться экзогенная молекула. Связывание может осуществляться для целей направленного расщепления ДНК и/или направленной рекомбинации. Участок, представляющий интерес, может присутствовать в хромосоме, эписоме, геноме органеллы (например, митохондрии, хлоропласта) или геноме инфицирующего вируса, 20 например. Участок, представляющий интерес, может находиться в пределах кодирующего участка гена, в пределах транскрибируемых некодирующих участков, таких как, например, лидерные последовательности, трейлерные последовательности или интроны, либо в пределах нетранскрибируемых участков, будь то в направлении 3'-5' или в направлении 5'-3' от кодирующего участка. Участок, представляющий 25 интерес, может составлять до одной пары нуклеотидов или до 2000 пар нуклеотидов в длину, или любое целночисленное значение пар нуклеотидов.

[0086] «Эукариотические» клетки включают, без ограничения, клетки грибов (таких как дрожжи), клетки растений, клетки животных, клетки млекопитающих и клетки человека (например, Т-клетки).

30 **[0087]** Термины «функциональная связь» и «функционально связанный» используют взаимозаменяемо применительно к непосредственному соприкосновению двух или более компонентов (таких как элементы последовательности), при котором компоненты организованы так, чтобы оба компонента нормально функционировали и обеспечивали возможность, чтобы по меньшей мере один из компонентов мог

опосредовать функцию, которую выполняет по меньшей мере один другой компонент. В качестве примера, транскрипционная регуляторная последовательность, такая как промотор, является функционально связанной с кодирующей последовательностью, если транскрипционная регуляторная последовательность контролирует уровень транскрипции кодирующей последовательности в ответ на присутствие или отсутствие одного или более транскрипционных регуляторных факторов. Транскрипционная регуляторная последовательность обычно функционально связана в цис-положении с кодирующей последовательностью, но не обязательно должна непосредственно прилегать к ней. Например, энхансер представляет собой транскрипционную регуляторную последовательность, которая функционально связана с кодирующей последовательностью, даже если они не являются смежными.

[0088] Применительно к слитым полипептидам термин «функционально связанный» может обозначать тот факт, что каждый из компонентов выполняет одну и ту же функцию в связанном состоянии с другим компонентом, которую он выполнял бы, если бы не был связан таким образом. Например, применительно к слитому полипептиду, в котором ДНК-связывающий домен (например, ZFP, TALE) слит с доменом активации, ДНК-связывающий домен и домен активации находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде часть ДНК-связывающего домена способна связываться со своим сайтом-мишенью и/или со своим сайтом связывания, в то время как домен активации способен повышающе регулировать экспрессию гена. Применительно к слитому полипептиду, в котором ДНК-связывающий домен слит с доменом расщепления, ДНК-связывающий домен и домен расщепления находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде часть ДНК-связывающего домена способна связываться со своим сайтом-мишенью и/или со своим сайтом связывания, в то время как домен расщепления способен расщеплять ДНК поблизости от сайта-мишени. Аналогично, применительно к слитому полипептиду, в котором ДНК-связывающий домен слит с доменом активации или репрессии, ДНК-связывающий домен и домен активации или репрессии находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде часть ДНК-связывающего домена способна связываться со своим сайтом-мишенью и/или со своим сайтом связывания, в то время как домен активации способен повышающе регулировать экспрессию гена, или домен репрессии способен понижающе регулировать экспрессию гена.

[0089] «Функциональный фрагмент» белка, полипептида или нуклеиновой кислоты представляет собой белок, полипептид или нуклеиновую кислоту,

последовательность которых не идентична полноразмерному белку, полипептиду или нуклеиновой кислоте, но которые при этом сохраняют ту же функцию, что и полноразмерный белок, полипептид или нуклеиновая кислота. Функциональный фрагмент может содержать большее, меньшее или такое же число остатков, что и соответствующая нативная молекула, и/или может содержать одну или более замен аминокислот или нуклеотидов. Способы определения функции нуклеиновой кислоты (например, кодирующей функции, способности гибридизоваться с другой нуклеиновой кислотой) хорошо известны в данной области техники. Аналогично хорошо известны способы определения функции белка. Например, ДНК-связывающую функцию полипептида можно определить, например, с помощью связывания на фильтрах, в анализе сдвига электрофоретической подвижности или в анализе иммунопреципитации. Расщепление ДНК можно проанализировать методом гелевого электрофореза. См. публикацию Ausubel, *et al.*, *выше*. Способность белка взаимодействовать с другим белком можно определить, например, методом коиммунопреципитации, двухгибридных анализов или комплементации как генетической, так и биохимической. См., например, публикацию Fields, *et al.* (1989) *Nature* 340:245-246; патент США № 5,585,245 и международную публикацию патента № WO 98/44350.

[0090] «Вектор» способен переносить последовательности генов в клетки-мишени. Как правило, «конструкция вектора», «вектор экспрессии» и «вектор для переноса генов» обозначает любую конструкцию нуклеиновой кислоты, которая способна направлять экспрессию гена, представляющего интерес, и которая может переносить последовательности генов в клетки-мишени. Таким образом, данный термин включает векторы клонирования и экспрессии, а также интегрирующие векторы.

[0091] «Репортерный ген» или «репортерная последовательность» обозначает любую последовательность, продуцирующую белковый продукт, который легко измерять, предпочтительно, хотя и не обязательно, в рутинном анализе. Подходящие репортерные гены включают, без ограничения, последовательности, кодирующие белки, которые опосредуют устойчивость к антибиотикам (например, устойчивость к ампициллину, устойчивость к неомицину, устойчивость к G418, устойчивость к пурамицину), последовательности, кодирующие окрашенные или флуоресцентные, или люминесцентные белки (например, зеленый флуоресцентный белок, усиленный зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, люциферазу), и

белки, которые опосредуют усиленный рост клеток и/или амплификацию генов (например, дигидрофолатредуктаза). Эпитопные метки включают, например, одну или более копий FLAG, His, myc, Tap, HA или любую обнаруживаемую аминокислотную последовательность. «Метки экспрессии» включают последовательности, кодирующие репортеры, которые могут быть функционально связаны с желаемой последовательностью гена для мониторинга экспрессии гена, представляющего интерес.

[0092] Термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо и обозначают млекопитающих, таких как пациенты-люди и отличные от человека приматы, а также подопытные животные, такие как кролики, собаки, кошки, крысы, мыши и другие животные. Соответственно, термин «субъект» или «пациент» в настоящем документе обозначает любого пациента-млекопитающего или субъекта-млекопитающего, которому могут быть введены кассеты экспрессии согласно настоящему изобретению. Субъекты согласно настоящему изобретению включают таковых с нарушением или таковых, подверженных риску развития нарушения.

[0093] Термин «лечение» в настоящем документе обозначает снижение тяжести и/или частоты симптомов, устранение симптомов и/или первопричины, предотвращение возникновения симптомов и/или их первопричины и улучшение или устранение повреждения. Рак и реакции «трансплантат против хозяина» являются неограничивающими примерами состояний, которые можно лечить с применением композиций и способов, описанных в настоящем документе. Таким образом, «лечение» включает:

- (i) предотвращение возникновения заболевания или состояния у млекопитающего, в частности, когда такое млекопитающее предрасположено к состоянию, но ему еще не был поставлен диагноз указанного состояния;
- (ii) ингибирование заболевания или состояния, т.е. прекращение его развития;
- (iii) облегчение заболевания или состояния, т.е. вызов регрессии заболевания или состояния; или
- (iv) облегчение симптомов, которые являются следствием заболевания или состояния, т.е. облегчение боли, не затрагивая первопричину заболевания или состояния.

[0094] В настоящем документе термины «заболевание» и «состояние» могут использоваться взаимозаменяемо или могут отличаться тем, что у конкретного расстройства или состояния может не быть известного возбудителя (в силу чего его

этиология еще не была разработана), и вследствие этого данное расстройство или состояние еще не признается заболеванием, но только нежелательным состоянием или синдромом, для которого клиницистами был идентифицирован более или менее конкретный набор симптомов.

5 **[0095]** «Фармацевтическая композиция» обозначает состав соединения согласно настоящему изобретению и среды, повсеместно принятой в данной области техники для доставки биологически активного соединения млекопитающим, например, людям. Такая среда включает все фармацевтически приемлемые носители, разбавители или вспомогательные вещества для них.

10 **[0096]** «Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» обозначает такое количество соединения согласно настоящему изобретению, которое при введении млекопитающему, предпочтительно, человеку, является достаточным для осуществления лечения млекопитающего, предпочтительно, человека. Количество композиции согласно настоящему изобретению, которое
15 составляет «терапевтически эффективное количество», будет варьировать в зависимости от соединения, состояния и его тяжести, способа введения и возраста млекопитающего, лечение которого проводят, однако может быть определено рутинным способом средним специалистом в данной области техники на основании его собственных знаний и данного изобретения.

20

ДНК-связывающие домены

[0097] В настоящем документе описаны композиции, содержащие ДНК-связывающий домен, который специфично связывается с сайтом-мишенью в любом гене, содержащем регулятор гена HLA или HLA. В композициях и способах,
25 раскрытых в настоящем документе, можно применять любой ДНК-связывающий домен, включая, без ограничения, ДНК-связывающий домен с цинковым пальцем, ДНК-связывающий домен TALE, ДНК-связывающую часть (sgRNA) нуклеазы CRISPR/Cas или ДНК-связывающий домен из мегануклеазы. ДНК-связывающий домен может связываться с любой последовательностью-мишенью в пределах гена, включая,
30 без ограничения, последовательность-мишень из 12 или более нуклеотидов, как представлено в любом из сайтов-мишеней, раскрытых в настоящем документе (SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103).

[0098] В определенных вариантах реализации ДНК-связывающий домен содержит белок с цинковым пальцем. Предпочтительно, белок с цинковым пальцем

является не встречающимся в природе в том смысле, что он был сконструирован для того, чтобы связываться с сайтом-мишенью, представляющим интерес. См., например, публикации Beerli, *et al.* (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo, *et al.* (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan, *et al.* (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal, *et al.* 5 (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo, *et al.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; патенты США №№ 6,453,242; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,030,215; 6,794,136; 7,067,317; 7,262,054; 7,070,934; 7,361,635; и 7,253,273; и публикации патентов США №№ 2005/0064474; 2007/0218528; и 2005/0267061, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В 10 определенных вариантах реализации ДНК-связывающий домен содержит белок с цинковым пальцем, раскрытый в публикации патента США № 2012/0060230 (например, таблица 1), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В других вариантах реализации ДНК-связывающий домен содержит компонент ZFP (обозначаемый «варианты дизайна») и в том числе участки 15 спирали распознавания и остовы, как представлено в ZFN из таблиц 1, 2, 4, 5, 6 или 8, включая, без ограничения, домены ZFP из ZFN 72732; 72748; 68957; или 72678.

[0099] Сконструированный связывающий домен с цинковым пальцем может обладать новой специфичностью связывания по сравнению с встречающимся в природе белком с цинковым пальцем. Способы конструирования включают, без 20 ограничения, рациональный дизайн и различные типы отбора. Рациональный дизайн включает, например, применение баз данных, содержащих триплетные (или квадруплетные) нуклеотидные последовательности и индивидуальные аминокислотные последовательности цинковых пальцев, в которых нуклеотидная последовательность каждого триплета или квадруплета связана с одной или более 25 аминокислотных последовательностей цинковых пальцев, которые связываются с конкретной последовательностью триплета или квадруплета. См., например, патенты США №№ 6,453,242 и 6,534,261, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0100] Иллюстративные способы отбора, включая фаговый дисплей и 30 двухгибридные системы, раскрыты в патентах США №№ 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; и 6,242,568; а также в международных публикациях патентов №№ WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; и WO 01/88197 и GB 2,338,237. Помимо этого, усиление специфичности

связывания для связывающих доменов с цинковым пальцем было описано, например, в патенте США № 6,794,136.

[0101] Помимо этого, как раскрыто в данном и других источниках, домены с цинковым пальцем и/или белки с цинковым пальцем, содержащие множество пальцев, могут быть соединены с применением любых подходящих линкерных последовательностей, включая, например, линкеры из 5 или более аминокислот в длину. См. также патенты США №№ 6,479,626; 6,903,185; и 7,153,949 применительно к иллюстративным линкерным последовательностям из 6 или более аминокислот в длину. Белки, описанные в настоящем документе, могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка. Помимо этого, усиление специфичности связывания для связывающих доменов с цинковым пальцем было описано, например, в патенте США № 6,794,136.

[0102] Отбор сайтов-мишеней, ZFP и способы дизайна и конструирования слитых белков (и кодирующих их полинуклеотидов) известны специалистам в данной области техники и подробно описаны в патентах США №№ 6,140,081; 5,789,538; 6,453,242; 6,534,261; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; и в международных публикациях патентов №№ WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; и WO 03/016496.

[0103] Помимо этого, как раскрыто в данном и других источниках, домены с цинковым пальцем и/или белки с цинковым пальцем, содержащие множество пальцев, могут быть соединены с применением любых подходящих линкерных последовательностей, включая, например, линкеры из 5 или более аминокислот в длину. См. также патенты США №№ 6,479,626; 6,903,185; 7,153,949; 7,888,121; 7,914,796; 8,034,598; 8,623,618; 9,567,609; и публикацию патента США № 2017/0218349 применительно к иллюстративным линкерным последовательностям. Белки, описанные в настоящем документе, могут содержать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка.

[0104] В определенных вариантах реализации ДНК-связывающий домен представляет собой сконструированный белок с цинковым пальцем, который связывается (последовательность-специфичным образом) с сайтом-мишенью в гене ТКР или регуляторном гене ТКР и модулирует экспрессию гена ТКР. В некоторых вариантах реализации белок с цинковым пальцем связывается с сайтом-мишенью в ТКРА, в то время как в других вариантах реализации цинковый палец связывается с

сайтом-мишенью в ТРВК. В других вариантах реализации ДНК-связывающий домен представляет собой сконструированный белок с цинковым пальцем, который связывается (последовательность-специфичным образом) с сайтом-мишенью в гене В2М и модулирует экспрессию гена В2М. Неограничивающие иллюстративные варианты реализации данных ДНК-связывающих доменов представлены в таблицах 1, 2 и 6 (ТКР) и в таблицах 5 и 8 (В2М). В определенных вариантах реализации ZFP содержит часть ZFP из ZFN, обозначенных 72732; 72748; 68957; или 72678.

[0105] Как правило, ZFP содержат по меньшей мере три пальца. Некоторые из ZFP содержат четыре, пять или шесть пальцев. ZFP, которые содержат три пальца, как правило, распознают сайт-мишень, который содержит 9 или 10 нуклеотидов; ZFP, которые содержат четыре пальца, как правило, распознают сайт-мишень, который содержит от 12 до 14 нуклеотидов; тогда как ZFP, которые содержат шесть пальцев, могут распознавать сайт-мишень, который содержит от 18 до 21 нуклеотида. ZFP могут также представлять собой слитые белки, которые содержат один или более регуляторных доменов, причем указанные домены могут являться транскрипционными доменами активации или репрессии.

[0106] В некоторых вариантах реализации ДНК-связывающий домен может быть получен из нуклеазы. Например, известны последовательности распознавания хоминг-эндонуклеаз и мегануклеаз, таких как I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. См. также патент США № 5,420,032; патент США № 6,833,252; Belfort, *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon, *et al.* (1989) *Gene* 82:115-118; Perler, *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble, *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast, *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 и каталог New England Biolabs. Помимо этого, ДНК-связывающая специфичность хоминг-эндонуклеаз и мегануклеаз может быть сконструирована, чтобы они связывались с неприродными сайтами-мишенями. См., например, публикации Chevalier, *et al.* (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat, *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth, *et al.* (2006) *Nature* 441:656-659; Pâques, *et al.* (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; публикацию патента США № 2007/0117128.

[0107] В других вариантах реализации ДНК-связывающий домен содержит сконструированный домен из TAL-эффектора, подобный таковым, полученным из патогенов растений *Xanthomonas* (см. публикации Boch, *et al.* (2009) *Science* 326: 1509-1512 и Moscou and Bogdanove (2009) *Science* 326:1501) и *Ralstonia* (см. публикацию

Heuer, *et al.* (2007) *Applied and Environmental Microbiology* 73(13): 4379-4384); публикации патентов США №№ 2011/0301073 и 2011/0145940. Известно, что патогенные бактерии растений из рода *Xanthomonas* вызывают множество заболеваний важных сельскохозяйственных растений. Патогенез *Xanthomonas* зависит от консервативной системы секреции III типа (T3S), которая инъецирует более 25 различных эффекторных белков в клетки растений. Среди данных инъецированных белков присутствуют эффекторы, подобные активаторам транскрипции (transcription activator-like effectors, TALE), которые имитируют транскрипционные активаторы растений и манипулируют с транскриптом растения (см. публикацию Kay, *et al.* (2007) *Science* 318:648-651). Данные белки содержат ДНК-связывающий домен и транскрипционный домен активации. Один из наиболее хорошо охарактеризованных TALE представляет собой AvrBs3 из *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (см. публикацию Bonas, *et al.* (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136 и международную публикацию патента № WO 2010/079430). TALE содержат централизованный домен тандемных повторов, причем каждый повтор содержит приблизительно 34 аминокислоты, которые являются ключевыми для специфичности связывания ДНК данных белков. Помимо этого, они содержат последовательность ядерной локализации и кислый транскрипционный домен активации (обзор см. в публикации Schornack S., *et al.* (2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256-272). Помимо этого, было обнаружено, что в фитопатогенных бактериях *Ralstonia solanacearum* два гена, обозначаемые brg11 и hpx17, являются гомологичными семейству AvrBs3 из *Xanthomonas* в *R. solanacearum* биовар 1 штамм GMI1000 и в биовар 4 штамм RS1000 (см. публикацию Heuer, *et al.* (2007) *Appl and Envir Micro* 73(13):4379-4384). Данные гены являются на 98,9% идентичными друг другу по нуклеотидной последовательности, но отличаются на делецию 1575 п.о. в домене повтора hpx17. Однако оба продукта гена характеризуются идентичностью последовательности менее 40% с белками семейства AvrBs3 *Xanthomonas*.

[0108] Специфичность данных TAL-эффекторов зависит от последовательностей, обнаруженных в тандемных повторах. Повторяющаяся последовательность содержит приблизительно 102 пар оснований, и повторы, как правило, являются на 91 – 100% гомологичными друг другу (Bonas, *et al.*, *там же*). Полиморфизм повторов, как правило, расположен в положениях 12 и 13, и, как представляется, там существует взаимно-однозначное соответствие между идентичностью гипервариабельных двойных остатков (repeat variable diresidue или

участок RVD) в положениях 12 и 13 и идентичностью непрерывных нуклеотидов в последовательности-мишени TAL-эффектора (см. публикации Moscou and Bogdanove (2009) *Science* 326:1501 и Boch, *et al.* (2009) *Science* 326:1509-1512). В экспериментах был определен природный код распознавания ДНК данных TAL-эффекторов, так что последовательность HD в положениях 12 и 13 (повторяющийся вариабельный двойной остаток или RVD) приводит к связыванию с цитозином (C), NG связывается с T, NI с A, C, G или T, NN связывается с A или G, и ING связывается с T. Данные ДНК-связывающие повторы были собраны в белки с новыми комбинациями и числом повторов, чтобы получить искусственные факторы транскрипции, которые способны взаимодействовать с новыми последовательностями и активировать экспрессию неэндогенного репортерного гена в клетках растений (Boch, *et al.*, *там же*). Сконструированные TAL-белки были соединены с полудоменом расщепления FokI для получения слияния TAL-эффектора с доменом нуклеазы (TALEN), включая TALEN с атипичными RVD. См., например, патент США № 8,586,526.

15 **[0109]** В некоторых вариантах реализации TALEN содержит домен расщепления или полудомен расщепления эндонуклеазы (например, FokI). В других вариантах реализации TALE-нуклеаза представляет собой mega-TAL. Данные mega-TAL-нуклеазы представляют собой слитые белки, содержащие ДНК-связывающий домен TALE и домен расщепления мегануклеазы. Домен расщепления мегануклеазы является активным в виде мономера, и ему для осуществления активности не требуется димеризация. (См. публикацию Boissel, *et al.* (2013) *Nucl Acid Res*: 1-13, doi: 10.1093/nar/gkt1224).

20 **[0110]** В еще одних вариантах реализации нуклеаза содержит компактный TALEN. Компактные TALEN представляют собой одноцепочечные слитые белки, связывающие ДНК-связывающий домен TALE с доменом нуклеазы *TevI*. Слитый белок либо может выступать в качестве никазы, локализованной участком TALE, либо может создавать двухцепочечный разрыв в зависимости от того, где расположен ДНК-связывающий домен TALE относительно домена нуклеазы *TevI* (см. публикацию Beurdeley, *et al.* (2013) *Nat Comm* 4:1762 DOI: 10.1038/ncomms2782). Помимо этого, домен нуклеазы может также демонстрировать ДНК-связывающую функциональность.

25 Любые TALEN можно применять в сочетании с дополнительными TALEN (например, одним или более TALEN (сTALEN или FokI-TALEN) с одной или более mega-TALE.

30 **[0111]** Помимо этого, как раскрыто в данном и других источниках, домены с цинковым пальцем и/или белки с цинковым пальцем, содержащие множество пальцев,

или TALE могут быть соединены с применением любых подходящих линкерных последовательностей, включая, например, линкеры из 5 или более аминокислот в длину. См. также патенты США №№ 6,479,626; 6,903,185; и 7,153,949 применительно к иллюстративным линкерным последовательностям из 6 или более аминокислот в длину. Белки, описанные в настоящем документе, могут содержать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными белками с цинковым пальцем. Помимо этого, усиление специфичности связывания для связывающих доменов с цинковым пальцем было описано, например, в патенте США № 6,794,136.

[0112] В определенных вариантах реализации ДНК-связывающий домен является частью системы нуклеаз CRISPR/Cas, включая одиночную направляющую РНК (sgRNA), которая связывается с ДНК. См., например, патент США № 8,697,359 и публикации патентов США №№ 2015/0056705 и 2015/0159172. Локус CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), который кодирует РНК-компоненты системы, и локус cas (CRISPR-associated, связанный с CRISPR), который кодирует белки (Jansen, *et al.* (2002) *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575; Makarova, *et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:482-496; Makarova, *et al.* (2006) *Biol. Direct* 1:7; Haft, *et al.* (2005) *PLoS Comput. Biol.* 1:e60), образуют последовательности гена системы нуклеаз CRISPR/Cas. Локусы CRISPR в микробных хозяевах содержат комбинацию связанных с CRISPR (Cas) генов, а также элементов некодирующей РНК, способных программировать специфичность опосредованного CRISPR расщепления нуклеиновой кислоты.

[0113] CRISPR типа II представляет собой одну из наиболее хорошо охарактеризованных систем и осуществляет направленный двухцепочечный разрыв ДНК в ходе четырех последовательных этапов. На первом этапе две некодирующие РНК, матрица pre-crRNA и tracrRNA, транскрибируются с локуса CRISPR. На втором этапе tracrRNA гибридизуется с участками повтора pre-crRNA и опосредует процессинг pre-crRNA в зрелые crRNA, содержащие индивидуальные последовательности спейсера. На третьем этапе комплекс зрелая crRNA:tracrRNA направляет функциональный домен (например, нуклеазу, такую как Cas) к ДНК-мишени с помощью спаривания оснований по принципу Уотсона-Крика между спейсером на crRNA и протоспейсером на ДНК-мишени рядом с мотивом, прилегающим к протоспейсеру (protospacer adjacent motif, PAM), что является дополнительным требованием для распознавания мишени. Наконец, Cas9 опосредует расщепление ДНК-мишени для создания двухцепочечного разрыва в пределах

протоспейсера. Активность системы CRISPR/Cas включает три этапа: (i) вставку чужеродных последовательностей ДНК в матрицу CRISPR для предотвращения будущих атак в процессе, называемом «адаптация», (ii) экспрессию соответствующих белков, а также экспрессию и процессинг матрицы с последующей (iii) РНК-опосредованной интерференцией с чужеродной нуклеиновой кислотой. Таким образом, в бактериальной клетке несколько так называемых «Cas»-белков вовлечены в природное функционирование системы CRISPR/Cas и играют роли в функциях, таких как вставка чужеродной ДНК и т.д.

[0114] В определенных вариантах реализации Cas-белок может представлять собой «функциональное производное» встречающегося в природе Cas-белка. «Функциональное производное» нативной последовательности полипептида представляет собой соединение, обладающее качественным биологическим свойством, подобным нативной последовательности полипептида. «Функциональные производные» включают, без ограничения, фрагменты нативной последовательности и производные нативной последовательности полипептида и их фрагменты при условии, что они обладают биологической активностью, подобной активности соответствующей нативной последовательности полипептида. Биологическая активность, как предусмотрено в настоящем документе, представляет собой способность функционального производного гидролизовать субстрат ДНК на фрагменты. Термин «производное» включает варианты аминокислотной последовательности полипептида, ковалентные модификации и их слияния, такие как производные Cas-белков. Подходящие производные Cas-полипептида или его фрагмента включают, без ограничения, мутанты, слияния, ковалентные модификации Cas-белка или его фрагмента. Cas-белок, который включает Cas-белок или его фрагмент, а также производные Cas-белка или его фрагмента, можно получить из клетки или синтезировать химическим способом либо с применением комбинации двух данных процедур. Клетка может представлять собой клетку, которая продуцирует Cas-белок в природе, или клетку, которая продуцирует Cas-белок в природе и была генетически сконструированной, чтобы продуцировать эндогенный Cas-белок на более высоком уровне экспрессии или чтобы продуцировать Cas-белок с экзогенно введенной нуклеиновой кислотой, причем указанная нуклеиновая кислота кодирует Cas, который является таким же или отличным от эндогенного Cas. В некоторых случаях клетка не продуцирует Cas-белок в природе и была генетически сконструированной, чтобы продуцировать Cas-белок. В некоторых вариантах реализации Cas-белок представляет

собой малый ортолог Cas9 для доставки с помощью вектора AAV (Ran, *et al.* (2015) *Nature* 510:186).

[0115] В некоторых вариантах реализации ДНК-связывающий домен представляет собой часть системы TtAgo (см. публикации Swarts, *et al.*, *там же*; 5 Sheng, *et al.*, *там же*). У эукариот сайленсинг генов опосредуется семейством белков Argonaute (Ago). Согласно данной концепции, Ago связаны с небольшими (19 – 31 нуклеотидов) РНК. Данный комплекс сайленсинга белок-РНК распознает РНК-мишени на основе спаривания оснований по принципу Уотсона-Крика между малой РНК и мишенью и эндонуклеолитически расщепляет РНК-мишень (Vogel (2014) *Science* 10 344:972-973). Напротив, прокариотические белки Ago связываются с небольшими фрагментами одноцепочечной ДНК и, вероятно, функционируют для обнаружения и удаления чужеродной (часто вирусной) ДНК (Yuan, *et al.* (2005) *Mol. Cell* 19, 405; Olovnikov, *et al.* (2013) *Mol. Cell* 51:594; Swarts, *et al.*, *там же*). Иллюстративные прокариотические белки Ago включают таковые из *Aquifex aeolicus*, *Rhodobacter* 15 *sphaeroides* и *Thermus thermophilus*.

[0116] Одним из наиболее хорошо охарактеризованных прокариотических белков Ago является белок из *T. thermophilus* (TtAgo; Swarts, *et al.*, *там же*). TtAgo связывается с фрагментами одноцепочечной ДНК размером 15 нуклеотидов или 13 – 25 нуклеотидов с 5'-фосфатными группами. Данная «направляющая ДНК», связанная с 20 TtAgo, предназначена, чтобы направлять комплекс белок-ДНК связываться с последовательностью ДНК в третьей молекуле ДНК, комплементарной согласно принципу Уотсона-Крика. Если информация о последовательности в данных направляющих ДНК позволила провести идентификацию ДНК-мишени, комплекс TtAgo-направляющая ДНК расщепляет ДНК-мишень. Такой механизм также 25 поддерживается структурой комплекса TtAgo-направляющая ДНК при связывании с его ДНК-мишенью (G. Sheng *et al.*, *там же*). Ago из *Rhodobacter sphaeroides* (RsAgo) обладает подобными свойствами (Olovnikov, *et al.*, *там же*).

[0117] Экзогенные направляющие ДНК произвольно выбранной последовательности ДНК могут быть присоединены к белку TtAgo (Swarts, *et al.*, *там же*). 30 Поскольку специфичность расщепления TtAgo определяется направляющей ДНК, вследствие этого комплекс TtAgo-ДНК, образованный с экзогенной, определенной исследователем направляющей ДНК, будет направлять расщепление ДНК-мишени TtAgo на комплементарную определенную исследователем ДНК-мишень. Таким образом, в ДНК можно создать направленный двухцепочечный разрыв.

Применение системы TtAgo-направляющая ДНК (или ортологичных систем Ago-направляющая ДНК из других организмов) позволяет проводить направленное расщепление геномной ДНК в пределах клеток. Такое расщепление может являться одно- или двухцепочечным. Для расщепления геномной ДНК млекопитающих будет
5 предпочтительно применять версию TtAgo, кодон-оптимизированную для экспрессии в клетках млекопитающих. Также может быть предпочтительно обработать клетки комплексом TtAgo-ДНК, образованным *in vitro*, в котором белок TtAgo слит с проникающим в клетки пептидом. Также может быть предпочтительно применять версию белка TtAgo, которая была изменена с помощью мутагенеза и обладает
10 улучшенной активностью при температуре 37°C. Опосредованное Ago-РНК расщепление ДНК можно применять, чтобы повлиять на исходы, включая нокаут генов, направленное добавление генов, коррекцию генов, направленную делецию генов с применением методик, стандартных в данной области техники для использования разрывов ДНК.

[0118] Таким образом, можно применять любой ДНК-связывающий домен.

Слитые молекулы

[0119] Также предложены слитые молекулы, содержащие ДНК-связывающие
5 домены (например, ZFP или TALE, компоненты CRISPR/Cas, такие как одиночные
направляющие РНК), описанные в настоящем документе, связанные с
гетерологическим регуляторным (функциональным) доменом (или его
функциональным фрагментом). Общепринятые домены включают, например, домены
фактора транскрипции (активаторы, репрессоры, коактиваторы, корепрессоры),
10 сайленсеры, онкогены (например, члены семейств *myc*, *jun*, *fos*, *myb*, *max*, *mad*, *rel*, *ets*,
bcl, *myb*, *mos* и т.д.); ферменты репарации ДНК и их связанные факторы и
модификаторы; ферменты реаранжировки ДНК и их связанные факторы и
модификаторы; связанные с хроматином белки и их модификаторы (например, киназы,
ацетилазы и деацетилазы); и ферменты, модифицирующие ДНК (например,
15 метилтрансферазы, топоизомеразы, геликазы, лигазы, киназы, фосфатазы, полимеразы,
эндонуклеазы), и их связанные факторы и модификаторы. Такие слитые молекулы
включают факторы транскрипции, содержащие ДНК-связывающие домены, описанные
в настоящем документе, и транскрипционный регуляторный домен, а также нуклеазы,
содержащие ДНК-связывающие домены и один или более нуклеазных доменов.

20 [0120] Подходящие домены для достижения активации (транскрипционные
домены активации) включают домен активации VP16 ВПГ (вируса простого герпеса,
см., например, публикацию Hagmann, *et al.* (1997) *J. Virol.* 71:5952-5962), ядерные
рецепторы гормонов (см., например, публикацию Torchia, *et al.* (1998) *Curr. Opin. Cell.*
Biol. 10:373-383); субъединицу p65 ядерного фактора каппа В (Bitko & Barik (1998) *J.*
25 *Virol.* 72:5610-5618 и Doyle & Hunt (1997) *Neuroreport* 8:2937-2942); Liu, *et al.* (1998)
Cancer Gene Ther. 5:3-28), или искусственные химерные функциональные домены,
такие как VP64 (Beerli, *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14623-33) и дегрон
(Molinari, *et al.* (1999) *EMBO J.* 18, 6439-6447). Дополнительные иллюстративные
домены активации включают Oct 1, Oct-2A, Sp1, AP-2 и CTF1 (Seipel, *et al.* (1992)
30 *EMBO J.* 11, 4961-4968), а также p300, CBP, PCAF, SRC1 P_vALF, AtHD2A и ERF-2.
См., например, публикации Roberg, *et al.* (2000) *Mol. Endocrinol.* 14:329-347;
Collingwood, *et al.* (1999) *J. Mol. Endocrinol.* 23:255-275; Leo, *et al.* (2000) *Gene* 245:1-11;
Manteuffel-Cymborowska (1999) *Acta Biochim. Pol.* 46:77-89; McKenna, *et al.* (1999) *J.*
Steroid Biochem. Mol. Biol. 69:3-12; Malik, *et al.* (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283; и

Lemon, *et al.* (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:499-504. Дополнительные иллюстративные домены активации включают, без ограничения, OsGAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5,-6,-7 и -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP и TRAB1. См., например, публикации Ogawa, *et al.* (2000) *Gene* 245:21-29; Okanami, *et al.* (1996) *Genes Cells* 1:87-99; Goff, *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5:298-309; Cho, *et al.* (1999) *Plant Mol. Biol.* 40:419-429; Ulmason, *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5844-5849; Sprenger-Haussels, *et al.* (2000) *Plant J.* 22:1-8; Gong, *et al.* (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:33-44; и Hobo, *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15,348-15,353.

[0121] Специалистам в данной области техники понятно, что при образовании слитого белка (или кодирующей его нуклеиновой кислоты) между ДНК-связывающим доменом и функциональным доменом домен активации или молекула, которая взаимодействует с доменом активации, является подходящей в качестве функционального домена. По существу любая молекула, способная рекрутировать активирующий комплекс и/или активирующую активность (такую как, например, ацетилирование гистонов) к гену-мишени, является подходящей в качестве активирующего домена слитого белка. Домены-инсуляторы, домены локализации и ремоделирующие хроматин белки, такие как ISWI-содержащие домены и/или метил-связывающие доменные белки, подходящие для применения в качестве функциональных доменов в слитых молекулах, описаны, например, в патенте США № 7,053,264.

[0122] Иллюстративные домены репрессии включают, без ограничения, KRAB A/B, KOX, ФРО (фактор роста опухоли)-бета-индуцибельный ранний ген (TGF-beta-inducible early gene, TIEG), v-erbA, SID, MBD2, MBD3, члены семейства DNMT (например, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), Rb и MeCP2. См., например, публикации Bird, *et al.* (1999) *Cell* 99:451-454; Tyler, *et al.* (1999) *Cell* 99:443-446; Knoepfler, *et al.* (1999) *Cell* 99:447-450; и Robertson, *et al.* (2000) *Nature Genet.* 25:338-342. Дополнительные иллюстративные домены репрессии включают, без ограничения, ROM2 и AtHD2A. См., например, публикации Chem, *et al.* (1996) *Plant Cell* 8:305-321; и Wu, *et al.* (2000) *Plant J.* 22:19-27.

[0123] Слитые молекулы конструируют способами клонирования и биохимической конъюгации, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Слитые молекулы содержат ДНК-связывающий домен (например, ZFP, TALE, sgRNA), связанный с функциональным доменом (например, транскрипционным доменом активации или репрессии). Слитые молекулы также

необязательно содержат сигналы ядерной локализации (такие как, например, сигнал из среднего Т-антигена SV40) и эпитопные метки (такие как, например, FLAG и гемагглютинин). Слитые белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) разрабатывают таким образом, чтобы трансляционная рамка считывания сохранялась среди компонентов слияния.

5 **[0124]** Слияния между полипептидным компонентом функционального домена (или его функционального фрагмента) с одной стороны и небелковым ДНК-связывающим доменом (например, антибиотиком, интеркалятором, молекулой, связывающейся с малой бороздкой, нуклеиновой кислотой) с другой стороны
10 конструируют способами биохимической конъюгации, известными специалистам в данной области техники. См., например, каталог Pierce Chemical Company (Рокфорд, Иллинойс). Были описаны способы и композиции получения слияний между молекулой, связывающейся с малой бороздкой, и полипептидом. Mapp, *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3930-3935. Более того, одиночные направляющие РНК
15 системы CRISPR/Cas связываются с функциональными доменами с образованием активных транскрипционных регуляторов и нуклеазы.

[0125] В определенных вариантах реализации сайт-мишень присутствует в доступном участке клеточного хроматина. Доступные участки можно определить, как описано, например, в патентах США №№ 7,217,509 и 7,923,542. Если сайт-мишень не
20 присутствует в доступном участке клеточного хроматина, один или более доступный участок может быть получен, как описано в патентах США №№ 7,785,792 и 8,071,370. В дополнительных вариантах реализации ДНК-связывающий домен слитой молекулы способен связываться с клеточным хроматином вне зависимости от того, находится ли его сайт-мишень в доступном участке или нет. Например, такие ДНК-связывающие
25 домены способны связываться с линкерной ДНК и/или нуклеосомной ДНК. Примеры данного типа ДНК-связывающего домена-«пионера» обнаружены в некоторых стероидных рецепторах и в ядерном факторе гепатоцитов 3 (hepatocyte nuclear factor 3, HNF3) (Cordingley, *et al.* (1987) *Cell* 48:261-270; Pina, *et al.* (1990) *Cell* 60:719-731; и Cirillo, *et al.* (1998) *EMBO J.* 17:244-254).

30 **[0126]** Слитая молекула может быть приготовлена в состав с фармацевтически приемлемым носителем, как известно специалистам в данной области техники. См., например, руководство Remington's Pharmaceutical Sciences, 17-е изд., 1985; и патенты США №№ 6,453,242 и 6,534,261.

- [0127] Функциональный компонент/домен слитой молекулы может быть выбран из любого из различных компонентов, способных влиять на транскрипцию гена после того, как слитая молекула связывается с последовательностью-мишенью с помощью своего ДНК-связывающего домена. Следовательно, функциональный компонент может включать, без ограничения, различные домены факторов транскрипции, такие как активаторы, репрессоры, коактиваторы, корепрессоры и сайленсеры.
- [0128] Дополнительные иллюстративные функциональные домены раскрыты, например, в патентах США №№ 6,534,261 и 6,933,113.
- 10 [0129] Также можно выбрать функциональные домены, которые регулируются экзогенными малыми молекулами или лигандами. Например, можно применять технологию RheoSwitch[®], в которой функциональный домен принимает свою активную конформацию только в присутствии внешнего лиганда RheoChem[™] (см., например публикацию патента США № 2009/0136465). Таким образом, ZFP может
- 15 быть функционально связанным с индуцибельным функциональным доменом, в котором результирующая активность ZFP-ФТ контролируется внешним лигандом.

Нуклеазы

- [0130] В определенных вариантах реализации слитая молекула содержит ДНК-связывающий связывающий домен, связанный с доменом расщепления (доменом нуклеазы). Поэтому модификации гена можно достичь с применением нуклеазы, например, сконструированной нуклеазы. Технология сконструированных нуклеаз основана на конструировании встречающихся в природе ДНК-связывающих белков. Например, было описано конструирование хоминг-эндонуклеаз с оптимизированными
- 20 ДНК-связывающими специфичностями. Chames, *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res* 33(20):e178; Arnould, *et al.* (2006) *J. Mol. Biol.* 355:443-458. Помимо этого, также было описано конструирование ZFP. См., например, патенты США №№ 6,534,261; 6,607,882; 6,824,978; 6,979,539; 6,933,113; 7,163,824; и 7,013,219.
- [0131] Помимо этого, ZFP и/или TALE можно слить с нуклеазными доменами
- 30 для получения ZFN и TALEN – функциональной молекулы, способной распознавать предусмотренную нуклеиновую кислоту-мишень с помощью своего сконструированного (ZFP или TALE) ДНК-связывающего домена и вызывать разрезание ДНК возле сайта связывания ДНК с помощью нуклеазной активности.

[0132] Таким образом, способы и композиции, описанные в настоящем документе, широко применимы и могут включать любую нуклеазу, представляющую интерес. Неограничивающие примеры нуклеаз включают мегануклеазы, TALEN и нуклеазы с цинковым пальцем. Нуклеаза может содержать гетерологические ДНК-связывающий домен и домен расщепления (например, нуклеазы с цинковым пальцем; ДНК-связывающие домены мегануклеазы с гетерологическими доменами расщепления) или, в качестве альтернативы, ДНК-связывающий домен встречающейся в природе нуклеазы может быть изменен, чтобы он связывался с выбранным сайтом-мишенью (например, мегануклеаза, которая была сконструирована, чтобы она связывалась с сайтом, отличным от когнатного сайта связывания).

[0133] В любой из нуклеаз, описанных в настоящем документе, нуклеаза может содержать сконструированный ДНК-связывающий домен TALE и домен нуклеазы (например, домен эндонуклеазы и/или мегануклеазы), также обозначаемый TALEN. Были опубликованы способы и композиции для конструирования данных белков TALEN для устойчивого сайт-специфичного взаимодействия с последовательностью-мишенью по выбору пользователя (см. патент США № 8,586,526). В некоторых вариантах реализации TALEN содержит домен расщепления или полудомен расщепления эндонуклеазы (например, FokI). В других вариантах реализации нуклеаза TALE представляет собой mega-TAL. Данные mega-TAL-нуклеазы представляют собой слитые белки, содержащие ДНК-связывающий домен TALE и домен расщепления мегануклеазы. Домен расщепления мегануклеазы является активным в виде мономера, и ему для осуществления активности не требуется димеризация. (См. публикацию Boissel, *et al.* (2013) *Nucl Acid Res*:1-13, doi: 10.1093/nar/gkt1224). Помимо этого, домен нуклеазы может также демонстрировать ДНК-связывающую функциональность.

[0134] В еще одних вариантах реализации нуклеаза содержит компактный TALEN (сTALEN). Компактные TALEN представляют собой одноцепочечные слитые белки, связывающие ДНК-связывающий домен TALE с доменом нуклеазы T_{ev}I. Слитый белок либо может выступать в качестве никазы, локализованной участком TALE, либо может создавать двухцепочечный разрыв в зависимости от того, где расположен ДНК-связывающий домен TALE относительно домена нуклеазы T_{ev}I (см. публикацию Beurdeley, *et al.* (2013) *Nat Comm* 4:1762 DOI: 10.1038/ncomms2782). Любые TALEN можно применять в сочетании с дополнительными TALEN (например, одним или более TALEN (сTALEN или FokI-TALEN) с одной или более mega-TALE) или другими ферментами, расщепляющими ДНК.

[0135] В определенных вариантах реализации нуклеаза включает мегануклеазу (хоминг-эндонуклеазу) или ее часть, которая демонстрирует активность расщепления. Встречающиеся в природе мегануклеазы распознают сайты расщепления размером 15 – 40 пар оснований, и их обычно подразделяют на четыре семейства: семейство LAGLIDADG («LAGLIDADG», раскрытая как SEQ ID NO:122), семейство GIY-YIG, семейство His-Cyst бокс и семейство HNH. Иллюстративные хоминг-эндонуклеазы включают I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. Их последовательности распознавания известны. См. также патент США № 5,420,032; патент США № 6,833,252; Belfort, *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon, *et al.* (1989) *Gene* 82:115-118; Perler, *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble, *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast, *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 и каталог New England Biolabs.

[0136] ДНК-связывающие домены из встречающихся в природе мегануклеаз, преимущественно из семейства LAGLIDADG («LAGLIDADG», раскрытая как SEQ ID NO:122), применяли для способствования сайт-специфичной модификации генома у растений, дрожжей, дрозофилы, клеток млекопитающих и мышей, однако данный подход был ограничен модификацией гомологичных генов, которые сохраняют последовательность распознавания мегануклеазы (Monet, *et al.* (1999), *Biochem. Biophysics. Res. Common.* 255: 88-93), или заранее сконструированных геномов, в которые была введена последовательность распознавания (Route, *et al.* (1994), *Mol. Cell. Biol.* 14:8096-106; Chilton, *et al.* (2003), *Plant Physiology.* 133:956-65; Puchta, *et al.* (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5055-60; Rong, *et al.* (2002), *Genes Dev.* 16:1568-81; Gouble, *et al.* (2006), *J. Gene Med.* 8(5):616-622). Соответственно, предпринимались попытки сконструировать мегануклеазы, чтобы продемонстрировать новую специфичность связывания в значимых с медицинской или биотехнологической точки зрения сайтах (Porteus, *et al.* (2005), *Nat. Biotechnol.* 23:967-73; Sussman, *et al.* (2004), *J. Mol. Biol.* 342:31-41; Epinat, *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-62; Chevalier, *et al.* (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat, *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth, *et al.* (2006) *Nature* 441:656-659; Paques, *et al.* (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; публикации патентов США №№ 2007/0117128; 2006/0206949; 2006/0153826; 2006/0078552; и 2004/0002092). Помимо этого, встречающиеся в природе или сконструированные ДНК-связывающие домены из мегануклеаз можно функционально связать с доменом расщепления из гетерологической нуклеазы (например, FokI), и/или

домены расщепления из мегануклеаз можно функционально связать с гетерологическим ДНК-связывающим доменом (например, ZFP или TALE).

[0137] В других вариантах реализации нуклеаза представляет собой нуклеазу с цинковым пальцем (ZFN) или слияние ДНК-связывающий домен TALE-нуклеаза (TALEN). ZFN и TALEN содержат ДНК-связывающий домен (белок с цинковым пальцем или ДНК-связывающий домен TALE), который был сконструирован, чтобы он связывался с сайтом-мишенью в гене, представляющем интерес, и домен расщепления или полудомен расщепления (например, из рестрикционной нуклеазы и/или мегануклеазы, как описано в настоящем документе).

[00138] Как подробно описано выше, связывающие домены с цинковым пальцем и ДНК-связывающие домены TALE могут быть сконструированы, чтобы связываться с последовательностью, представляющей интерес. См., например, публикации Beerli, *et al.* (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo, *et al.* (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan, *et al.* (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal, *et al.* (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo, *et al.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416. Сконструированный связывающий домен с цинковым пальцем или белок TALE может обладать новой специфичностью связывания по сравнению с встречающимся в природе белком. Способы конструирования включают, без ограничения, рациональный дизайн и различные типы отбора. Рациональный дизайн включает, например, применение баз данных, содержащих триплетные (или квадруплетные) нуклеотидные последовательности и индивидуальные аминокислотные последовательности цинковых пальцев или TALE, в которых нуклеотидная последовательность каждого триплета или квадруплета связана с одной или более аминокислотных последовательностей цинковых пальцев или единиц повтора TALE, которые связываются с конкретной последовательностью триплета или квадруплета. См., например, патенты США №№ 6,453,242 и 6,534,261, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В определенных вариантах реализации ДНК-связывающие домены содержат ZFP, полученные из (например, компонент ZFP) ZFN, обозначенных 68957, 72678, 72732, 72748 (B2M) или 68846 (TKP).

[0139] Отбор сайтов-мишеней и способы разработки дизайна и конструирования слитых белков (и кодирующих их полинуклеотидов) известны специалистам в данной области техники и подробно описаны в патентах США №№ 7,888,121 и 8,409,861, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки.

5 **[0140]** Помимо этого, как раскрыто в данном и других источниках, домены с цинковым пальцем, TALE и/или белки с цинковым пальцем, содержащие множество пальцев, могут быть соединены с применением любых подходящих линкерных последовательностей, включая, например, линкеры из 5 или более аминокислот в длину. См. также патенты США №№ 6,479,626; 6,903,185; и 7,153,949 применительно к
10 иллюстративным линкерным последовательностям из 6 или более аминокислот в длину. Белки, описанные в настоящем документе, могут содержать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка. См. также патент США № 8,772,453.

[0141] Таким образом, нуклеазы, такие как ZFN, TALEN и/или мегануклеазы,
15 могут содержать любой ДНК-связывающий домен и любой домен нуклеазы (расщепления) (домен расщепления, полудомен расщепления). Как отмечено выше, домен расщепления может быть гетерологическим по отношению к ДНК-связывающему домену, например, цинковый палец или ДНК-связывающий домен TAL-эффектора и домен расщепления из нуклеазы или мегануклеазы, ДНК-
20 связывающий домен и домен расщепления из отличной нуклеазы. Гетерологические домены расщепления можно получить из любой эндонуклеазы или экзонуклеазы. Иллюстративные эндонуклеазы, из которых можно получить домен расщепления, включают, без ограничения, рестрикционные эндонуклеазы и хоминг-эндонуклеазы. См., например, каталог 2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Беверли,
25 Массачусетс; и публикацию Belfort, *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388. Известны дополнительные ферменты, которые расщепляют ДНК (например, нуклеаза S1; нуклеаза золотистой фасоли; ДНКазы I поджелудочной железы; микрококковая нуклеаза; эндонуклеаза HO дрожжей; см. также публикацию Linn, *et al.* (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). В качестве источника доменов
30 расщепления и полудоменов расщепления можно применять один или более из данных ферментов (или их функциональных фрагментов).

[0142] Аналогично, полудомен расщепления может быть получен из любой нуклеазы или ее части, как изложено выше, для которой требуется димеризация для осуществления активности расщепления. Если слитые белки содержат полудомены

расщепления, для расщепления, как правило, необходимы два слитых белка. В качестве альтернативы, можно применять один белок, содержащий два полудомена расщепления. Два полудомена расщепления могут быть получены из одной и той же эндонуклеазы (или ее функциональных фрагментов), или каждый полудомен расщепления может быть получен из различных эндонуклеаз (или их функциональных фрагментов). Помимо этого, сайты-мишени для двух слитых белков предпочтительно так расположены относительно друг друга, чтобы связывание двух слитых белков с их соответствующими сайтами-мишенями располагало полудомены расщепления в пространственной ориентации относительно друг друга, которая позволяет полудоменам расщепления образовывать функциональный домен расщепления, например, в результате димеризации. Таким образом, в определенных вариантах реализации соседние концы сайтов-мишеней отделены 5 – 8 нуклеотидами или 15 – 18 нуклеотидами. Однако между двумя сайтами-мишенями может быть расположено любое целое число нуклеотидов или пар нуклеотидов (например, от 2 до 50 пар нуклеотидов или более). Как правило, сайт расщепления находится между сайтами-мишенями, однако может находиться на 1 или более тысяч пар оснований от сайта расщепления, включая 1 – 50 пар оснований (или любое значение между ними, включая 1 – 5, 1 – 10 и 1 – 20 пар оснований), 1 – 100 пар оснований (или любое значение между ними), 100 – 500 пар оснований (или любое значение между ними), от 500 до 1000 пар оснований (или любое значение между ними) или еще более чем 1 т.п.о. от сайта расщепления.

[0143] Рестрикционные эндонуклеазы (рестрикционные ферменты) присутствуют у многих видов и способны к последовательность-специфичному связыванию с ДНК (в сайте распознавания) и расщеплению ДНК в сайте связывания или поблизости от него. Определенные рестрикционные ферменты (например, типа IIS) расщепляют ДНК в сайтах, удаленных от сайта распознавания, и содержат отделяемые домен связывания и домен расщепления. Например, фермент типа IIS FokI катализирует двухцепочечное расщепление ДНК на расстоянии 9 нуклеотидов от своего сайта распознавания на одной цепи и 13 нуклеотидов от своего сайта распознавания на другой. См., например, патенты США №№ 5,356,802; 5,436,150 и 5,487,994; а также публикации Li, *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li, *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim, *et al.* (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim, *et al.* (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31,978-31,982. Таким образом, в одном варианте реализации слитые белки содержат домен расщепления

(или полудомен расщепления) из по меньшей мере одного рестрикционного фермента типа IIS и один или более связывающих доменов с цинковым пальцем, которые могут быть или могут не быть сконструированными.

[0144] Иллюстративный рестрикционный фермент типа IIS, домен расщепления которого является отделяемым от связывающего домена, представляет собой FokI. Данный конкретный фермент является активным в виде димера. Bitinaite, *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10,570-10,575. Последовательность полноразмерного FokI представлена ниже. Домен расщепления, использованный в нуклеазах, описанных в настоящем документе, показан курсивом с подчеркиванием (положения с 384 по 579 полноразмерного белка), тогда как целая последовательность белка описана ниже (SEQ ID NO:138):

MVSKIRTFGWVQNPGKFENLKRVVQVFDNRNSKVHNEVKNIKIPTLVKESKIQKELVA
IMNQHDLIYTYKELVGTGTSIRSEAPCDAPQATIADQGNKKGYIDNWSSDGFLRWA
HALGFIEYINKSDSFVITDVGLAYSADGSAIEKEILIEAISSYPPAIRILTLLEDGQHL
TKFDLGKNLGFSGESGFTSLPEGILLDTLANAMPKDKGEIRNNWEGSSDKYARMIGG
WLDKLGLVKQGKKEFIPTLGKPDNKEFISHAFKITGEGLKVLRRAKGSTKFTRVPCR
VYWEMLATNLTKEYVRTRRALILEILIKAGSLKIEQIQDNLKKLGFDEVIETIENDIK
GLINTGIFIEIKGRFYQLKDHILQFVIPNRGVTK~~OLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIE~~
~~LIEIARNSTODRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAY~~
SGGYNLPIGOADEMORYVEENOTRNKHINPNEWVKVYPSSVTEFKFLVSGHFKGNYKA
~~OLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRKFNNGEINF~~ (SEQ ID NO:138)

Соответственно, для целей настоящего изобретения часть фермента FokI, использованную в раскрытых слитых белках, считают полудоменом расщепления. Таким образом, для направленного двухцепочечного расщепления и/или направленной замены клеточных последовательностей с применением слияний цинковый палец-FokI можно применять два слитых белка, каждый из которых содержит полудомен расщепления FokI, для восстановления каталитически активного домена расщепления. В качестве альтернативы, можно также применять единичную молекулу полипептида, содержащую связывающий домен с цинковым пальцем и два полудомена расщепления FokI. Параметры направленного расщепления и направленного изменения последовательности с применением слияний цинковый палец-FokI предложены в другом месте в настоящем изобретении.

[0145] Домен расщепления или полудомен расщепления могут представлять собой любую часть белка, которая сохраняет активность расщепления или которая сохраняет способность мультимеризоваться (например, димеризоваться) с образованием функционального домена расщепления.

5 **[0146]** Иллюстративные рестрикционные ферменты типа PS описаны в международной публикации патента № WO 07/014275, полностью включенной в настоящий документ. Дополнительные рестрикционные ферменты также содержат отделяемые домен связывания и домен расщепления, и такие ферменты предусмотрены настоящим изобретением. См., например, публикацию Roberts, *et al.*
10 (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:418-420.

[0147] В определенных вариантах реализации домен расщепления содержит один или более сконструированных полудоменов расщепления (также обозначаемых мутанты доменов по димеризации), которые минимизируют или предотвращают гомодимеризацию, как описано, например, в патентах США №№ 7,914,796; 8,034,598;
15 и 8,623,618; и публикации патента США № 2011/0201055, полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Также могут быть включены мутации «Sharkey» (например, 418 и 441, пронумерованы относительно полноразмерной последовательности) и дополнительные мутации, например, в остатке 416 (например, R416S) и/или остатке 525 (например, K525S), как описано в
20 публикации патента США № 2018/0087072. Таким образом, домены расщепления FokI, применяемые в нуклеазах согласно настоящему изобретению, могут быть мутированными в одном или более из следующих положений остатков аминокислот (пронумерованы относительно полноразмерной последовательности): 416, 418, 441, 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 525, 531, 534, 537 и/или
25 538.

[0148] Иллюстративные сконструированные полудомены расщепления FokI, которые образуют обязательные гетеродимеры, включают пару, в которой первый полудомен расщепления содержит мутации в остатках аминокислот в положениях 490 и 538 FokI, а второй полудомен расщепления содержит мутации в остатках
30 аминокислот в положениях 486 и 499.

[0149] Таким образом, в одном варианте реализации мутация в положении 490 заменяет Glu (E) на Lys (K); мутация в положении 538 заменяет Iso (I) на Lys (K); мутация в положении 486 заменяет Gln (Q) на Glu (E); и мутация в положении 499 заменяет Iso (I) на Lys (K). Более конкретно, сконструированные полудомены

расщепления, описанные в настоящем документе, были получены в результате мутации положений 490 (E→K) и 538 (I→K) в одном полудомене расщепления с получением сконструированного полудомена расщепления, обозначаемого «E490K:I538K», и в результате мутации положений 486 (Q→E) и 499 (I→L) в другом полудомене расщепления с получением сконструированного полудомена расщепления, обозначаемого «Q486E:I499L». Сконструированные полудомены расщепления, описанные в настоящем документе, представляют собой обязательные гетеродимерные мутанты, в которых неправильное расщепление минимизировано или устранено. См., например, патенты США №№ 7,914,796 и 8,034,598, описание которых полностью включено посредством ссылки для всех целей. В определенных вариантах реализации сконструированный полудомен расщепления содержит мутации в положениях 486, 499 и 496 (пронумерованы относительно FokI дикого типа), например, мутации, которые заменяют остаток дикого типа Gln (Q) в положении 486 остатком Glu (E), остаток дикого типа Iso (I) в положении 499 остатком Leu (L) и остаток дикого типа Asn (N) в положении 496 остатком Asp (D) или Glu (E) (также обозначаются домены «ELD» и «ELE», соответственно). В других вариантах реализации сконструированный полудомен расщепления содержит мутации в положениях 490, 538 и 537 (пронумерованы относительно FokI дикого типа), например, мутации, которые заменяют остаток дикого типа Glu (E) в положении 490 остатком Lys (K), остаток дикого типа Iso (I) в положении 538 остатком Lys (K) и остаток дикого типа His (H) в положении 537 остатком Lys (K) или остатком Arg (R) (также обозначаются домены «KKK» и «KKR», соответственно). В других вариантах реализации сконструированный полудомен расщепления содержит мутации в положениях 490 и 537 (пронумерованы относительно FokI дикого типа), например, мутации, которые заменяют остаток дикого типа Glu (E) в положении 490 остатком Lys (K) и остаток дикого типа His (H) в положении 537 остатком Lys (K) или остатком Arg (R) (также обозначаются домены «KIK» и «KIR», соответственно).

[0150] В других вариантах реализации сконструированный полудомен расщепления содержит мутации в положениях 487, 499 и 496 (пронумерованы относительно FokI дикого типа), например, мутации, которые заменяют остаток дикого типа Arg (R) в положении 487 остатком Asp (D) и остаток дикого типа Ile (I) в положении 499 остатком Ala (A), и остаток дикого типа Asn (N) в положении 496 остатком Asp (D) (также обозначаются «DAD»), и/или мутации в положениях 483, 538 и 537 (пронумерованы относительно FokI дикого типа), например, мутации, которые

заменяют остаток дикого типа Asp (D) в положении 483 остатком Arg (R) и остаток дикого типа Ile (I) в положении 538 остатком Val (V), и остаток дикого типа His (H) в положении 537 остатком Arg (R) (также обозначаются «RVR»). См., например, патенты США №№ 8,962,281; 7,914,796; 8,034,598; и 8,623,618, описание которых
5 полностью включено посредством ссылки для всех целей. В других вариантах реализации сконструированный полудомен расщепления содержит «Sharkey» и/или мутации «Sharkey» (см. Guo, *et al.* (2010) *J. Mol. Biol.* 400(1):96-107).

[0151] Таким образом, неограничивающие примеры доменов FokI, которые можно применять в нуклеазах, описанных в настоящем документе, включают: мутанты
10 Fok, представленные в таблице 8 (например, ELD, KKR и т.д.), FokI-Sharkey (S418P+K441E), FokI ELD (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496), FokI ELD, Sharkey (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E), FokI ELD, R416E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, R416E), FokI ELD, Sharkey, R416E (Q->E в
15 положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, R416E), FokI ELD, R416Y (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, R416Y), FokI ELD, Sharkey, R416E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, R416E), FokI ELD, S418E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418E), FokI ELD, частично
20 Sharkey, S418E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, K441E, S418E), FokI ELD, K525S (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, K525S), FokI ELD, Sharkey K525S (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, K525S), FokI ELD, I479T (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, I479T), FokI ELD,
25 Sharkey, I479T (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, I479T), FokI ELD, P478D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, P478D), FokI ELD, Sharkey, P478D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, P478D), FokI ELD, Q481D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, Q481D), FokI
30 ELD, Sharkey, Q481D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, Q481D), FokI KKR (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537), FokI KKR Sharkey, (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E), FokI KKR, Q481E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, Q481E), FokI KKR,

Sharkey Q481E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, Q481E), FokI KKR, R416E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, R416E), FokI KKR, Sharkey, R416E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, R416E), FokI KKR, K525S (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, K525S), FokI KKR, Sharkey, K525S (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, K525S), FokI KKR, R416Y (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, R416Y), FokI KKR, Sharkey, R416Y (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, R416Y), FokI, KKR I479T (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, I479T), FokI, KKR Sharkey I479T (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, I479T, FokI, KKR P478D(E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, P478D), FokI, KKR Sharkey P478D (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, P478D), FokI DAD (R->D в положении 487, N->D в положении 496, I->A в положении 499), FokI DAD Sharkey (R->D в положении 487, N->D в положении 496, I->A в положении 499, S418P+K441E), FokI RVR (D->R в положении 483, H->R в положении 537, I->V в положении 538), FokI RVR Sharkey (D->R в положении 483, H->R в положении 537, I->V в положении 538, S418P+K441E).

[0152] ZFN, описанные в настоящем документе, могут также содержать любую линкерную последовательность, включая, без ограничения, последовательности, раскрытые в настоящем документе (L0, N7a, N7c и т.д.), и/или последовательности, раскрытые в патенте США № 7,888,121; 7,914,796; 8,034,598; 8,623,618; 9,567,609; и публикации США № 20170218349, которые можно применять между N- или C-концом ДНК-связывающего домена и N- или C-концом домена расщепления FokI.

[0153] ZFP из ZFN, описанные в настоящем документе (включая сконструированные домены расщепления и/или домены расщепления дикого типа), могут также содержать модификации для увеличения специфичности ZFN, включая пару нуклеаз, в отношении ее предусмотренной мишени по сравнению с другими непредусмотренными сайтами расщепления, известными как нецелевые сайты (см. публикацию патента США № 20180087072). Таким образом, нуклеазы, описанные в настоящем документе, могут содержать специфичные линкеры между ДНК-связывающим доменом и доменом расщепления; и/или могут содержать мутации в одном или более участках остова своего ДНК-связывающего домена и/или одну или

более мутаций в своих доменах расщепления нуклеазы, как описано выше. ZFP из данных нуклеаз могут содержать мутации в аминокислотах в пределах ДНК-связывающего домена ZFP («остова ZFP»), которые могут неспецифично взаимодействовать с фосфатами на остове ДНК, но они не содержат изменения в
5 спиралях распознавания ДНК. Таким образом, настоящее изобретение включает ZFP, содержащие мутации катионных остатков аминокислот в остове ZFP, которые не являются необходимыми для целевой специфичности в отношении нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации данные мутации в остове ZFP включают мутирование катионного остатка аминокислоты на нейтральный или анионный остаток
10 аминокислоты. В некоторых вариантах реализации данные мутации в остове ZFP включают мутирование полярного остатка аминокислоты на нейтральный или неполярный остаток аминокислоты. В предпочтительных вариантах реализации мутации осуществляют в положении (-5), (-9) и/или положении (-14) относительно спирали связывания ДНК. В некоторых вариантах реализации цинковый палец может
15 содержать одну или более мутаций в положении (-5), (-9) и/или (-14). В следующих вариантах реализации один или более цинковых пальцев в белке с цинковым пальцем, содержащем несколько пальцев, может содержать мутации в положении (-5), (-9) и/или (-14). В некоторых вариантах реализации аминокислоты в положении (-5), (-9) и/или (-14) (например, аргинин (R) или лизин (K)) были мутированы на аланин (A), лейцин (L),
20 Ser (S), Asp (N), Glu (E), Tyr (Y) и/или глутамин (Q).

[0154] В определенных вариантах реализации ZFN содержат по меньшей мере одну из следующих пар: 68796 и 68813; 68796 и 68861; 68812 и 68813; 68876 и 68877; 68815 и 55266; 68879 и 55266; 68798 и 68815; или 68846 и 53853, как представлено в таблице 6. В других вариантах реализации ZFN содержат по меньшей мере одну из
25 следующих пар: 57531 и 72732; 57531 и 72748; 68957 и 57071; 68957 и 72732; 68957 и 72748; 72678 и 57071; 72678 и 72732; или 72678 и 72748, как представлено в таблице 8.

[0155] В качестве альтернативы, нуклеазы могут быть собраны *in vivo* на нуклеиновой кислоте сайта-мишени с применением так называемой технологии «сплит-фермент» («split-enzyme», см., например, публикацию патента США №
30 2009/0068164). Компоненты таких сплит-ферментов можно экспрессировать на отдельных конструкциях экспрессии или можно связать в одной открытой рамке считывания, в которой индивидуальные компоненты разделены, например, саморасщепляемым пептидом 2A или последовательностью IRES (internal ribosome entry sequence, участок внутренней посадки рибосомы). Компоненты могут

представлять собой индивидуальные связывающие домены с цинковым пальцем или домены связывающих нуклеиновую кислоту доменов мегануклеазы.

[0156] Перед применением можно провести скрининг нуклеаз (например, ZFN и/или TALEN) в отношении активности, например, в хромосомной системе на основе дрожжей, как описано в патенте США № 8,563,314.

[0157] В определенных вариантах реализации нуклеаза содержит систему CRISPR/Cas. Локус CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), который кодирует РНК-компоненты системы, и локус cas (CRISPR-associated, связанный с CRISPR), который кодирует белки (Jansen, *et al.* (2002) *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575; Makarova, *et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:482-496; Makarova, *et al.* (2006) *Biol. Direct* 1:7; Haft, *et al.* (2005) *PLoS Comput. Biol.* 1:e60), образуют последовательности гена системы нуклеаз CRISPR/Cas. Локусы CRISPR в микробных хозяевах содержат комбинацию связанных с CRISPR (Cas) генов, а также элементов некодирующей РНК, способных программировать специфичность расщепления нуклеиновой кислоты, опосредованного CRISPR.

[0158] CRISPR типа II представляет собой одну из наиболее хорошо охарактеризованных систем и осуществляет направленный двухцепочечный разрыв ДНК в ходе четырех последовательных этапов. На первом этапе две некодирующие РНК, матрица pre-crRNA и tracrRNA, транскрибируются с локуса CRISPR. На втором этапе tracrRNA гибридизируется с участками повтора pre-crRNA и опосредует процессинг pre-crRNA в зрелые crRNA, содержащие индивидуальные последовательности спейсера. На третьем этапе комплекс зрелая crRNA:tracrRNA направляет Cas9 к ДНК-мишени с помощью спаривания оснований по принципу Уотсона-Крика между спейсером на crRNA и протоспейсером на ДНК-мишени рядом с мотивом, прилегающим к протоспейсеру (protospacer adjacent motif, PAM), что является дополнительным требованием для распознавания мишени. Наконец, Cas9 опосредует расщепление ДНК-мишени для создания двухцепочечного разрыва в пределах протоспейсера. Активность системы CRISPR/Cas включает три этапа: (i) вставку чужеродных последовательностей ДНК в матрицу CRISPR для предотвращения будущих атак в процессе, называемом «адаптация», (ii) экспрессию соответствующих белков, а также экспрессию и процессинг матрицы с последующей (iii) РНК-опосредованной интерференцией с чужеродной нуклеиновой кислотой. Таким образом, в бактериальной клетке несколько так называемых «Cas»-белков

вовлечены в природное функционирование системы CRISPR/Cas и играют роли в функциях, таких как вставка чужеродной ДНК и т.д.

[0159] В определенных вариантах реализации Cas-белок может представлять собой «функциональное производное» встречающегося в природе Cas-белка.

5 «Функциональное производное» нативной последовательности полипептида представляет собой соединение, обладающее качественным биологическим свойством, подобным нативной последовательности полипептида. «Функциональные производные» включают, без ограничения, фрагменты нативной последовательности и производные нативной последовательности полипептида и их фрагменты при условии,

10 что они обладают биологической активностью, подобной активности соответствующей нативной последовательности полипептида. Биологическая активность, как предусмотрено в настоящем документе, представляет собой способность функционального производного гидролизовать субстрат ДНК на фрагменты. Термин «производное» включает варианты аминокислотной последовательности полипептида,

15 ковалентные модификации и их слияния. Подходящие производные Cas-полипептида или его фрагмента включают, без ограничения, мутанты, слияния, ковалентные модификации Cas-белка или его фрагмента. Cas-белок, который включает Cas-белок или его фрагмент, а также производные Cas-белка или его фрагмента, можно получить из клетки или синтезировать химическим способом либо с применением комбинации

20 двух данных процедур. Клетка может представлять собой клетку, которая продуцирует Cas-белок в природе, или клетку, которая продуцирует Cas-белок в природе и была генетически сконструированной, чтобы продуцировать эндогенный Cas-белок на более высоком уровне экспрессии или чтобы продуцировать Cas-белок с введенной экзогенно нуклеиновой кислоты, причем указанная нуклеиновая кислота кодирует Cas,

25 который является таким же или отличным от эндогенного Cas. В некоторых случаях клетка не продуцирует Cas-белок в природе и была генетически сконструированной, чтобы продуцировать Cas-белок.

[0160] Иллюстративные системы нуклеаз CRISPR/Cas, направленные на гены ТКР и другие гены, раскрыты, например, в публикации патента США № 2015/0056705.

30 Нуклеаза (нуклеазы) могут осуществлять один или более двухцепочечных и/или одноцепочечных разрезов в сайте-мишени. В определенных вариантах реализации нуклеаза содержит каталитически неактивный домен расщепления (например, FokI и/или Cas-белок). См., например, патенты США №№ 9,200,266 и 8,703,489 и публикацию Guillinger, *et al.* (2014) *Nature Biotech.* 32(6):577-582. Каталитически

неактивный домен расщепления может в сочетании с каталитически активным доменом выступать в качестве нуклеазы, чтобы образовать одноцепочечный разрез. Вследствие этого можно применять две нуклеазы в комбинации, чтобы образовать двухцепочечный разрез в конкретном участке. Дополнительные нуклеазы также известны в данной области техники, например, McCaffrey, *et al.* (2016) *Nucleic Acids Res.* 44(2):e11. doi: 10.1093/nar/gkv878. Epub 2015 Oct 19. Помимо этого, «мертвый» Cas (dead Cas, dCas) или Cas-нуклеазу можно слить с модифицирующим основанием ферментом (например, цитидиндезаминазой) для получения системы редактирования оснований (Komor, *et al.* (2016) *Nature* 533:420). Данные системы позволяют проводить изменение основания ДНК (модификацию) с помощью комплекса редактирования оснований без образования двухцепочечного разрыва в ДНК. Таким образом, в некоторых вариантах реализации направляющие РНК (таблица 2) можно применять для введения мутации в ген ТРАК, чтобы вызвать нокаут.

15 Доставка

[0161] Белки (например, факторы транскрипции, нуклеазы, молекулы ТКР и CAR), полинуклеотиды и/или композиции, содержащие белки и/или полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, можно доставлять в клетку-мишень любыми подходящими способами, включая, например, с помощью инъекции белка и/или компонентов мРНК. В некоторых вариантах реализации белки вводят в клетку с помощью сжатия клеток (см. публикацию Kollmannsperger, *et al.* (2016) *Nat Comm* 7, 10372 doi:10.1038/ncomms10372).

[0162] Подходящие клетки включают, без ограничения, эукариотические и прокариотические клетки и/или линии клеток. Неограничивающие примеры таких клеток или линий клеток, полученных из таких клеток, включают Т-клетки, COS, CHO (например, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (например, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T) и клетки perC6, а также клетки насекомых, таких как *Spodoptera fugiperda* (Sf), или клетки грибов, таких как *Saccharomyces*, *Pichia* и *Schizosaccharomyces*. В определенных вариантах реализации линия клеток представляет собой линию клеток CHO-K1, MDCK или HEK293. Подходящие клетки также включают стволовые клетки, такие как, в качестве примера, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые

клетки (клетки иПСК), гемопоэтические стволовые клетки, нейрональные стволовые клетки и мезенхимальные стволовые клетки.

[0163] Способы доставки белков, содержащих ДНК-связывающие домены, описанные в настоящем документе, описаны, например, в патентах США №№ 6,453,242; 6,503,717; 6,534,261; 6,599,692; 6,607,882; 6,689,558; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; и 7,163,824, полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0164] ДНК-связывающие домены и слитые белки, содержащие данные ДНК-связывающие домены, описанные в настоящем документе, можно также доставлять с применением векторов, содержащих последовательности, кодирующие один или более ДНК-связывающих белков. Дополнительно, с помощью данных векторов также можно доставлять дополнительные нуклеиновые кислоты (например, донорные). Можно применять любые системы векторов, включая, без ограничения, плазмидные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы, герпесвирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированного вируса и т.д. См. также патенты США №№ 6,534,261; 6,607,882; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; и 7,163,824, полностью включенные в настоящий документ посредством ссылки. Более того, понятно, что любой из данных векторов может содержать одну или более последовательностей, кодирующих ДНК-связывающий белок, и/или дополнительных нуклеиновых кислот, в случае необходимости. Таким образом, когда в клетку вводят один или более ДНК-связывающих белков, описанных в настоящем документе, и, в случае необходимости, дополнительные ДНК, они могут находиться на одном и том же векторе или на различных векторах. Когда применяют несколько векторов, каждый вектор может содержать последовательность, кодирующую один или несколько ДНК-связывающих белков и дополнительные нуклеиновые кислоты, по желанию.

[0165] Для введения нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные ДНК-связывающие белки, в клетки (например, клетки млекопитающего) и ткани-мишени и для совместного введения дополнительных нуклеотидных последовательностей по желанию можно применять общепринятые вирусные и невирусные способы переноса генов. Такие способы можно также применять для введения нуклеиновых кислот (например, кодирующих ДНК-связывающие белки и/или доноры) в клетки *in vitro*. В определенных вариантах реализации нуклеиновые кислоты вводят для вариантов применения при генотерапии *in vivo* или *ex vivo*. Системы

доставки на основе невирусных векторов включают плазмиды ДНК, «оголенную» нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома, липидная наночастица или поллоксамер. Системы доставки на основе вирусных векторов включают ДНК- и РНК-вирусы, которые содержат эписомные или интегрированные геномы после доставки в клетку. Обзор процедур генотерапии см. в публикациях Anderson (1992) *Science* 256:808-813; Nabel & Felgner (1993) *TIBTECH* 11:211-217; Mitani & Caskey (1993) *TIBTECH* 11:162-166; Dillon (1993) *TIBTECH* 11:167-175; Miller (1992) *Nature* 357:455-460; Van Brunt (1988) *Biotechnology* 6(10):1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36; Kremer & Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51(1):31-44; Haddada, *et al.* (1995) *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler and Böhm (eds.); и Yu, *et al.* (1994) *Gene Therapy* 1:13-26.

[0166] Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, липидные наночастицы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион или липид:нуклеиновая кислота, «оголенную» ДНК, мРНК, искусственные вирионы и усиленный агентом захват ДНК. Для доставки нуклеиновых кислот можно также использовать сонопорацию с применением, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar). В предпочтительном варианте реализации одну или более нуклеиновых кислот доставляют в виде мРНК. Также предпочтительным является применение кэпированных мРНК для увеличения трансляционной эффективности и/или стабильности мРНК. В особенности предпочтительными являются кэпы ARCA (anti-reverse cap analog, антиобратный аналог кэпа) или их варианты. См. патенты США №№ 7,074,596 и 8,153,773, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0167] Дополнительные иллюстративные системы для доставки нуклеиновой кислоты включают таковые, предложенные компанией Amaha Biosystems (Кельн, Германия), Maxcyte, Inc. (Роквилл, Мэриленд), BTX Molecular Delivery Systems (Холлистон, Массачусетс) и Copernicus Therapeutics Inc, (см., например, патент США № 6,008,336). Липофекция описана, например, в патентах США №№ 5,049,386; 4,946,787; и 4,897,355), и реактивы для липофекции коммерчески доступны (например, Transfectam™, Lipofectin™ и Lipofectamine™ RNAiMAX). Катионные и нейтральные липиды, подходящие для эффективной рецептор-распознающей липофекции полинуклеотидов, включают таковые согласно Felgner, международные публикации

патентов №№ WO 91/17424 и WO 91/16024. Доставку можно осуществлять в клетки (введение *ex vivo*) или ткани-мишени (введение *in vivo*).

[0168] Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, включая нацеленные липосомы, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо известно специалисту в данной области техники (см., например, публикации Crystal (1995) *Science* 270:404-410; Blaese, *et al.* (1995) *Cancer Gene Ther.* 2:291-297; Behr, *et al.* (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:382-389; Remy, *et al.* (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:647-654; Gao, *et al.* (1995) *Gene Therapy* 2:710-722; Ahmad, *et al.* (1992) *Cancer Res.* 52:4817-4820; патенты США №№ 4,186,183; 4,217,344; 4,235,871; 4,261,975; 4,485,054; 4,501,728; 4,774,085; 4,837,028; и 4,946,787).

[0169] Дополнительные способы доставки включают применение упаковки нуклеиновых кислот, подлежащих доставке, в носители для доставки EnGeneIC (EnGeneIC delivery vehicles, EDV). Данные EDV специфично доставляют в ткани-мишени с применением биспецифичных антител, в которых одно плечо антитела характеризуется специфичностью в отношении ткани-мишени, а другое характеризуется специфичностью в отношении EDV. Антитело доставляет EDV к поверхности клетки-мишени, а затем EDV втягивается в клетку в процессе эндоцитоза. Попад в клетку, содержимое высвобождается (см. публикацию MacDiarmid, *et al.* (2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643).

[0170] Применение систем на основе РНК- или ДНК-вирусов для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные ДНК-связывающие белки, и/или доноров (например, CAR или ACTR) по желанию характеризуется преимуществом, состоящем в использовании в высокой степени эволюционировавших процессов для нацеливания вируса на конкретные клетки в организме и перемещении вируса с грузом в ядро. Вирусные векторы можно вводить пациентам напрямую (*in vivo*), или их можно применять для обработки клеток *in vitro* и введения модифицированных клеток пациентам (*ex vivo*). Общепринятые вирусные системы для доставки нуклеиновых кислот включают, без ограничения, ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, аденоассоциированные векторы, векторы на основе осповакцины и вируса простого герпеса для переноса генов. Интеграция в геном хозяина возможна при применении способов переноса генов на основе ретровируса, лентивируса и аденоассоциированного вируса, что часто приводит к длительной экспрессии встроенного трансгена. Дополнительно высокие эффективности трансдукции наблюдались во многих различных типах клеток и тканей-мишеней.

- [0171] Тропизм ретровируса можно изменить путем встраивания чужеродных белков оболочки, расширяя потенциальные целевые популяции клеток-мишеней. Лентивирусные векторы представляют собой ретровирусные векторы, способные трансдуцировать или инфицировать неделящиеся клетки и, как правило, образующие высокие титры вируса. Выбор системы ретровирусного переноса генов зависит от ткани-мишени. Ретровирусные векторы состоят из действующих в цис-положении длинных концевых повторов с упаковывающей способностью вплоть до 6 – 10 т.п.о. чужеродной последовательности. Минимальные действующие в цис-положении LTR (long terminal repeats, длинные концевые повторы) являются достаточными для репликации и упаковывания векторов, которые затем используют для интеграции терапевтического гена в клетку-мишень с целью обеспечения постоянной экспрессии трансгена. Широко применяемые ретровирусные векторы включают таковые на основе вируса лейкоза мышей (murine leukemia virus, MuLV), вируса лейкоза гиббонов (gibbon ape leukemia virus, GaLV), вируса иммунодефицита обезьян (Simian Immunodeficiency virus, SIV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и их комбинаций (см., например, публикации Buchscher, *et al.* (1992) *J. Virol.* 66:2731-2739; Johann, *et al.* (1992) *J. Virol.* 66:1635-1640; Sommerfelt, *et al.* (1990) *Virol.* 176:58-59; Wilson, *et al.* (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller, *et al.* (1991) *J. Virol.* 65:2220-2224; международную публикацию патента № WO 1994/026877).
- [0172] В вариантах применения, в которых предпочтительна временная экспрессия, можно применять системы на основе аденовирусов. Векторы на основе аденовирусов способны к очень высокой эффективности трансдукции во множестве типов клеток, и им не требуется деление клетки. С применением таких векторов были получены высокий титр и высокие уровни экспрессии. Данный вектор можно получить в больших количествах в относительно простой системе. Векторы на основе аденоассоциированного вируса («AAV») также применяют для трансдукции клеток нуклеиновыми кислотами-мишенями, например, при продукции нуклеиновых кислот и пептидов *in vitro* и для процедур генотерапии *in vivo* и *ex vivo* (см., например, публикацию West, *et al.* (1987) *Virology* 160:38-47; патент США № 4,797,368; международную публикацию патента № WO 93/24641; Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351). Конструирование рекомбинантных AAV векторов описано во множестве публикаций, включая патент США № 5,173,414; Tratschin, *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260; Tratschin, *et al.*

(1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Hermonat & Muzyczka (1984) *PNAS USA* 81:6466-6470; и Samulski *et al.* (1989) *J. Virol.* 63:03822-3828.

[0173] На сегодняшний день доступны по меньшей мере шесть подходов на основе вирусных векторов для переноса генов в клинических исследованиях, в которых применяют подходы, включающие комплементацию дефективных векторов генами, встроенными в хелперные линии клеток, для получения трансдуцирующего агента.

[0174] рLASN и MFG-S являются примерами ретровирусных векторов, которые применяли в клинических исследованиях (Dunbar, *et al.* (1995) *Blood* 85:3048-305; Kohn, *et al.* (1995) *Nat. Med.* 1:1017-102; Malech, *et al.* (1997) *PNAS USA* 94:22 12133-12138). PA317/pLASN являлся первым терапевтическим вектором, применявшимся в исследовании генотерапии. (Blaese, *et al.* (1995) *Science* 270:475-480). Для пакующих векторов MFG-S наблюдались эффективности трансдукции 50% или более. (Ellem, *et al.* (1997) *Immunol Immunother.* 44(1):10-20; Dranoff, *et al.* (1997) *Hum. Gene Ther.* 1:111-2.

[0175] Рекомбинантные аденоассоциированные вирусные векторы (rAAV) являются перспективной альтернативной системой для доставки генов на основе дефективного и непатогенного парвовируса аденоассоциированного вируса типа 2. Все векторы получают из плазмиды, в которой сохранены только инвертированные концевые повторы AAV размером 145 п.о., фланкирующие трансгенную кассету экспрессии. Эффективный перенос генов и стабильная доставка трансгена в связи с интеграцией в геномы трансдуцированной клетки являются ключевыми свойствами данной системы вектора. (Wagner, *et al.* (1998) *Lancet* 351(9117):1702-3, Kearns, *et al.* (1996) *Gene Ther.* 9:748-55). Согласно настоящему изобретению также можно применять другие серотипы AAV, включая AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV8.2, AAV9 и AAVrh10 и псевдотипированный AAV, такой как AAV2/8, AAV2/5 и AAV2/6.

[0176] Дефицитные по репликации рекомбинантные аденовирусные векторы (Ad) можно получить с высоким титром и легко инфицировать ими множество различных типов клеток. Большинство аденовирусных векторов являются сконструированными, в результате чего трансген заменяет гены Ad E1a, E1b и/или E3; впоследствии дефицитный по репликации вектор размножается в клетках 293 человека, которые обеспечивают функцию делетированного гена в транс-положении. Ad векторы могут трансдуцировать множество типов тканей *in vivo*, включая

неделяющиеся, дифференцированные клетки, такие как таковые, обнаруженные в печени, почках и мышцах. Общепринятые Ad векторы обладают большой емкостью переноса. Пример применения Ad вектора в клиническом исследовании включал терапию полинуклеотидами путем внутримышечной инъекции для противоопухолевой иммунизации (Sternan, *et al.* (1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9). Дополнительные
5 примеры применения аденовирусных векторов для переноса генов в клинических исследованиях включают Rosenecker, *et al.* (1996) *Infection* 24(1):5-10; Sternan, *et al.* (1998) *Hum. Gene Ther.* 9(7):1083-1089; Welsh, *et al.* (1995) *Hum. Gene Ther.* 2:205-18; Alvarez, *et al.* (1997) *Hum. Gene Ther.* 5:597-613; Topf, *et al.* (1998) *Gene Ther.* 5:507-513;
10 Sternan, *et al.* (1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089.

[0177] Пакующие клетки применяют для образования вирусных частиц, которые способны инфицировать клетку-хозяина. Такие клетки включают клетки 293, которые пакут аденовирус, и клетки ψ 2 или клетки PA317, которые пакут ретровирус. Вирусные векторы, применяемые в генотерапии, как правило, получают с
15 помощью линии клеток-продуцента, которая пакует вектор нуклеиновой кислоты в вирусную частицу. Векторы, как правило, содержат минимальные вирусные последовательности, необходимые для упаковки и последующей интеграции в хозяина (если применимо), а другие вирусные последовательности были заменены кассетой экспрессии, кодирующей белок, подлежащий экспрессии. Недостающие вирусные
20 функции обеспечиваются в транс-положении линией клеток-продуцентом. Например, AAV векторы, применяемые в генотерапии, как правило, содержат только последовательности инвертированных концевых повторов (inverted terminal repeats, ITR) из генома AAV, которые необходимы для упаковки и интеграции в геном хозяина. Вирусная ДНК пакуется в линии клеток, которая содержит хелперную
25 плазмиду, кодирующую другие гены AAV, а именно гер и сар, но не содержит последовательностей ITR. Линию клеток также инфицируют аденовирусом в качестве хелпера. Хелперный вирус стимулирует репликацию AAV вектора и экспрессию AAV генов с хелперной плазмиды. Хелперная плазида не пакуется в значительных количествах в связи с отсутствием последовательностей ITR. Контаминацию
30 аденовирусом можно снизить с помощью, например, тепловой обработки, к которой аденовирус более чувствителен, чем AAV. Помимо этого, AAV можно получить с применением бакуловирусной системы (см., например, патенты США №№ 6,723,551 и 7,271,002).

[0178] Очистка AAV частиц от 293 или бакуловиральной системы, как правило, включает выращивание клеток, продуцирующих вирус, с последующим сбором вирусных частиц из супернатанта клеток или лизирование клеток и сбор вируса из неочищенного лизата. Затем AAV очищают способами, известными в данной области техники, включая ионообменную хроматографию (например, см. патенты США №№ 7,419,817 и 6,989,264), ионообменную хроматографию и центрифугирование в градиенте плотности CsCl (например, международная публикация патента № WO 2011/094198 A10), иммуноаффинную хроматографию (например, международная публикация патента № WO 2016/128408) или очистку с применением AVB сефарозы (например, GE Healthcare Life Sciences).

[0179] Во многих вариантах применения генотерапии желательно, чтобы вектор для генотерапии был доставлен с высокой степенью специфичности в конкретный тип ткани. Соответственно, вирусный вектор можно модифицировать, чтобы он характеризовался специфичностью к данному типу клеток, путем экспрессии лиганда в виде слитого белка с вирусным белком оболочки на внешней поверхности вируса. Лиганд выбирают так, чтобы он обладал аффинностью в отношении рецептора, который, как известно, присутствует на типе клетки, представляющем интерес. Например, в публикации Han, *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751 сообщается, что вирус лейкоза мышей Молони можно модифицировать, чтобы он экспрессировал херегулин человека, слитый с gp70, и рекомбинантный вирус инфицирует определенные клетки рака молочной железы человека, экспрессирующие рецептор эпидермального фактора роста человека. Данный принцип можно распространить на другие пары вирус-клетка-мишень, в которых клетка-мишень экспрессирует рецептор, а вирус экспрессирует слитый белок, содержащий лиганд для рецептора поверхности клетки. Например, можно сконструировать нитевидный фаг, чтобы он экспонировал фрагменты антитела (например, FAb или Fv), обладающие специфичной аффинностью связывания в отношении практически любого выбранного клеточного рецептора. Несмотря на то, что представленное выше описание относится преимущественно к вирусным векторам, те же принципы применимы к невирусным векторам. Такие векторы можно сконструировать, чтобы они содержали специфичные последовательности захвата, которые способствуют захвату конкретными клетками-мишенями.

[0180] Векторы для генотерапии можно доставить *in vivo* путем введения индивидуальному пациенту, как правило, с помощью системного введения (например,

внутривенной, интраперитонеальной, внутримышечной, субдермальной или внутричерепной инфузии) или местного применения, как описано ниже. В качестве альтернативы, векторы можно доставить в клетки *ex vivo*, например, клетки, эксплантированные от индивидуального пациента (например, лимфоциты, аспираты костного мозга, биопсия ткани), или универсальные донорные гемопоэтические стволовые клетки с последующим приживлением клеток пациенту, как правило, после отбора клеток, в которые встроился вектор.

[0181] Клетки, описанные в настоящем документе, можно также применять для вариантов клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии для лечения и/или предотвращения рака. Клеточная терапия представляет собой специализированный тип трансплантации, при котором реципиенту вводят клетки определенного типа (например, Т-клетки, вступающие в реакцию с антигеном опухоли, или В-клетки). Клеточную терапию можно осуществлять с применением клеток, которые являются аутологическими (полученными от реципиента) или аллогенными (полученными от донора), и клетки могут являться незрелыми клетками, такими как стволовые клетки, или полностью зрелыми и функциональными клетками, такими как Т-клетки. Фактически при некоторых заболеваниях, таких как определенные типы рака, с Т-клетками можно манипулировать *ex vivo*, чтобы повысить их avidность в отношении определенных антигенов опухоли, размножить, а затем ввести пациенту, страдающему от типа рака, в попытке уничтожить опухоль. Данный подход является в особенности подходящим, когда ответ эндогенных Т-клеток подавлен опухолью самой по себе.

[0182] Трансфекция клеток *ex vivo* для диагностики, исследовательских целей, трансплантации или для гено- и/или клеточной терапии (например, с помощью повторной инфузии трансфицированных клеток в организм-хозяин) хорошо известна специалистам в данной области техники. В предпочтительном варианте реализации клетки выделяют из организма субъекта, трансфицируют нуклеиновой кислотой ДНК-связывающих белков (геном или кДНК), и повторно вводят путем инфузии в организм субъекта (например, пациента). Различные типы клеток, подходящие для трансфекции *ex vivo*, хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, руководство Freshney, *et al.*, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique (3-е изд. 1994)) и источники, ссылки на которые приводятся в указанном руководстве применительно к обсуждению выделения и культивирования клеток от пациентов).

- [0183]** В одном варианте реализации в процедурах *ex vivo* для трансфекции клеток и генотерапии применяют стволовые клетки. Преимущество применения стволовых клеток заключается в том, что их можно дифференцировать в другие типы клеток *in vitro* или можно ввести млекопитающему (такому как донор клеток), где они
5 будут привиты в костный мозг. Известны способы дифференциации CD34+ клеток *in vitro* в важные с клинической точки зрения типы иммунных клеток с применением цитокинов, таких как ГМ-КСФ (гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор), ИФН-γ и ФНО-α (фактор некроза опухоли α) (см. публикацию Inaba, *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 176:1693-1702).
- 10 **[0184]** Стволовые клетки выделяют для трансдукции и дифференциации с применением известных способов. Например, стволовые клетки выделяют из клеток костного мозга путем пэннинга клеток костного мозга с применением антител, которые связываются с нежелательными клетками, такими как CD4+ и CD8+ (Т-клетки), CD45+ (пан-В-клетки), GR-1 (гранулоциты) и Iad (дифференцированные
15 антигенпрезентирующие клетки) (см. публикацию Inaba, *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 176:1693-1702).
- [0185]** В некоторых вариантах реализации можно также применять стволовые клетки, которые были модифицированы. Например, нейрональные стволовые клетки, которые стали устойчивыми к апоптозу, можно применять в качестве терапевтических
20 композиций, в которых стволовые клетки также содержат ZFP ФТ согласно настоящему изобретению. Устойчивость к апоптозу может возникнуть, например, в результате нокаута ВАХ и/или ВАК с применением ВАХ- или ВАК-специфичных ZFN (см. патент США № 8,597,912) в стволовых клетках или таковых, которые разрушены каспазой, вновь с применением специфичных к каспазе-6 ZFN, например. Данные
25 клетки можно трансфицировать ZFP ФТ, которые, как известно, регулируют ТКР.
- [0186]** Векторы (например, ретровирусы, аденовирусы, липосомы и т.д.), содержащие терапевтические ДНК-связывающие белки (или нуклеиновые кислоты, кодирующие данные белки), можно также вводить в организм напрямую для трансдукции клеток *in vivo*. В качестве альтернативы, можно вводить «оголенную»
30 ДНК. Введение осуществляют любым из путей, обычно применяемых для приведения молекулы в полный контакт с клетками крови или ткани, включая, без ограничения, инъекцию, инфузию, местное применение и электропорацию. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники, и, хотя для введения конкретной композиции можно

применять более чем один путь, конкретный путь часто может обеспечить более немедленную и более эффективную реакцию, чем другой путь.

[0187] Способы введения ДНК в гемопоэтические стволовые клетки раскрыты, например, в патенте США № 5,928,638. Векторы, подходящие для введения трансгенов в гемопоэтические стволовые клетки, например, CD34+ клетки, включают аденовирус типа 35.

[0188] Векторы, подходящие для введения трансгенов в иммунные клетки (например, Т-клетки), включают неинтегрирующие лентивирусные векторы. См., например, публикации Ory, *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11382-11388; Dull, *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zuffery, *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:9873-9880; Follenzi, *et al.* (2000) *Nature Genetics* 25:217-222.

[0189] Фармацевтически приемлемые носители определяются отчасти конкретной композицией, введение которой проводят, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции. Соответственно, существует широкое множество доступных подходящих составов фармацевтических композиций, как описано ниже (см., например, руководство Remington's Pharmaceutical Sciences, 17-е изд., 1989).

[0190] Как отмечается выше, раскрытые способы и композиции можно применять в любом типе клеток, включая, без ограничения, прокариотические клетки, клетки грибов, клетки архей, клетки растений, клетки насекомых, клетки животных, клетки позвоночных, клетки млекопитающих и клетки человека, включая Т-клетки и стволовые клетки любого типа. Подходящие линии клеток для экспрессии белка известны специалистам в данной области техники и включают, без ограничения COS, CHO (например, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (например, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), perC6, клетки насекомых, таких как *Spodoptera fugiperda* (Sf), и клетки грибов, таких как *Saccharomyces*, *Pichia* и *Schizosaccharomyces*. Также можно применять потомков, варианты и производные данных линий клеток.

30 **Варианты применения**

[0191] Раскрытые композиции и способы можно использовать для любого варианта применения, в котором желательно модулировать экспрессию и/или функциональность ТКР и/или В2М, включая, без ограничения, терапевтические и исследовательские варианты применения, в которых желательна модуляция ТКР и/или

В2М. Например, раскрытые композиции можно применять *in vivo* и/или *ex vivo* (варианты клеточной терапии) для нарушения экспрессии эндогенного ТКР и/или В2М в Т-клетках, модифицированных для адоптивной клеточной терапии, чтобы данные клетки экспрессировали один или более экзогенных CAR, экзогенных ТКР или молекул других рецепторов, специфичных для рака, чтобы посредством этого осуществлять лечение и/или предотвращение рака. Т-клетки могут представлять собой эффекторные Т-клетки или регуляторные Т-клетки. Помимо этого, в таком формате устранение экспрессии ТКР в клетке может устранить или по существу снизить риск нежелательной перекрестной реакции со здоровой нецелевой тканью (т.е. ответ «трансплантат против хозяина»). Модифицированные клетки, описанные в настоящем документе, можно также применять для лечения типов рака, включая, без ограничения, рак предстательной железы, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и неходжкинскую лимфому.

[0192] Способы и композиции также включают композиции стволовых клеток (например, иПСК и ГСК/ГСПК, гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественниц), в которых гены В2М, ТКРА и/или ТКРВ в стволовых клетках были модулированы (модифицированы), и клетки дополнительно содержат АСТР и/или CAR, и/или выделенный либо сконструированный ТКР. Например, аллогенные гемопоэтические стволовые клетки, модулированные с помощью нокаута или нокдауна ТКР, можно ввести пациенту с совпадающим HLA после удаления костного мозга. Данные измененные ГСК обеспечат повторную колонизацию пациента, но не вызовут потенциальную РТПХ. Введенные клетки могут также содержать другие изменения, чтобы способствовать последующей терапии (например, устойчивость к химиотерапии), для лечения первопричинного заболевания. HLA класса I «ноль»-клетки также применяют в качестве «готовой к применению» терапии в ситуациях неотложной помощи для пациентов с травмами.

[0193] Способы и композиции согласно настоящему изобретению также подходят для разработки дизайна и реализации моделей *in vitro* и *in vivo*, например, моделей на животных ТКР или В2М и связанных нарушений, позволяющих изучать данные нарушения.

[0194] Все патенты, заявки на патенты и публикации, упоминаемые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0195] Несмотря на то, что настоящее изобретение было представлено в некоторых деталях в качестве иллюстрации и примера для целей ясности и понимания, специалистам в данной области техники понятно, что на практике можно реализовать различные изменения и модификации в пределах духа или объема настоящего изобретения. Соответственно, изложенное выше раскрытие и следующие примеры не следует истолковывать как ограничивающие.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Разработка дизайна ТКР-специфичных нуклеаз

[0196] ТКР-специфичные ZFN конструировали для обеспечения сайт-специфичного введения двухцепочечных разрывов в ген ТКР α (ТКРА). Дизайн ZFN разрабатывали, как по существу описано в публикациях Urnov, *et al.* (2005) *Nature* 435(7042):646-651, Lombardo, *et al.* (2007) *Nat Biotechnol.* 25(11):1298-306, и публикации патентов США №№ 2008/0131962; 2015/016495; 2014/0120622; и 2014/0301990 и патенте США № 8,956,828. Пары ZFN нацеливали на различные сайты в константной области гена ТКРА (см. фигуру 1). Спирали распознавания для иллюстративных пар ZFN, а также последовательность-мишень представлены ниже в таблице 1. Сайты-мишени вариантов дизайна ТКРА с цинковым пальцем представлены в первом столбце. Нуклеотиды в сайте-мишени, на которые нацелены спирали распознавания ZFP, показаны заглавными буквами; нецелевые нуклеотиды показаны строчными буквами. Также показаны линкеры, применявшиеся для соединения домена нуклеазы FokI и ДНК-связывающего домена ZFP (см. публикацию патента США № 2015/0132269). Например, аминокислотная последовательность линкерного домена L0 представляет собой ДНК-связывающий домен-QLVKS-домен нуклеазы FokI (SEQ ID NO:5). Аналогично, аминокислотные последовательности для линкерного домена N7a представляют собой домен нуклеазы FokI -SGTPHEVG VYTL-ДНК-связывающий домен (SEQ ID NO:6), и N7c представляет собой домен нуклеазы FokI -SGAIRCHDEFWF-ДНК-связывающий домен (SEQ ID NO:7).

Таблица 1: Варианты дизайна цинкового пальца для ТКР- α (ТКРА)

Название ZFN последовательность-мишень	F1	F2	F3	F4	F5	F6	Линкерный домен
SBS55204 5' ttGCTCT	DRSNLSR (SEQ ID	QKVTLAA (SEQ ID	DRSALSR (SEQ ID	TSGNLTR (SEQ ID	YRSSLKE (SEQ ID	TSGNLTR (SEQ ID	L0

TGAAGTCcA TAGACctca tgt (SEQ ID NO:8)	NO:22)	NO:23)	NO:24)	NO:25)	NO:26)	NO:25)	
SBS53759 5'gtGCTGT GgCCTGGAG CAACAaatc tga (SEQ ID NO:9)	QQNVLIN (SEQ ID NO:27)	QNATRTK (SEQ ID NO:28)	QSGHLAR (SEQ ID NO:29)	NRYDLMT (SEQ ID NO:30)	RSDSLLR (SEQ ID NO:31)	QSSDLTR (SEQ ID NO:32)	L0
SBS55229 5'ctGTTGC TCTTGAAGT Ccatagacc tca (SEQ ID NO:10)	DRSALAR (SEQ ID NO:33)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	HRSTLQG (SEQ ID NO:35)	QSGDLTR (SEQ ID NO:36)	TSGSLTR (SEQ ID NO:37)	H/II	L0
SBS53785 5'ctGTGGC CtGGAGCAA CAaatctga ctt (SEQ ID NO:11)	QHQVLVR (SEQ ID NO:38)	QNATRTK (SEQ ID NO:28)	QSGHLR (SEQ ID NO:39)	DRSDLSR (SEQ ID NO:40)	RSDALAR (SEQ ID NO:41)	H/II	L0
SBS53810 5'agGATTC GGAACCCAA TCACTg (SEQ ID NO:12)	DQSNLRA (SEQ ID NO:42)	TSSNRKT (SEQ ID NO:43)	DSSTRKT (SEQ ID NO:44)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	RSDDLSE (SEQ ID NO:45)	TNSNRKR (SEQ ID NO:46)	L0
SBS55255 5'ctCCTGA AAGTGGCCG Ggtttaatc tgc (SEQ ID NO:13)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	DRSHLAR (SEQ ID NO:48)	LKQHLNE (SEQ ID NO:49)	TSGNLTR (SEQ ID NO:25)	HRTSLTD (SEQ ID NO:50)	H/II	L0
SBS55248 5'agGATTC GGAACCCAA TCACTgaca ggt (SEQ ID NO:14)	DQSNLRA (SEQ ID NO:42)	TSSNRKT (SEQ ID NO:43)	LQQTLD (SEQ ID NO:51)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	RREDLIT (SEQ ID NO:52)	TSSNLSR (SEQ ID NO:53)	L0
SBS55254 5'ctCCTGA AAGTGGCCG Ggtttaatc tgc (SEQ ID NO:13)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	DRSHLAR (SEQ ID NO:48)	LKQHLNE (SEQ ID NO:49)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	HNSSLKD (SEQ ID NO:54)	H/II	L0
SBS55260 5'ctCCTGA AAGTGGCCG Ggtttaatc tgc (SEQ ID NO:13)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	DRSHLAR (SEQ ID NO:48)	LNHHLQQ (SEQ ID NO:55)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	HKTSLKD (SEQ ID NO:56)	H/II	L0
SBS55266 5'tcAAGCT GGTCGAGaA AAGCTttga aac (SEQ ID NO:15)	QSSDLR (SEQ ID NO:57)	QSGNRTT (SEQ ID NO:58)	RSANLAR (SEQ ID NO:59)	DRSALAR (SEQ ID NO:33)	RSDVLSE (SEQ ID NO:60)	KHSTRRV (SEQ ID NO:61)	N7c
SBS53853	TMHQVE	TSGHLR	RSDHLTQ	DSANLSR	QSGSLTR	AKWNLDA	L0

5'aaCAGGT AaGACAGGG GTCTAgcct ggg (SEQ ID NO:16)	(SEQ ID NO:62)	(SEQ ID NO:63)	(SEQ ID NO:64)	(SEQ ID NO:65)	(SEQ ID NO:66)	(SEQ ID NO:67)	
SBS53860 5'ctGTGCT AGACATGaG GTCTAtgga ctt (SEQ ID NO:17)	TMHQRVE (SEQ ID NO:62)	TSGHLRSR (SEQ ID NO:63)	RNDSLKT (SEQ ID NO:68)	DSSNLSR (SEQ ID NO:69)	QKATRRTT (SEQ ID NO:70)	RNASRTR (SEQ ID NO:72)	N7a
SBS53863 5'ttCAAGA GCAACAGtG CTGTGgcct gga (SEQ ID NO:18)	RSDSLLR (SEQ ID NO:31)	QSSDLRR (SEQ ID NO:73)	RSDNLSE (SEQ ID NO:74)	ERANRNS (SEQ ID NO:75)	RSDNLAR (SEQ ID NO:76)	QKVNIMS (SEQ ID NO:77)	L0
SBS55287 5'ttCAAGA GCAACAGtG CTGTGgcct gga (SEQ ID NO:18)	RSDSLLR (SEQ ID NO:31)	QSSDLRR (SEQ ID NO:73)	RSDNLSE (SEQ ID NO:74)	ERANRNS (SEQ ID NO:75)	RSDNLAR (SEQ ID NO:76)	QKVNIRE (SEQ ID NO:78)	L0
SBS53855 5'ctGTGCT AGACATGaG GTCTAtgga ctt (SEQ ID NO:17)	TMHQRVE (SEQ ID NO:62)	TSGHLRSR (SEQ ID NO:63)	RSDTLSQ (SEQ ID NO:79)	DRSDLSR (SEQ ID NO:40)	QKATRRTT (SEQ ID NO:70)	RNASRTR (SEQ ID NO:72)	N7a
SBS53885 5'ccTGTCA GtGATTGGG TTCCGaattc ctc (SEQ ID NO:19)	RSDTLSE (SEQ ID NO:79)	TSGSLTR (SEQ ID NO:37)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	TSSNRTK (SEQ ID NO:71)	RSDNLSE (SEQ ID NO:74)	WHSSLRV (SEQ ID NO:83)	N7a
SBS52774 5'ccTGTCA GtGATTGGG TTCCGaattc ctc (SEQ ID NO:19)	RKQTRTT (SEQ ID NO:80)	HRSSLRR (SEQ ID NO:81)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	TSANLSR (SEQ ID NO:82)	RSDNLSE (SEQ ID NO:74)	WHSSLRV (SEQ ID NO:83)	N7a
SBS53909 5'tcCTCCT GAAAGTGGC CGGGtttaa tct (SEQ ID NO:20)	RSAHLRSR (SEQ ID NO:84)	DRSDLSR (SEQ ID NO:40)	RSDVLSV (SEQ ID NO:85)	QNNHRIT (SEQ ID NO:86)	RSDVLSE (SEQ ID NO:60)	SPSSRRT (SEQ ID NO:87)	L0
SBS52742 5'tcCTCCT GAAAGTGGC CGGGtttaa tct (SEQ ID NO:20)	RSAHLRSR (SEQ ID NO:84)	DRSDLSR (SEQ ID NO:40)	RSDSLSV (SEQ ID NO:88)	QANRKT (SEQ ID NO:89)	RSDVLSE (SEQ ID NO:60)	SPSSRRT (SEQ ID NO:87)	L0
SBS53856 5'ctGTGCT AGACATGaG GTCTAtg (SEQ ID NO:21)	TMHQRVE (SEQ ID NO:62)	TSGHLRSR (SEQ ID NO:63)	RSDSLST (SEQ ID NO:90)	DRANRIK (SEQ ID NO:91)	QKATRRTT (SEQ ID NO:70)	RNASRTR (SEQ ID NO:72)	N7a

[0197] Исследовали все ZFN, и было обнаружено, что они связываются со своими сайтами-мишенями и являются активными в качестве нуклеаз.

[0198] ZFP, описанные в настоящем документе, могут также содержать одну или более мутаций в остатках фосфатного контакта белка с цинковым пальцем и/или домена FokI, например, мутант nR-5Qabc (в остоле ZFP) и/или мутанты R416S и/или K525S (в FokI), описанные в публикации патента США № 20180087072.

[0199] Также конструировали направляющие РНК для системы *S. pyogenes* CRISPR/Cas9 для нацеливания на ген ТКРА. См. также публикацию патента США № 2015/00566705 применительно к дополнительным направляющим РНК, нацеленным на ТКР альфа. В таблице 2 ниже показаны последовательности-мишени в гене ТКРА, а также последовательности направляющей РНК. Все направляющие РНК исследовали в системе CRISPR/Cas9, и было обнаружено, что они являются активными.

15 **Таблица 2: Направляющие РНК для константной области ТКРА (ТРАК) человека**

Название	Цепь	Мишень (5' → 3')	Направляющая РНК (5' → 3')
ТРАК-Gr14	R	GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG (SEQ ID NO:92)	GCTGGTACACGGCAGGGTCA (SEQ ID NO:104)
ТРАК-Gr25	R	AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG (SEQ ID NO:93)	gAGAGTCTCTCAGCTGGTACA (SEQ ID NO:105)
ТРАК-Gr71	R	GAGAATCAAAATCGGTGAATAGG (SEQ ID NO:94)	GAGAATCAAAATCGGTGAAT (SEQ ID NO:106)
ТРАК-Gf155	F	ACAAAACCTGTGCTAGACATGAGG (SEQ ID NO:95)	gACAAAACCTGTGCTAGACATG (SEQ ID NO:107)
ТРАК-Gf191	F	AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG (SEQ ID NO:96)	gAGAGCAACAGTGCTGTGGCC (SEQ ID NO:108)
ТРАК-Gf271	F	GACACCTTCTTCCCCAGCCAGG (SEQ ID NO:97)	GACACCTTCTTCCCCAGCCC (SEQ ID NO:109)
ТРАК-Gr2146	R	CTCGACCAGCTTGACATCACAGG (SEQ ID NO:98)	gCTCGACCAGCTTGACATCAC (SEQ ID NO:110)
ТРАК-Gf2157	F	AAGTTCCTGTGATGTCAAGCTGG (SEQ ID NO:99)	gAAGTTCCTGTGATGTCAAGC (SEQ ID NO:111)
ТРАК-Gf2179	F	GTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGG (SEQ ID NO:100)	GTCGAGAAAAGCTTTGAAAC (SEQ ID NO:112)
ТРАК-Gr3081	R	TTCGGAACCCAATCACTGACAGG (SEQ ID NO:101)	gTTCGGAACCCAATCACTGAC (SEQ ID NO:113)
ТРАК-Gr3099	R	CCACTTTCAGGAGGAGGATTTCGG (SEQ ID NO:102)	gCCACTTTCAGGAGGAGGATT (SEQ ID NO:114)
ТРАК-Gr3105	R	ACCCGGCCACTTTTCAGGAGGAGG (SEQ ID NO:103)	gACCCGGCCACTTTTCAGGAGG (SEQ ID NO:115)

[0200] Таким образом, нуклеазы, описанные в настоящем документе (например, нуклеазы, содержащие ДНК-связывающий домен ZFP или sgRNA), связываются со своими сайтами-мишенями и расщепляют ген ТКРА, тем самым осуществляя генетические модификации в пределах гена ТКРА, содержащего любую из SEQ ID NO:6-48 или 137-205, включая модификации (вставки и/или делеции) в пределах любой из данных последовательностей (например, последовательностей-мишеней, представленных в любой из SEQ ID NO:8-21 и/или 92-103; 12 – 25 нуклеотидов из данных сайтов-мишеней; и/или между спаренными сайтами-мишенями), и/или модификации в пределах следующих последовательностей: AACAGT, AGTGCT, CTCCT, TTGAAA, TGGACTT и/или AATCCTC (см. фигуру 1B). Также разрабатывали дизайн нуклеаз TALE, нацеленных на данные сайты-мишени, и было обнаружено, что они являются функциональными с точки зрения связывания и активности.

[0201] Более того, все ДНК-связывающие домены (ZFP и sgRNA) связывались со своими сайтами-мишенями, и ДНК-связывающие домены ZFP, TALE и sRNA, которые распознают данные сайты-мишени, также были приготовлены в состав в активные сконструированные факторы транскрипции при связывании с одним или более транскрипционных регуляторных доменов.

Пример 2: Нуклеазная активность *in vitro*

[0202] ZFN, описанные в таблице 1, применяли для исследования нуклеазной активности на клетках K562. Для исследования активности расщепления клетки K562 трансфицировали плазмидами, кодирующими пары специфичных к ТКРА человека ZFN, описанные выше, с плазмидой или мРНК. Клетки K562 получали из Американской коллекции типовых культур и выращивали согласно рекомендациям в среде RPMI (Invitrogen) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки надлежащего качества (ЭТС, Cyclone). С целью трансфекции OPC (открытые рамки считывания) для активных нуклеаз, перечисленных в таблице 1, клонировали в вектор экспрессии, оптимизированный для продукции мРНК, несущей 5'- и 3'-UTR и синтетический полиА-сигнал. мРНК получали с применением набора mMessage mMachine T7 Ultra kit (Ambion) согласно инструкциям производителя. При синтезе мРНК нуклеазы *in vitro* применяли вектор на основе pVAX, содержащий промотор T7, соответствующий для нуклеазы, и полиА-мотив для ферментативного добавления полиА-«хвоста» после реакции транскрипции *in vitro*, или вектор на основе pGEM, содержащий промотор T7, 5'UTR, соответствующий для нуклеазы, 3'UTR и полиА-

фрагмент размером 64 п.о., или ПЦР-ампликон, содержащий промотор T7, 5'UTR, соответствующий для нуклеазы, 3'UTR и полиА-фрагмент размером 60 п.о. Один миллион клеток K562 смешивали с 250 нг или 500 нг мРНК, кодирующей ZFN. Клетки трансфицировали в системе Амаха Nucleofector ИТМ с применением программы T-16 и восстанавливали в 1,4 мл теплой среды RPMI + 10% ЭТС. Нуклеазную активность оценивали методом глубокого секвенирования (MiSeq, Illumina) согласно стандартным протоколам через три дня после трансфекции. Результаты представлены в таблице 3 ниже.

Таблица 3: Активность нуклеазы с цинковым пальцем

№ пары	Пара ZFN	% NHEJ (250 нг/ZFN)	Станд. откл.	% NHEJ (500 нг/ZFN)	Станд. откл.	Сайт
1	55204:53759	76,7	1,3	87,7	1	A2
2	55229:53785	91,4	1,5	93,6	1,7	B
3	53810:55255	81,6	0,6	91,5	1,3	D1
4	55248:55254	95,4	1,8	96,2	1,2	D2
5	55248:55260	87,9	1,3	93,0	1	D3
6	55266:53853	85,3	1,4	88,9	0,4	E
7	53860:53863	77,1	1,7	87,3	1,1	F1
8	53856:55287	53,6	3,2	74,8	1,3	F2
9	53885:53909	90,1	1,6	90,2	1,5	G1
10	52774:52742	76,8	0,8	84,4	2,2	G0
11	GFP (green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок)	0		0		

10

[0203] Высокоактивные специфичные к ТКРА TALEN также были ранее описаны (см. международную публикацию патента № WO 2014/153470).

[0204] Также исследовали системы CRISPR/Cas9, специфичные к ТКРА человека. Активность систем CRISPR/Cas9 на клетках K562 человека измеряли в анализе MiSeq. Расщепление последовательности ДНК эндогенного ТКРА под действием Cas9 анализировали методом высокопроизводительного секвенирования (MiSeq, Illumina).

[0205] В данных экспериментах Cas9 обеспечивали на плазмиде pVAX, и sgRNA обеспечивали на плазмиде под контролем промотора (например, промотора U6 или промотора ЦМВ, цитомегаловируса). Плазмиды смешивали в количестве по 100 нг каждой или по 400 нг каждой и смешивали с 2e5 клеток на анализ. Клетки трансфицировали с применением системы Амаха. Вкратце, применяли набор для трансфекции Амаха и проводили трансфекцию нуклеиновыми кислотами с применением стандартного протокола для носителя Амаха. После трансфекции клетки оставляли в покое в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем

25

ресуспендировали в предварительно нагретой RPMI. Затем клетки выращивали в стандартных условиях при температуре 37 °C. Геномную ДНК выделяли через 7 дней после трансфекции и подвергали анализу MiSeq.

[0206] Вкратце, направляющие РНК, перечисленные в таблице 2, исследовали в отношении активности. Направляющие РНК исследовали в трех различных конфигурациях: G0 представляет собой формат, описанный выше. В G1 применяли вектор pVAX, содержащий промотор ЦМВ, запускающий экспрессию гена Cas9, и кассету экспрессии U6-направляющая РНК-трейсер, где транскрипция обеих рамок считывания происходила в одной и той же ориентации. Формат G2 был подобен G1, за исключением того, что Cas9 и кассеты экспрессии U6-направляющая РНК находились в противоположных ориентациях. Данные три формата исследовали с применением 100 нг или 400 нг трансфицирующей ДНК; результаты представлены ниже в таблице 4. Результаты выражены в виде «процента инсерционно-делеционных мутаций» или «% NHEJ», где «инсерционно-делеционные мутации» обозначают небольшие вставки и/или делеции, обнаруженные как результат склонного к ошибкам процесса восстановления NHEJ в сайте расщепления двойной цепи, вызванного нуклеазой.

Таблица 4: Активность CRISPR/Cas

Применяемая направляющая РНК	% суммарных инсерционно-делеционных мутаций					
	GR0		GR1		GR2	
	% NHEJ (100 нг)	% NHEJ (400 нг)	% NHEJ (100 нг)	% NHEJ (400 нг)	% NHEJ (100 нг)	% NHEJ (400 нг)
TKPA-Gr14	6,4	25,8	0,6	12,4	0,5	10,2
TKPA-Gr25	14,6	26,9	2,4	21,7	1,1	21,6
TKPA-Gr71	3,7	13,8	0,3	4,2	0,3	7,8
TKPA-Gf155	6,0	19,5	1,2	12,7	0,8	15,9
TKPA-Gf191	1,0	6,9	0,3	2,3	0,4	4,5
TKPA-Gf271	4,7	21,5	0,8	10,3	0,7	15,2
TKPA-Gr2146	1,1	8,8	0,3	1,7	0,2	2,0
TKPA-Gf2157	3,8	22,2	0,6	9,6	0,6	12,0
TKPA-Gf2179	0,8	4,9	0,2	1,8	0,2	1,4
TKPA-Gr3081	5,9	23,6	0,7	11,5	0,8	12,6
TKPA-Gr3099	2,1	21,1	0,4	7,1	0,3	6,2
TKPA-Gr3105	12,1	45,9	2,2	22,0	1,0	7,6
Контроли ZFN						
55248:55254	24,2	52,4				
55229:53785	6,0	24,5				

55266:53853	12,0	37,0				
-------------	------	------	--	--	--	--

[0207] Как видно, нуклеазы, описанные в настоящем документе, вызывали расщепление и геномные модификации в целевом сайте.

[0208] Таким образом, нуклеазы, описанные в настоящем документе (например, нуклеазы, содержащие ДНК-связывающий домен ZFP, TALE или sgRNA), связываются со своими сайтами-мишенями и расщепляют ген ТКРА, тем самым осуществляя генетические модификации в пределах гена ТКРА, содержащего любую из SEQ ID NO:8-21 или 92-103, включая модификации (вставки и/или делеции) в пределах любой из данных последовательностей (SEQ ID NO:8-21, 92-103); модификации в пределах 1 – 50 (например, от 1 до 10) пар оснований из данных последовательностей генов; модификации между сайтами-мишенями спаренных сайтов-мишеней (в случае димеров); и/или модификации в пределах одной или более из следующих последовательностей: AACAGT, AGTGCT, CTCCT, TTGAAA, TGGACTT и/или AATCCTC (см. фигуру 1B).

[0209] Более того, все ДНК-связывающие домены (ZFP, TALE и sgRNA) связывались со своими сайтами-мишенями, и были также приготовлены в состав в активные сконструированные факторы транскрипции при связывании с одним или более транскрипционных регуляторных доменов

20 **Пример 3: ТКРА-специфичная активность ZFN в Т-клетках**

[0210] ТКРА-специфичные пары ZFN также исследовали на Т-клетках человека в отношении нуклеазной активности. Очищенные Т-клетки трансфицировали мРНК, кодирующей ZFN. Вкратце, Т-клетки получали из продукта лейкофереза и очищали с применением системы Miltenyi CliniMACS (двойной отбор CD4 и CD8). Затем данные клетки активировали с применением гранул Dynabeads (ThermoFisher) согласно протоколу производителя. Через 3 дня после активации клетки трансфицировали тремя дозами мРНК (60, 120 и 250 мкг/мл) с применением электропоратора Maxcyte (Maxcyte), ОС-100, 30е6 клеток/мл, объем 0,1 мл. Клетки анализировали в отношении целевой модификации ТКРА с применением глубокого секвенирования (Miseq, Illumina) на 10 день после трансфекции. Жизнеспособность клеток и рост клеток (общее число удвоений клеток) измеряли в течение 13 – 14 дней культивирования. Помимо этого, ТКР на поверхности клетки обработанных клеток измеряли с

применением стандартных анализов FACS в день 10 окрашивания культур в отношении CD3.

[0211] Все ТКРА-специфичные пары ZFN были активными в Т-клетках, и некоторые из них в данных условиях были способны вызывать более 80% аллельной модификации ТКРА (см. фигуры 2А и 2В). Аналогично, Т-клетки, обработанные ZFN, утрачивали экспрессию CD3, поскольку анализ методом FACS продемонстрировал, что в некоторых случаях от 80 до 90% Т-клеток были CD3-отрицательными (фигура 3). Сравнение процента клеток с модифицированным с помощью ZFN ТКРА и клеток с утратой CD3 в данных клетках продемонстрировало высокую степень корреляции (фигура 4). Жизнеспособность клеток была сравнима с контролями с имитацией обработки, и рост клеток с нокаутом ТКРА был также сравним с контролями (см. фигуры 5А-5D).

Пример 4: Двойной нокаут В2М и ТКРА с направленной интеграцией

[0212] Нуклеазы, описанные выше, и нацеленную на В2М нуклеазу, описанную в таблице 5 (см. также публикацию патента США № 2017/0173080), применяли для инактивации В2М и ТКРА и для введения с помощью направленной интеграции донора (трансгена) в локус ТКРА или В2М. Специфичные к В2М ZFN представлены ниже в таблице 5:

Таблица 5: варианты дизайна специфичных к В2М ZFN

Название ZFN последовательность - мишень	F1	F2	F3	F4	F5	F6	Линкерный домен
SBS57327 5' taGCAATT CAGGAAaT TTGACttt ccat (SEQ ID NO:123)	DRSNLSR (SEQ ID NO:22)	ARWYLDK (SEQ ID NO:125)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	AKWNLDA (SEQ ID NO:67)	QQHVLQN (SEQ ID NO:119)	QNATRTK (SEQ ID NO:28)	L0
SBS57332 5'tgTCGG ATgGATGA AACCCAGa cacata (SEQ ID NO:117)	RSDNLSE (SEQ ID NO:74)	ASKTRTN (SEQ ID NO:120)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	TSANLSR (SEQ ID NO:82)	TSGNLTR (SEQ ID NO:25)	RTEDRLA (SEQ ID NO:121)	N6a
SBS57531 5' gaGTAGCG	AQCCLFH (SEQ ID NO:128)	DQSNLRA (SEQ ID NO:42)	RSANLTR (SEQ ID NO:129)	RSDDLTR (SEQ ID NO:130)	QSGSLTR (SEQ ID NO:66)	Н/П	N6a

cGAGCACA GCTaaggc cacg (SEQ ID NO:126)							
SBS57071 gcCACGGA gCGAGACA TCTCGgcc cgaa (SEQ ID NO:127)	RSDDLK (SEQ ID NO:131)	DSSARKK (SEQ ID NO:132)	DRSNLSR (SEQ ID NO:22)	QRTHLRD (SEQ ID NO:133)	QSGHLAR (SEQ ID NO:29)	DSSNREA (SEQ ID NO:134)	L0

[0213] В данном эксперименте ТКРА-специфичная пара ZFN представляла собой SBS№55266/SBS№53853, содержащую последовательность TTGAAA между ТКРА-специфичными сайтами-мишенями ZFN (таблица 1), и пара В2М представляла собой SBS№57332/SBS№57327 (таблица 5), содержащую последовательность TCAAAT между В2М-специфичными сайтами-мишенями ZFN.

[0214] Вкратце, Т-клетки (АС-ТС-006) оттаивали и активировали с помощью гранул CD3/28 Dynabeads (соотношение клеток: гранул 1:3) в культуральной среде для Т-клеток X-vivo 15 (день 0). Через два дня в культуре (день 2) в культуру клеток добавляли донор AAV (содержащий трансген GFP и плечи гомологии к гену ТКРА или В2М), за исключением контрольных групп без донора, которые также поддерживали. На следующий день (день 3) добавляли ZFN для ТКРА и В2М с помощью доставки мРНК в следующие 5 групп:

- (a) Группа 1 (только ZFN для ТКРА и В2М, без донора): только ТКРА 120 мкг/мл; В2М 60 мкг/мл;
- (b) Группа 2 (ZFN для ТКРА и В2М и донор с плечами гомологии ТКРА): ТКРА 120 мкг/мл; В2М 60 мкг/мл и AAV (ТКРА-Сайт E-hPGK-eGFP-Клон E2) 1E5 вирусных геномов/клетку;
- (c) Группа 3 (ZFN для ТКРА и В2М и донор с плечами гомологии ТКРА): ТКРА 120 мкг/мл; В2М 60 мкг/мл; и AAV (ТКРА-Сайт E-hPGK-eGFP-Клон E2) 3E4 вирусных геномов/клетку;
- (d) Группа 4 (ZFN для ТКРА и В2М и донор с плечами гомологии В2М): ТКРА 120 мкг/мл; В2М 60 мкг/мл и AAV (pAAV В2М -hPGK GFP) 1E5 вирусных геномов/клетку;
- (e) Группа 5 (ZFN для ТКРА и В2М и донор с плечами гомологии В2М): ТКРА 120 мкг/мл; В2М 60 мкг/мл и AAV (pAAV В2М - hPGK GFP) 3E4 вирусных геномов/клетку.

Все эксперименты проводили при плотности клеток 3×10^7 клеток/мл с применением протокола, описанного в публикации патента США № 2017/0137845 (экстремальный холодовой шок), и культивировали для обеспечения холодового шока при температуре 30°C в течение ночи после электропорации.

- 5 [0215] На следующий день (день 4) клетки разводили до плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и переносили в культуры при температуре 37°C . Через три дня (день 7) клетки вновь разводили до плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Еще через три и семь дней в культуре (дни 10 и 14, соответственно) клетки собирали для анализа FACS и MiSeq (разводили до плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/мл).
- 10 [0216] Как представлено на фигуре 6, экспрессия GFP свидетельствовала, что направленная интеграция была успешной, и что были получены генетически модифицированные клетки, содержащие модификации B2M и ТКРА (вставки и/или делеции) в пределах сайтов-мишеней нуклеазы (или в пределах от 1 до 50, 1 – 20, 1 – 10 или 1 – 5 пар оснований от сайтов-мишеней нуклеазы), в том числе в пределах
- 15 TTGAAA и TCAAAT (между спаренными сайтами-мишенями), как раскрыто в настоящем документе.

- [0217] Проводили дополнительные эксперименты для получения клеток с двойными нокаутами ТРАК и B2M и направленной интеграции донорного вектора. В частности, в Т-клетки вводили ТРАК-специфичную пару ZFN SBS№55266/SBS№53853
- 20 и пару для B2M SBS№57071/SBS№57531. Вкратце, CD4:CD8 Т-клетки человека в соотношении 1:1 оттаивали и активировали гранулами CD3/28 Dynabeads® (соотношение клеток: гранул 1:3) в культуральной среде для Т-клеток X-vivo 15 (день 0).

- [0218] Через 3 дня в культуре (день 3) клетки концентрировали до плотности
- 25 3×10^7 клеток/мл в буфере для электропорации Maxcyte в присутствии мРНК ZFN, а затем проводили электропорацию с применением устройства Maxcyte. После этого концентрированные подвергшиеся электропорации клетки помещали в лунку для культивирования тканей, затем AAV6, кодирующий трансгенный донор hPGK-GFP-BGHполиА, добавляли к концентрированным клеткам, которым позволяли
- 30 восстановиться, и инкубировали при температуре 37°C в течение 20 минут. В качестве альтернативы, донорный вектор можно добавить в буфер для электропорации в устройстве. Затем клетки разводили в культуральной среде до плотности 3×10^6 клеток/мл и культивировали при температуре 30°C в течение ночи. На следующее утро клетки

разводили до плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в дополнительном объеме культуральной среды. Ниже представлено описание групп:

(a) Имитация: проводили электропорацию клеток без добавления мРНК ZFN или донорного AAV;

5 (b) только ZFN для ТРАК и В2М, без донора: только ТРАК 120 мкг/мл; В2М 30 мкг/мл;

(c) ZFN для ТРАК и В2М и донор с плечами гомологии В2М: ТРАК 120 мкг/мл; В2М 30 мкг/мл и AAV6 (В2М-Сайт A-hPGK-eGFP) 3×10^4 вирусных геномов/клетку;

(d) ZFN для ТРАК и В2М и донор с плечами гомологии ТРАК: ТРАК 120 мкг/мл; В2М 30 мкг/мл; и AAV6 (ТКРА-Сайт E-hPGK-eGFP) 3×10^4 вирусных геномов/клетку.

10 **[0219]** Все эксперименты проводили при плотности клеток 3×10^7 клеток/мл с применением протокола, описанного в публикации патента США № 2017/0137845 (экстремальный холодовой шок), и культивировали для обеспечения холодового шока при температуре 30°C в течение ночи после электропорации. На следующий день (день 4) клетки разводили до плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и переносили в культуры при
15 температуре 37°C . Через три дня (день 7) клетки вновь разводили до плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Еще через три и семь дней в культуре (дни 10 и 14, соответственно) клетки собирали для анализа FACS и MiSeq (разводили до плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/мл).

[0220] Как представлено на фигуре 7, экспрессия GFP (донор) свидетельствовала, что направленная интеграция была успешной, и что были получены
20 генетически модифицированные клетки, содержащие модификации В2М и ТРАК (вставки и/или делеции) в пределах сайтов-мишеней нуклеазы (или в пределах от 1 до 50, 1 – 20, 1 – 10 или 1 – 5 пар оснований от сайтов-мишеней нуклеазы, в том числе между спаренными сайтами), как раскрыто в настоящем документе, с высокой частотой (включая уровни нокаута и направленной интеграции 80 – 90%).

25 **[0221]** Также проводили эксперименты, в которых трансген CAR интегрировали в двойные нокауты В2М и ТКРА, в В2М, в ТКРА или в другой локус, для получения двойных нокаутов В2М/ТКРА, которые экспрессировали CAR.

Пример 5: Оптимизация ZFN для ТКРА и В2М

[0222] Для снижения нецелевого расщепления применяли стратегию оптимизации нуклеазы, в которой неспецифичные фосфатные контакты селективно удаляют, чтобы обеспечить всеобщее подавление нецелевого расщепления (Guilinger, *et al.* (2014) *Nat Methods*. 11(4):429-35. doi: 10.1038/nmeth.2845; Kleinstiver, *et al.* (2016) *Nature* 529(7587):490-5. doi: 10.1038/nature16526; Slaymaker, *et al.* (2016) *Science* 351(6268):84-8. doi: 10.1126/science.aad5227) (см. публикацию патента США № 2018/0087072). Замены аминокислот осуществляли в одном или более ключевых положениях в пределах каркаса цинкового пальца, который взаимодействует с фосфатным остовом ДНК (Pavletich and Pabo (1991) *Science* 252(5007):809-17; Elrod-Erickson, *et al.* (1996) *Structure* 4(10):1171-80), а также в положениях в домене FokI правой ZFN, которые также, как было предсказано, образуют фосфатные контакты.

[0223] В таблице 6 ниже представлена характеризующая информация для каждой ZFN. Начиная слева, представлен номер SBS (например, 55254) с ДНК-мишенью, с которой связывается ZFN с представленным ниже номером SBS. Затем представлены варианты дизайна аминокислот спирали распознавания для пальцев 1 – 6 или 1 – 5 (разделенный столбец 2 таблицы 6). Также в таблице 6 под соответствующими вариантами дизайна спирали представлены мутации, сделанные в последовательностях остова ZFP указанного пальца, как описано в заявке на патент США № 15/685,580. В условных обозначениях, использованных в таблице 6, «Qm5» обозначает, что в положении минус 5 (относительно спирали, которая пронумерована от -1 до +6) указанного пальца аргинин в данном положении был заменен глутамином (Q), тогда как «Qm14» обозначает, что аргинин (R), в норме присутствующий в положении минус 14, был заменен глутамином (Q). Сокращение «n», как в nQm5, обозначает, что мутация находится в N-концевом пальце модуля, состоящего из двух пальцев, который использовали для построения белка из 5 или 6 пальцев. «Отсутствует» указывает на отсутствие изменений за пределами участка спирали распознавания. Таким образом, например, SBS № 68797 содержит мутацию nQm5 в пальцах 1, 3 и 5, тогда как пальцы 2, 4 и 6 не содержат мутацию в остове цинкового пальца (например, последовательность цинкового пальца за пределами участка спирали распознавания).

[0224] Наконец, в крайнем правом столбце таблицы 6 в первой строке столбца представлен линкер, применявшийся для присоединения ДНК-связывающего домена к домену расщепления FokI (например, «L0» LRGSQLVKS (SEQ ID NO:135), который

обозначается «стандартный» линкер и описан, например, в патенте США № 9,567,609), а сайты мутаций фосфатного контакта FokI и мутаций димеризации представлены в ячейке ниже обозначения линкера. Другие линкеры включают N7c (SGAIRCHDEFWF, SEQ ID NO:136) и N7a (SGTPHEVGVYTL, SEQ ID NO:137). Более конкретно, в первой строке ячейки мутантов FokI указан тип мутации, обнаруженный в домене димеризации (например, ELD или KKR, как описано, например, в патенте США № 8,962,281). Ниже обозначений мутанта димеризации представлены любые мутации, присутствующие в домене FokI, сделанные, чтобы удалить неспецифичный фосфатный контакт, и показанные снизу (например, K525S или R416S, где остатки серина в положениях аминокислот 525 или 416 были заменены лизином или аргинином, соответственно, как описано в публикации США № 20180087072). Таким образом, например, в SBS№ 68796 линкер представляет собой линкер L0, и домен расщепления FokI содержит мутанты димеризации ELD и не содержит мутации фосфатного контакта. Далее, в случае SBS№ 68812 линкер представляет собой линкер L0, и домен расщепления FokI содержит мутации димеризации KKR, в которых домен FokI дополнительно содержит мутацию-замену R416E.

[0225] Другие варианты домена FokI, которые можно применять с ZFP, описанными в настоящем документе (включая ZFP, полученные из ZFN, описанных в настоящем документе), включают мутацию-добавление Sharkey (S418P+K441E, см. публикацию Guo, *et al.* (2010) *J. Mol Biol*, doi:10.101b/j.jmb.2010.04.060) и мутации FokI DAD и RVR (см. патент США № 8,962,281). Неограничивающие примеры сконструированных вариантов FokI, которые можно применять, включают:

- 25 • Домен расщепления FokI дикого типа (SEQ ID NO:139):

	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM	384- 433
	KVYGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD	434- 483
	EMQRYVEENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT	484- 533
	RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF	534- 579
- 30 • FokI-Sharkey (S418P+K441E, SEQ ID NO:140):

	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM	384- 433
	KVYGYRGEHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD	434- 483
	EMQRYVEENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT	484- 533
	RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF	534- 579
- 35 • FokI ELD (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, SEQ ID NO:141)

	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM	384- 433
	KVYGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD	434- 483
	EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT	484- 533
	RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF	534- 579
- 40 •

	FokI ELD, Sharkey (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E SEQ ID NO:142)	
5	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433 KVGYGRGEHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579	
10	FokI ELD, R416E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, R416E, SEQ ID NO:143)	
15	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IAENSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433 KVGYGRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579	
20	FokI ELD, Sharkey, R416E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, R416E, SEQ ID NO:144)	
25	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IAENSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433 KVGYGRGEHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579	
30	FokI ELD, R416Y (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, R416Y, SEQ ID NO:145)	
35	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IAYNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433 KVGYGRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579	
40	FokI ELD, Sharkey, R416E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, R416E, SEQ ID NO:146)	
45	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IAYNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433 KVGYGRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579	
50	FokI ELD, частично Sharkey, S418E (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, K441E, S418E, SEQ ID NO:148)	
55	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNETQDRI LEMKVMEFFM 384- 433 KVGYGRGEHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579	
60	FokI ELD, K525S (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, K525S, SEQ ID NO:149)	
65	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433 KVGYGRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FSGNYKAQLT 484- 533 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579	
	FokI ELD, Sharkey K525S (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, K525S, SEQ ID NO:150)	
	QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433 KVGYGRGEHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483	

EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FSGNYKAQLT 484- 533
 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

- 5 • FokI ELD, I479T (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, I479T, SEQ ID NO:151)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVG YRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPTGQAD 434- 483
 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 10 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI ELD, Sharkey, I479T (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, I479T, SEQ ID NO:152)
 15 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVG YRG EHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPTGQAD 434- 483
 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- 20 • FokI ELD, P478D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, P478D, SEQ ID NO:153)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVG YRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLDIGQAD 434- 483
 25 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI ELD, Sharkey, P478D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, P478D, SEQ ID NO:154)
 30 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVG YRG EHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLDIGQAD 434- 483
 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- 35 • FokI ELD, Q481D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, Q481D, SEQ ID NO:155)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 40 KVG YRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGDAD 434- 483
 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI ELD, Sharkey, Q481D (Q->E в положении 486, I->L в положении 499, N->D в положении 496, S418P+K441E, Q481D, SEQ ID NO:156)
 45 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVG YRG EHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGDAD 434- 483
 EMERYVEENQ TRDKHLNPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 50 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI KKR (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, SEQ ID NO:157)
 55 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVG YRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483
 EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI KKR Sharkey, (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, SEQ ID NO:158)
 60 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVG YRG EHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483
 EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 65 RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

- FokI KKR, Q481E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, Q481E, SEQ ID NO:159)

QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433

KVYGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGEAD 434- 483

EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533

RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI KKR, Sharkey Q481E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, Q481E, SEQ ID NO:160)

QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433

KVYGYRGEHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGEAD 434- 483

EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533

RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI KKR, R416E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, R416E, SEQ ID NO:161)

QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IAENSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433

KVYGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483

EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533

RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI KKR, Sharkey, R416E (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, R416E, SEQ ID NO:162)

QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IAENPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433

KVYGYRGEHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483

EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533

RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI KKR, K525S (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, K525S, SEQ ID NO:163)

QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433

KVYGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483

EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FSGNYKAQLT 484- 533

RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI KKR, Sharkey, K525S (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, K525S, SEQ ID NO:164)

QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433

KVYGYRGEHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483

EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FSGNYKAQLT 484- 533

RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI KKR, R416Y (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, R416Y, SEQ ID NO:165)

QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IAYNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433

KVYGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483

EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533

RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI KKR, Sharkey, R416Y (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, R416Y, SEQ ID NO:166)

QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IAYNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433

KVYGYRGEHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483

EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533

RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579
- FokI, KKR I479T (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, I479T, SEQ ID NO:167)

5 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPTGQAD 434- 483
 EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

10 • FokI, KKR Sharkey I479T (E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, S418P+K441E, I479T, SEQ ID NO:168)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPTGQAD 434- 483
 EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

15 • FokI, KKR P478D(E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, P478D, SEQ ID NO:169)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLDIGQAD 434- 483
 EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

20 • FokI, KKR Sharkey P478D(E->K в положении 490, I->K в положении 538, H->R в положении 537, P478D, SEQ ID NO:170)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLDIGQAD 434- 483
 EMQRYVKENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

25 • FokI DAD (R->D в положении 487, N->D в положении 496, I->A в положении 499, SEQ ID NO:171)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483
 EMQDYVEENQ TRDKHANPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

30 • FokI DAD Sharkey (R->D в положении 487, N->D в положении 496, I->A в положении 499, S418P+K441E, SEQ ID NO:172)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAD 434- 483
 EMQDYVEENQ TRDKHANPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNHITNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

35 • FokI RVR (D->R в положении 483, H->R в положении 537, I->V в положении 538, SEQ ID NO:173)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNSTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAR 434- 483
 EMQRYVEENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRVTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

40 • FokI RVR Sharkey (D->R в положении 483, H->R в положении 537, I->V в положении 538, S418P+K441E, SEQ ID NO:174)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAR 434- 483
 EMQRYVEENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRVTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

45 • FokI RVR Sharkey (D->R в положении 483, H->R в положении 537, I->V в положении 538, S418P+K441E, SEQ ID NO:174)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAR 434- 483
 EMQRYVEENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRVTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

50 • FokI RVR Sharkey (D->R в положении 483, H->R в положении 537, I->V в положении 538, S418P+K441E, SEQ ID NO:174)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAR 434- 483
 EMQRYVEENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRVTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

55 • FokI RVR Sharkey (D->R в положении 483, H->R в положении 537, I->V в положении 538, S418P+K441E, SEQ ID NO:174)
 QLVKSELEEK KSELRHKLKY VPHEYIELIE IARNPTQDRI LEMKVMEFFM 384- 433
 KVGYRGKHL GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG VIVDTKAYSG GYNLPIGQAR 434- 483
 EMQRYVEENQ TRNKHINPNE WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH FKGNYKAQLT 484- 533
 RLNRVTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL TLEEVRRKFN NGEINF 534- 579

[0226] Все попарные комбинации ZFN исследовали в отношении функциональности, и было обнаружено, что все они являются активными.

Таблица 6: Пары ZFN, специфичные к ТКРА

SBS № (сайт-мишень, 5'-3')	Дизайн [Последовательность спирали, SEQ ID]						Линкер
	[Мутации в остове пальца]						Мутанты Fok
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
Сайт D							
Левый партнер							
55254 5' ctCCTGA AAGTGGC CGGgttt aatctgc (SEQ ID NO:13)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	DRSHLAR (SEQ ID NO:48)	LKQHLNE (SEQ ID NO:49)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	HNSSLKD (SEQ ID NO:54)	Н/П	L0
	отсутст вует	отсутст вует	отсутств ует	отсутст вует	отсутст вует	Н/П	ELD С-конец Fok
68796 ctCCTGA AAGTGGC CGGgttt aatctgc (SEQ ID NO:13)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	DRSHLAR (SEQ ID NO:48)	LKQHLNE (SEQ ID NO:49)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	HNSSLKD (SEQ ID NO:54)	Н/П	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5s	nQm5	отсутст вует	Н/П	ELD С-конец Fok
68812 ctCCTGA AAGTGGC CGGgttt aatctgc (SEQ ID NO:13)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	DRSHLAR (SEQ ID NO:48)	LKQHLNE (SEQ ID NO:49)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	HNSSLKD (SEQ ID NO:54)	Н/П	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5s	nQm5	отсутст вует	Н/П	ELD R416E С-конец Fok
68820 ctCCTGA AAGTGGC CGGgttt aatctgc (SEQ ID NO:13)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	DRSHLAR (SEQ ID NO:48)	LKQHLNE (SEQ ID NO:49)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	HNSSLKD (SEQ ID NO:54)	Н/П	L0
	отсутст вует	отсутст вует	отсутств ует	отсутст вует	отсутст вует	Н/П	ELD S418E С-конец Fok
68876 ctCCTGA AAGTGGC CGGgttt aatctgc (SEQ ID NO:13)	RSDHLST (SEQ ID NO:47)	DRSHLAR (SEQ ID NO:48)	LKQHLNE (SEQ ID NO:49)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	HNSSLKD (SEQ ID NO:54)	Н/П	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5s	nQm5	отсутст вует	Н/П	ELD K525S С-конец Fok
Правый партнер							
55248 5' agGAT TCGGAAC CCAATCA Ctgacag gt (SEQ ID NO:14)	DQSNLRA (SEQ ID NO:42)	TSSNRKT (SEQ ID NO:43)	LQQTLD (SEQ ID NO:51)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	RREDLIT (SEQ ID NO:52)	TSSNLSR (SEQ ID NO:53)	L0
	отсутст вует	отсутст вует	отсутств ует	отсутст вует	отсутст вует	отсутст вует	KKR С-конец Fok

68797 agGATTC GGAACCC AATCACT gacaggt (SEQ ID NO:14)	DQSNLRA (SEQ ID NO:42)	TSSNRKT (SEQ ID NO:43)	LQQTLD (SEQ ID NO:51)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	RREDLIT (SEQ ID NO:52)	TSSNLSR (SEQ ID NO:53)	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	KKR С-конец Fok
68813 agGATTC GGAACCC AATCACT gacaggt (SEQ ID NO:14)	DQSNLRA (SEQ ID NO:42)	TSSNRKT (SEQ ID NO:43)	LQQTLD (SEQ ID NO:51)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	RREDLIT (SEQ ID NO:52)	TSSNLSR (SEQ ID NO:53)	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	KKR R416E С-конец Fok
68861 agGATTC GGAACCC AATCACT gacaggt (SEQ ID NO:14)	DQSNLRA (SEQ ID NO:42)	TSSNRKT (SEQ ID NO:43)	LQQTLD (SEQ ID NO:51)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	RREDLIT (SEQ ID NO:52)	TSSNLSR (SEQ ID NO:53)	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	KKR Q481E С-конец Fok
68877 agGATTC GGAACCC AATCACT gacaggt (SEQ ID NO:14)	DQSNLRA (SEQ ID NO:42)	TSSNRKT (SEQ ID NO:43)	LQQTLD (SEQ ID NO:51)	QSGNLAR (SEQ ID NO:34)	RREDLIT (SEQ ID NO:52)	TSSNLSR (SEQ ID NO:53)	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	KKR K525S С-конец Fok
Сайт E							
Левый партнер							
55266 tcAAGCT GGTCGAG aAAAGCT ttgaaac (SEQ ID NO:15)	QSSDLR (SEQ ID NO:57)	QSGNRTT (SEQ ID NO:58)	RSANLAR (SEQ ID NO:59)	DRSALAR (SEQ ID NO:33)	RSDVLSE (SEQ ID NO:60)	KHSTRRV (SEQ ID NO:61)	N7c
	отсутст вует	отсутст вует	отсутств ует	отсутст вует	отсутст вует	отсутст вует	ELD N-конец Fok
68798 tcAAGCT GGTCGAG aAAAGCT ttgaaac (SEQ ID NO:15)	QSSDLR (SEQ ID NO:57)	QSGNRTT (SEQ ID NO:58)	RSANLAR (SEQ ID NO:59)	DRSALAR (SEQ ID NO:33)	RSDVLSE (SEQ ID NO:60)	KHSTRRV (SEQ ID NO:61)	N7c
	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	ELD N-конец Fok
68846 tcAAGCT GGTCGAG aAAAGCT ttgaaac (SEQ ID NO:15)	QSSDLR (SEQ ID NO:57)	QSGNRTT (SEQ ID NO:58)	RSANLAR (SEQ ID NO:59)	DRSALAR (SEQ ID NO:33)	RSDVLSE (SEQ ID NO:60)	KHSTRRV (SEQ ID NO:61)	N7c
	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	ELD I479T N-конец Fok
Правый партнер							
53853 aaCAGGT AaGACAG GGGTCTA gcctggg (SEQ ID NO:16)	TMHQVE (SEQ ID NO:62)	TSGHLSR (SEQ ID NO:63)	RSDHLTQ (SEQ ID NO:64)	DSANLSR (SEQ ID NO:65)	QSGSLTR (SEQ ID NO:66)	AKWNLDA (SEQ ID NO:67)	L0
	отсутст вует	отсутст вует	отсутств ует	отсутст вует	отсутст вует	отсутст вует	KKR С-конец Fok

68879 aaCAGGT AaGACAG GGGTCTA gcctggg (SEQ ID NO:16)	TMHQ _{RV} E (SEQ ID NO:62)	TSGHLSR (SEQ ID NO:63)	RSDHLTQ (SEQ ID NO:64)	DSANLSR (SEQ ID NO:65)	QSGSLTR (SEQ ID NO:66)	AKWNLDA (SEQ ID NO:67)	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	KKR K525S С-конец Fok
68815 aaCAGGT AaGACAG GGGTCTA gcctggg (SEQ ID NO:16)	TMHQ _{RV} E (SEQ ID NO:62)	TSGHLSR (SEQ ID NO:63)	RSDHLTQ (SEQ ID NO:64)	DSANLSR (SEQ ID NO:65)	QSGSLTR (SEQ ID NO:66)	AKWNLDA (SEQ ID NO:67)	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	KKR R416E С-конец Fok
68799 aaCAGGT AaGACAG GGGTCTA gcctggg (SEQ ID NO:16)	TMHQ _{RV} E (SEQ ID NO:62)	TSGHLSR (SEQ ID NO:63)	RSDHLTQ (SEQ ID NO:64)	DSANLSR (SEQ ID NO:65)	QSGSLTR (SEQ ID NO:66)	AKWNLDA (SEQ ID NO:67)	L0
	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	nQm5	отсутст вует	KKR С-конец Fok

[0227] Гены, кодирующие ZFN для каждого сайта, клонировали в плазмиду экспрессии в виде левого и правого партнеров, разделенных саморасщепляемым пептидом 2A, в комбинациях для каждого сайта-мишени. мРНК, кодирующие ZFN, получали с применением стандартных методов транскрипции *in vitro*. Затем активированные Т-клетки (через 3 дня после активации) обрабатывали различными мРНК в 3 различных дозах (12, 6 или 3 мкг в 100 мкл, 3Е6 Т-клеток) методом электропорации. Через 4 дня после электропорации клетки анализировали в отношении расщепления в сайтах-мишенях и в сайте-мишени. Данные представлены ниже в двух таблицах (по одной для каждого сайта-мишени).

Таблица 7а: Целевое и нецелевое расщепление в Сайте D

	САЙТ D	55254-- 2A- 55248	68796- 2A- 68813	68813- 2A-68796	68796- 2A-68861	68861 -2A- 68796	68812-2A- 68813	68813- 2A- 68812	68876- 2A- 68877	68877- 2A- 68876	Контроль
Целевое	12 мкг	96,7	99,3	98,8	99,4	99,3	99,9	99,9	99,2	99,1	0,12
	6 мкг	98,5	99,2	99,1	99,4	99,4	99	98,9	99,3	99,2	0,14
	3 мкг	96	99,1	98,8	99,3	98,9	98,3	97,8	98,7	99,3	0,15
Нецелевое D1	12 мкг	39,6	0,29	0,35	0,21	0,18	0,25	0,25	0,2	0,2	0,28
	6 мкг	18	0,25	0,3	0,25	0,2	0,28	0,22	0,29	0,23	0,34
	3 мкг	7,3	0,28	0,24	0,46	0,26	0,24	0,27	0,22	0,25	0,26
12 мкг	сумма нецелевого	42,22	1,67	1,53	3,17	1,19	1,46	1,74	1,33	2,05	1,28
	целевое/ нецел	2,3	59	65	31	84	68	57	75	48	0,09

	евого										
6 мкг	сумма нецелевого	19,14	5,94	1,53	1,53	1,06	1,28	1,36	1,3	1,32	1,22
	целевое /нецелевое	5,1	17	65	65	94	77	73	76	75	0,12
3 мкг	сумма нецелевого	8,28	4,3	1,18	1,56	1,29	1,22	1,54	1,21	8,13	1,2
	целевое/ нецелевое	12	23	83	63	77	81	63	82	12	0,13
сумма нецелевого		69,63	11,91	4,23	6,26	3,54	3,96	4,64	3,84	11,5	3,7
Среднее целевое/ нецелевое		6,3	33	71	53	85	75	65	77	45	0,11

Таблица 7b: Целевое и нецелевое расщепление в Сайте Е

	САЙТ Е	55266- 2А-53853	55266- 2А-68815	68815- 2А-55266	55266- 2А-68879	68879- 2А-55266	68798- 2А-68815	68815- 2А-68798	68846- 2А-53853	53853- 2А-68846	Сайт Е контроль
Целевое	12 мкг	96,7	97,6	86,5	96,3	95,5	97,5	96,4	96,5	97	0,19
	6 мкг	95,3	94,6	81,3	95,2	91,5	96,5	97,2	94,4	Н/П	0,34
	3 мкг	95,3	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,17
Нецелевое Е1	12 мкг	1,24	0,32	0,23	0,24	0,3	0,23	0,27	0,19	0,21	0,29
	6 мкг	0,79	0,23	0,24	0,27	0,25	0,22	0,22	0,18	0,23	0,25
	3 мкг	0,5	0,26	0,18	0,2	0,23	0,2	0,23	0,23	0,23	0,26
Нецелевое Е2	12 мкг	19,69	1,05	0,51	0,95	1,04	0,37	0,36	0,18	0,23	0,24
	6 мкг	11,09	Н/П	0,34	0,67	0,69	0,31	0,26	0,17	0,22	0,17
	3 мкг	4,05	0,36	0,28	0,34	0,33	0,24	0,26	0,23	0,22	0,13
Нецелевое Е3	12 мкг	4,32	0,14	0,19	0,4	0,19	0,17	0,19	0,18	0,16	0,19
	6 мкг	1,33	0,13	0,13	0,21	0,17	0,19	0,14	0,11	0,19	0,21
	3 мкг	0,47	0,13	0,15	0,2	0,18	0,14	0,15	0,12	0,1	0,14
12 мкг	Сумма нецелевого	25,24	1,51	0,93	1,59	1,53	0,77	0,82	0,54	0,6	0,71
	целевое/ нецелевое	3,8	65	93	61	62	127	117	177	161	0,27
6 мкг	Сумма нецелевого	13,21	0,36	0,72	1,15	1,11	0,72	0,61	0,46	0,64	0,63
	целевое/ нецелевое	7,2	261	113	83	82	135	160	204	Н/П	0,54
3 мкг	Сумма нецелевого	5,02	0,74	0,61	0,74	0,74	0,57	0,64	0,58	0,55	0,52
	целевое/ нецелевое	18,98	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,32
Сумма нецелевого		43,47	2,62	2,26	3,48	3,38	2,06	2,07	1,59	1,79	1,86
Среднее целевое/ нецелевое		10	163	103	72	72	131	139	191	161	0,38

[0228] Таким образом, после модификаций реагирующие ZFN сохраняли превосходную целевую разрезающую активность, при этом активность нецелевого расщепления часто снижалась до фонового уровня (сравните, например, активность

5 целевого расщепления родительской пары 55254/55248 с модифицированной парой 68861/68796, которые демонстрируют 96,7 и 99,3 процентов целевого расщепления в насыщающих дозах 12 мкг, соответственно, при этом также обладают суммарной нецелевой активностью в данной дозе, составляющей 42,22 процентов в родительской

10 паре и 1,19% в модифицированной паре – аналогично уровню контроля, который составляет 1,28).

[0229] Что касается ZFN для ТРАК, аминокислоты, потенциально образующие фосфатный контакт, модифицировали в домене FokI белков B2M. Иллюстративные модификации компонентов ZFP («вариантов дизайна») представлены ниже в таблице

15 8.

Таблица 8: Оптимизация B2M-специфичных ZFN

SBS № (сайт-мишень, 5'–3')	Дизайн [Последовательность спирали, SEQ ID]						Линкер
	[Мутации в осто́ве пальца]						Мутанты Fok
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
SBS5753 1 5' gaGTAGC GcGAGCA CAGCtaa ggccacg (SEQ ID NO:126)	AQCCLF H (SEQ ID NO:128)	DQSNLR A (SEQ ID NO:42)	RSANLTR (SEQ ID NO:129)	RSDDLTR (SEQ ID NO:130)	QSGSLT R (SEQ ID NO:66)	Н/П	N6a KKR N- конец Fok
SBS6895 7 5' gaGTAGC GcGAGCA CAGCtaa ggccacg (SEQ ID NO:126)	AQCCLF H (SEQ ID NO:128)	DQSNLR A (SEQ ID NO:42)	RSANLTR (SEQ ID NO:129)	RSDDLTR (SEQ ID NO:130)	QSGSLT R (SEQ ID NO:66)	Н/П	N6a
	отсутс твует	отсутс твует	Отсутст вует	отсутст вует	отсутс твует	Н/П	KKR K525S N- конец Fok
SBS7267 8 5' gaGTAGC GcGAGCA CAGCtaa ggccacg (SEQ ID NO:126)	AQCCLF H (SEQ ID NO:128)	DQSNLR A (SEQ ID NO:42)	RSANLTR (SEQ ID NO:129)	RSDDLTR (SEQ ID NO:130)	QSGSLT R (SEQ ID NO:66)	Н/П	N6a
	отсутс твует	отсутс твует	Отсутст вует	отсутст вует	отсутс твует	Н/П	KKR R416Y N-

NO:126)							конец Fok
SBS5707 1 gcCACGG AgCGAGA CATCTCG gcccga (SEQ ID NO:127)	RSDDL K (SEQ ID NO:131)	DSSARK K (SEQ ID NO:132)	DRSNLSR (SEQ ID NO:22)	QRTHLRD (SEQ ID NO:133)	QSGHLA R (SEQ ID NO:29)	DSSNREA (SEQ ID NO:134)	LO ELD с- конец Fok
SBS7273 2 gcCACGG AgCGAGA CATCTCG gcccga (SEQ ID NO:127)	RSDDL K (SEQ ID NO:131)	DSSARK K (SEQ ID NO:132)	DRSNLSR (SEQ ID NO:22)	QRTHLRD (SEQ ID NO:133)	QSGHLA R (SEQ ID NO:29)	DSSNREA (SEQ ID NO:134)	LO
	отсутс твует	отсутс твует	Отсутст вует	отсутст вует	отсутс твует	отсутс твует	ELD P478D с- конец Fok
SBS7274 8 gcCACGG AgCGAGA CATCTCG gcccga (SEQ ID NO:127)	RSDDL K (SEQ ID NO:131)	DSSARK K (SEQ ID NO:132)	DRSNLSR (SEQ ID NO:22)	QRTHLRD (SEQ ID NO:133)	QSGHLA R (SEQ ID NO:29)	DSSNREA (SEQ ID NO:134)	LO
	отсутс твует	отсутс твует	Отсутст вует	отсутст вует	отсутс твует	Н/П	ELD Q481D с- конец Fok

[0230] Модифицированные реагирующие с B2M ZFN исследовали в отношении активности, как описано выше, и анализировали фенотипический нокаут в анализе FACs с применением антитела, специфичного к HLA. Было обнаружено, что все попарные комбинации (57531/57071; 57531/72732; 57531/72748; 68957/57071; 68957/72732; 68957/72748; 72678/57071; 72678/72732; 72678/72748) были активными, и иллюстративные результаты для указанных пар показаны ниже в таблице 9 и демонстрируют, что модифицированные варианты являются активными.

10 **Таблица 9: Фенотипический анализ B2M-специфичных ZFN**

Пара ZFN (мРНК 2A)	Концентрация ZFN (мкг/мл)			
	30	60	90	120
	% Инсерционно-делеционных мутаций			
57071/68957	74	79	83	81
72732/57531	83	86	87	85
72732/72678	86	н.и.	н.и.	87
72748/68957	37	н.и.	н.и.	80

н.и.: не исследовали.

[0231] Также проводили анализ целевого и нецелевого связывания с применением MiSeq для каждой из пар, перечисленных выше в таблице 9. Результаты для каждой пары представлены ниже в таблицах 10А - 10D и демонстрируют, что данные реагирующие ZFP являются в высокой степени специфичными.

Таблица 10А: Анализ нецелевого связывания для пары 57071/68957

	ZFP		GFP			
57071/68957	Откорректи- рованный	Исход- ный	Откорректиро- ванный	Исход- ный	р- значение	курация
Мишень	91,64	91,94	0,19	0,25	0,00	положительная
ОТ1	0,08	0,39	0,04	0,35	0,12	отрицательная
ОТ2	0,03	0,33	0,01	0,24	0,06	отрицательная
ОТ3	0,08	1,22	0,03	1,00	0,05	отрицательная
ОТ4	0,02	0,16	0,03	0,14	1,00	отрицательная
ОТ5	0,04	0,48	0,02	0,41	1,00	отрицательная
ОТ6	0,04	0,27	0,03	0,22	1,00	возможная
ОТ7	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
ОТ8	0,02	0,18	0,02	0,13	1,00	отрицательная
ОТ9	0,04	0,72	0,06	0,58	1,00	отрицательная
ОТ10	0,03	0,15	0,03	0,12	1,00	отрицательная

10

Таблица 10В: Анализ нецелевого связывания для пары 72732/57531

	ZFP		GFP			
72732/57531	Откорректи- рованный	Исходный	Откорректи- рованный	Исходный	р- значение	курация
Мишень	95,75	96,88	0,25	0,31	0,00	положительная
ОТ1	0,03	0,26	0,02	0,26	1,00	отрицательная
ОТ2	0,08	0,52	0,06	0,41	1,00	отрицательная
ОТ3	0,06	0,19	0,05	0,21	1,00	отрицательная
ОТ4	0,06	0,47	0,04	0,40	1,00	отрицательная
ОТ5	0,03	0,19	0,02	0,19	1,00	отрицательная
ОТ6	0,02	0,77	0,02	0,84	1,00	отрицательная
ОТ7	0,04	0,98	0,06	0,79	1,00	отрицательная
ОТ8	0,07	7,42	0,07	7,45	1,00	отрицательная
ОТ9	0,02	0,14	0,02	0,16	1,00	отрицательная
ОТ10	0,03	0,27	0,03	0,28	1,00	отрицательная

Таблица 10С: Анализ нецелевого связывания для пары 72732/72678

	ZFP		GFP			
72732/72678	Откорректиро- ванный	Исходный	Откорректиро- ванный	Исходный	р- значение	курация
Мишень	94,76	95,23	0,17	0,21	0,00	положительная
OT1	0,09	0,48	0,02	0,36	0,00	отрицательная
OT2	0,05	0,37	0,02	0,39	0,43	возможная
OT3	0,03	0,28	0,03	0,19	1,00	отрицательная
OT4	0,02	0,18	0,01	0,15	1,00	отрицательная
OT5	0,01	0,09	0,03	0,11	1,00	отрицательная
OT6	0,09	0,42	0,03	0,41	0,00	отрицательная
OT7	1,02	17,40	2,35	19,23	1,00	отрицательная
OT8	0,07	0,71	0,04	0,58	1,00	отрицательная
OT9	0,02	0,21	0,05	0,20	1,00	отрицательная
OT10	0,03	0,25	0,02	0,18	1,00	отрицательная

Таблица 10D: Анализ нецелевого связывания для пары 72748/68957

	ZFP		GFP			
72748/68957	Откорректиро- ванный	Исходный	Откорректиро- ванный	Исходный	р- значение	курация
Мишень	93,39	93,50	0,16	0,20	0,00	положительная
OT1	0,05	0,30	0,02	0,24	0,69	отрицательная
OT2	0,02	0,14	0,02	0,14	1,00	отрицательная
OT3	0,05	2,24	0,04	2,29	1,00	отрицательная
OT4	0,02	0,33	0,03	0,31	1,00	отрицательная
OT5	0,05	7,57	0,07	7,21	1,00	отрицательная
OT6	0,03	1,03	0,03	1,03	1,00	отрицательная
OT7	0,76	1,86	0,59	1,79	1,00	отрицательная
OT8	0,02	0,14	0,02	0,13	1,00	отрицательная
OT9	0,03	0,23	0,03	0,29	1,00	отрицательная
OT10	0,33	94,52	0,29	94,49	1,00	отрицательная

[0232] Модифицированные ТРАК- и В2М-специфичные ZFN исследовали в комбинации и оценивали в отношении эффективности нокаута, в анализе Miseq и в фенотипическом анализе, исследуя количества CD3⁺ или HLA⁺ клеток в анализе FACs. Анализ проводили на Т-клетках с применением двух различных концентраций добавленной кодирующей ZFN мРНК (90 мкг/мл или 120 мкг/мл). Результаты представлены ниже в таблице 11 и демонстрируют, что данные реагирующие ZFN являются в высокой степени эффективными.

Таблица 11: Расщепление ТРАК/В2М

Реагирующие ZFN (мРНК 2A)	Фенотипический скрининг	Анализ Miseq
---------------------------	-------------------------	--------------

68846-2A-53853 (ТРАК), мкг/мл	72732-2A-72678 (B2M), мкг/мл	%CD3-отриц.	%HLA-I- отриц.	% инсерционно- делеционных мутаций ТРАК	% инсерционно- делеционных мутаций B2M
0	30	-	86	-	95
60	0	98	-	92	-
90	90	95	86	90	95
120	90	94	86	90	94
90	120	94	86	90	95
120	120	95	87	91	95

[0233] Реагирующие ZFN также исследовали в комбинации в присутствии или при отсутствии донорной конструкции GFP, запускаемой промотором PGK. В таблице 12 представлены результаты анализа, когда вставку вводили в расщепленный локус B2M или ТРАК. В каждом случае донор PGK-GFP доставляли с помощью AAV6, и он содержал плечи гомологии, причем гомология фланкировала сайты разрезания ТРАК или B2M. Применяемая конструкция ТРАК-специфичной пары ZFN представляла собой 68846-2A-53853, тогда как конструкция для B2M-специфичной пары представляла собой 72732-2A-72678.

10

Таблица 12: Активность двойного нокаута на двух донорах Т-клеток.

Донор Т-клеток №1			Донор Т-клеток №2		
Образец	Целевой локус	% инсерционно- делеционных мутаций	Образец	Целевой локус	% инсерционно- делеционных мутаций
Имитация	B2M	0,3	Имитация	B2M	0,04
ТРАК + B2M	B2M	84,14	ТРАК + B2M	B2M	75,33
ТРАК + B2M PGK- GFP	B2M	83,55	ТРАК + B2M PGK- GFP	B2M	80,96
Имитация	ТРАК	0,08	Имитация	ТРАК	0,38

ТРАК + B2M	ТРАК	88,05	ТРАК + B2M	ТРАК	85,09
ТРАК + B2M PGK- GFP	ТРАК	78,94	ТРАК + B2M PGK- GFP	ТРАК	74,54

[0234] Таким образом, оптимизированные пары ZFN, специфичные в отношении B2M, конструировали путем выбора варианта FokI (см. выше) в сочетании с ДНК-связывающим доменом ZFP.

- 5 **[0235]** Оптимизированные аминокислотные последовательности для ДНК-связывающего домена для ZFN B2M 72732 и 72678 представлены ниже:

72732 N-конец:

RPFQCRICMRNFSRSDDL SKHIRTHTGEKPFACDICGRKFADSSARKKHTKIHTGEKP
10 FQCRICMRNFSDRSNLSRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRTHLRDHTKIHTHPRAPIP
KPFQCRICMRNFSQSGHLARHIRTHTGEKPFACDICGRKFADSSNREAHTKIH (SEQ
ID NO:175)

72678 C-конец:

RPFQCRICMRKFAAQCCLFHHTKIHTGEKPFQCRICMRNFSDQSNLRAHIRTHTGEKP
15 FACDICGRKFARSANLTRHTKIHTHPRAPIPKPFQCRICMRNFSRSDDLTRHIRTHTGE
KPFACDICGRKFAQSGSLTRHTKIH (SEQ ID NO:176)

- [0236]** Также получали дополнительные ZFN, содержащие модифицированные ZFP из ZFN, описанных в настоящем документе (например, SEQ ID NO:175 и SEQ ID
20 NO:176), с применением различных FokI и/или линкерных доменов.

[0237]

- [0238]** Аналогично конструировали оптимизированные пары ZFN, специфичных в отношении ТРАК, путем выбора варианта FokI (см., например, выше) в сочетании с ДНК-связывающим доменом ZFP. Оптимизированные аминокислотные
25 последовательности для ДНК-связывающего домена для ZFN B2M 68846 и 53853 представлены ниже:

68846 C-конец:

RPFQCRICMQNFSQSSDL SRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSGNRTTHTKIHTHPRAP

IPKPFQCRICMQNFSRSANLARHIRTHTGEKPFACDICGRKFADRSALARHTKIHTGS
QKPFQCRICMQNFSRSDVLSEHIRTHTGEKPFACDICGRKFAKHSTRRVHTKIH (SEQ
ID NO:177)

53853 N-конец:

- 5 RPFQCRICMRNFMHQRVEHIRTHTGEKPFACDICGRKFATSGHLRHTKIHTGSQK
PFQCRICMRNFSRSDHLTQHIRTHTGEKPFACDICGRKFADSANLSRHTKIHTHPRAPI
PKPFQCRICMRNFSQSGSLTRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAAKWNLDAHTKIH SEQ
ID NO:178).

[0239] ZFN можно было собрать с ДНК-связывающим доменом, N-концевым
10 для домена FokI, причем линкерная последовательность между ДНК-связывающим
доменом и доменом FokI представляла собой линкер L0: LRGS. В качестве
альтернативы, если ZFN был собран так, что домен FokI являлся N-концевым для
ДНК-связывающего домена, применявшийся линкер представлял собой линкер N7с:
SGAIRCHDEFWF (SEQ ID NO:179).

- 15 **[0240]** В конструкции добавляли дополнительные элементы, включая 3-кратную
метку FLAG в N-концевом участке (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK, SEQ ID
NO:180) и последовательность ядерной локализации (PKKKRKV, SEQ ID NO:181).

[0241] Помимо этого, в некоторых конструкциях последовательности,
кодирующие пару ZFN, представляющую интерес, связаны в одной
20 последовательности ДНК, в которой открытые рамки считывания для каждого ZFN-
партнера отделены последовательностью 2A. Такая последовательность ДНК для
68846-2A-53853 представлена ниже:

5' ATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGATGGCCCCAAG
AAGAAGAGGAAGGTCTGGCATCCACGGGGTACCCGCCGCTATGGGACAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGAAGTCCGA
25 GCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGGAACAGCACCCAGGACCGCATCC
TGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAGCCTGACGGC
GCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCGATTACGGCGTGATCGTGGACACAAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAATCTGCCTAC
CGGCCAGGCCGACGAGATGGAGAGATACGTGGAGGAGAACCAGACCCGGGATAAGCACCTCAACCCCAACGAGTGGTGAAGG
TGTAACCTAGCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCGTGAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGG
30 CTGAACCACATCACCAACTGCAATGGCGCCGTGCTGAGCGTGGAGGAGCTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAAGCCGGCAC
CCTGACACTGGAGGAGGTGCGGCGCAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCAGCGGCGCCATCAGATGCCACGACGAGTTCT
GGTTCAGGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCAGAACTTCAGTCAGTCTCCGACCTGTCCCGCCACATCCGCACCCACACC
GGCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCAGTCCGGCAACCGCACCCACCATACCAAGATACACAC
GCATCCAGGGCACCTATTCCCAAGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCAGAACTTCAGTCGCTCCGCCAACCTGGCCCGCC
35 ACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCGACCGCTCCGCCCTGGCCCGC
CATACCAAGATACACACGGGATCTCAGAAGCCCTTCCAGTGTGCAATCTGCATGCAGAACTTCAGTCGCTCCGACGTGCTGTC
CGAGCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCAAGCACTCCACCCGCC
GCGTGCATACCAAGATACACCTGCGGCAGAAAGACAGATCTGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACCTGCGGTGAC

GTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGACCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGA
TGACGATGACAAGATGGCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGCGCATTCATGGGGTACCCGCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCC
AGTGTGGAATCTGCATGCGTAACTTCAGTACCATGCACCAGCGCGTGGAGCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCTTTC
GCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCACCTCCGGCCACCTGTCCCGCCATACCAAGATACACACGGGCAGCCAAAAGCC
5 CTTCAGTGTGGAATCTGCATGCGTAACTTCAGTGCCTCCGACCACCTGACCCAGCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAGC
CTTTTGCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCGACTCCGCCAACCTGTCCCGCCATACCAAGATACACACGCACCCGCGC
GCCCCGATCCCGAAGCCCTTCCAGTGTGGAATCTGCATGCGTAACTTCAGTGCCTCCGCGCTCCCTGACCCGCCACATCCGCAC
CCACACCGGCGAGAAGCCTTTTGCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCGCCAAGTGGAACCTGGACGCCCATACCAAGA
TACACCTGCGGGGATCCAGCTGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCC
10 CACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCAGGAACAGCACCCAGGACCGCATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCAT
GAAGGTGTACGGCTACAGGGGAAAGCACCTGGGCGGAAGCAGAAAGCCTGACGGCGCCATCTATACAGTGGGCAGCCCCATCG
ATTACGGCGTGATCGTGGACACAAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAATCTGCCTATCGGCCAGGCCGACGAGATGCAGAGATAC
GTGAAGGAGAACCAGACCCGGAATAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGAAGGTGTACCCTAGCAGCGTGACCGAGTTCAA
GTTCTGTTCGTGAGCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCGCAAAACCAACTGCAATGGCG
15 CCGTGCTGAGCGTGAGGAGCTGCTGATCGGCGCGAGATGATCAAAGCCGGCACCTGACACTGGAGGAGGTGCGGCGCAAG
TTCAACAACGGCGAGATCAACTTCTGATAA (SEQ ID NO:182).

[0242] Аминокислотная последовательность открытой рамки считывания 68846-2A-53853 представляет собой:

• MDYKDHDGDY KDHDIDYKDD DDKMAPKKKR KVGIGHVPAA MGQLVKSELE EKKSELRHKL 1-60
20 KYVPEHYIEL IEIARNSTQD RILEMKVMEF FMKVYGYRGK HLGGSRKPDG AIYTVGSPID 61-120 YGVIVDTKAY
SGGYNLPTGQ ADEMERYVEE NQTRDKHLNP NEWWKVYPSS VTEFKFLFVS 121-180 GHFKGNYKAQ
LTRLNHITNC NGAVLSVEEL LIGGEMIKAG TLLEEVRRK FNNGEINFSG 181-240 AIRCHDEFWF
RPFQCRICMQ NFSQSSDLR HIRTHTEKPF FACDICGRKF AQSGNRTTHT 241-300 KIHTHPRAPI
PKPFQCRICM QNFSRSANLA RHIRTHTEK PFACDICGRK FADRSALARH 301-360 TKIHTGSQKP
25 FQCRICMQNF SRSDVLSEHI RTHTEKPFAC DICGRKFAK HSTRRVHTKI 361-420 HLRQKDRSGG
GEGRGSLLTC GDVEENPGPR TMDYKDHDGD YKDHDIDYKD DDKMAPKKK 421-480 RKVGIGHVPA
AMAERPFOCR ICMRNFSMTM QRVEHIRTHTEKPFACDIC GRKFATSGHL 481-540 SRHTKIHTGS
QKPFQCRICM RNFSRSDHLT QHIRTHTEK PFACDICGRK FADSANLSRH 541-600 TKIHTHPRAP
IPKPFQCRIC MRNFSQSGSL TRHIRTHTEG KPFACDICGR KFAAKWNLDA 601-660 HTKIH¹LRGSQ
30 LVKSELEEKK SELRHKLKYV PHEYIELIEI ARNSTQDRIL EMKVMEFFMK 661-720 VYGYRGKHLG
GSRKPDGAIY TVGSPIDYGV IVDTKAYSGG YNLPIGQADE MQRYVKENQT 721-780 RNKHINPNEW
WKVYPSSVTE FKFLFVSGHF KGNKYAQLTR LNRKTNCNGA VLSVEELLIG 781-840 GEMIKAGTLT
LEEVRRKFNN GEINF (SEQ ID NO:183) 841-865

35 **[0243]** Элементы данного полипептида представлены ниже в таблице 13.

Таблица 13: Элементы последовательности пептида 68846-2A-53853

Элемент	Обозначение	Расположение (в пределах SEQ ID NO:183)	

3-кратная последовательность FLAG	<u>xx</u>	2-23	
Последовательность ядерной локализации	<u>xx</u>	26-32	
Домен ELD I479T FokI	xx	43- 238	
Линкер N7c	<i>xx</i>	239-250	
68846 ДНК-связывающий домен	<u>xx</u>	251-421	
Линкер 2A	<u>xx</u>	432- 449	
3-кратная последовательность FLAG	<u>xx</u>	452- 474	
Последовательность ядерной локализации	<u>xx</u>	477- 483	
53853 ДНК-связывающий домен	<u>xx</u>	495- 665	
Линкер L0	<i>xx</i>	666-669	
Домен KKR FokI	xx	670-865	

[0244] Последовательность для открытой рамки считывания 72732-2A-72678 представлена ниже:

• ATGGAC TACA AAGACCATGA CGGTGATTAT AAAGATCATG ACATCGATTA CAAGGATGAC GATGACAAGA

5 TGCCCCCA GAAGAAGAGG AAGGTGCGCA TCCACGGGGT ACCCGCCGCT ATGGCTGAGA GGCCCTTCCA

GTGTGCAATC TGCATGCGTA ACTTCAGTCG TAGTGACGAC CTGAGCAAGC ACATCCGCAC CCACACAGGC

GAGAAGCCTT TTGCCTGTGA CATTTGTGGG AGGAAATTTG CCGACAGCAG CGCCCGCAAA AAGCATACCA

AGATACACAC GGGCGAGAAG CCCTTCCAGT GTCGAATCTG CATGCGTAAC TTCAGTGACC GCTCCAACCT

GTCCCGCCAC ATCCGCACCC ACACCGGCGA GAAGCCTTTT GCCTGTGACA TTTGTGGGAG GAAATTTGCC

10 CAGCGCACCC ACCTGCGCGA CCATACCAAG ATACACACGC ACCCGCGCGC CCCGATCCCG AAGCCCTTCC

AGTGTCGAAT CTGCATGCGT AACTTCAGTC AGTCCGGCCA CCTGGCCCGC CACATCCGCA CCCACACCGG

CGAGAAGCCT TTTGCCTGTG ACATTTGTGG GAGGAAATTT GCCGACTCCT CCAACCGCGA GGCCCATACC

AAGATACACC TGCGGGGATC CCAGCTGGTG AAGAGCGAGC TGGAGGAGAA GAAGTCCGAG CTGCGGCACA

AGCTGAAGTA CGTGCCCCAC GAGTACATCG AGCTGATCGA GATCGCCAGG AACAGCACCC AGGACCGCAT

15 CCTGGAGATG AAGGTGATGG AGTTCTTCAT GAAGGTGTAC GGCTACAGGG GAAAGCACCT GGGCGGAAGC

AGAAAGCCTG ACGGCGCCAT CTATACAGTG GGCAGCCCCA TCGATTACGG CGTGATCGTG GACACAAAGG

CCTACAGCGG CGGCTACAAT CTGGACATCG GCCAGGCCGA CGAGATGGAG AGATACGTGG AGGAGAACCA

GACCCGGGAT AAGCACCTCA ACCCAACGA GTGGTGGAAG GTGTACCCTA GCAGCGTGAC CGAGTTCAAG

TTCTGTTCG TGAGCGGCCA CTTCAAGGGC AACTACAAGG CCCAGCTGAC CAGGCTGAAC CACATCACCA

20 ACTGCAATGG CGCCGTGCTG AGCGTGAGG AGCTGCTGAT CGGCGGCGAG ATGATCAAAG CCGGCACCCT

GACACTGGAG GAGGTGCGGC GCAAGTTCAA CAACGGCGAG ATCAACTTCA GATCTGGCGG CGGAGAGGGC

AGAGGAAGTC TTCTAACCTG CGGTGACGTG GAGGAGAATC CCGGCCCTAG GACCATGGAC TACAAAGACC
 ATGACGGTGA TTATAAAGAT CATGACATCG ATTACAAGGA TGACGATGAC AAGATGGCCC CCAAGAAGAA
 GAGGAAGGTC GGCATTCATG GGGTACCCGC CGCTATGGGA CAGCTGGTGA AGAGCGAGCT GGAGGAGAAG
 AAGTCCGAGC TGCGGCACAA GCTGAAGTAC GTGCCCCACG AGTACATCGA GCTGATCGAG ATCGCCTACA
 5 ACAGCACCCA GGACCGCATC CTGGAGATGA AGGTGATGGA GTTCTTCATG AAGGTGTACG GCTACAGGGG
 AAAGCACCTG GCGGGAAGCA GAAAGCCTGA CCGCGCCATC TATACAGTGG GCAGCCCCAT CGATTACGGC
 GTGATCGTGG ACACAAAGGC CTACAGCGGC GGCTACAATC TGCCTATCGG CCAGGCCGAC GAGATGCAGA
 GATACGTGAA GGAGAACCAG ACCCGGAATA AGCACATCAA CCCCACGAG TGGTGAAGG TGTACCCTAG
 CAGCGTGACC GAGTTCAAGT TCCTGTTTCGT GAGCGGCCAC TTCAAGGGCA ACTACAAGGC CCAGCTGACC
 10 AGGCTGAACC GAAAAACCAA CTGCAATGGC GCCGTGCTGA GCGTGGAGGA GCTGCTGATC GCGGCGGAGA
 TGATCAAAGC CGGCACCCCTG AACTGGAGG AGGTGCGGCG CAAGTTCAAC AACGGCGAGA TCAACTTCAG
 CGGCGCTCAG GGATCTACCC TGGACTTTAG GCCCTTCCAG TGTGCAATCT GCATGCGTAA GTTTGCCGCC
 CAGTGTGTGTC TGTTCCACCA TACCAAGATA CACACGGGCG AGAAGCCCTT CCAGTGTGCA ATCTGCATGC
 GTAACCTTCAG TGACCAGTCC AACCTGCGCG CCCACATCCG CACCCACACC GCGGAGAAGC CTTTGCCTG
 15 TGACATTTGT GGGAGGAAAT TTGCCCGCTC CGCCAACCTG ACCCGCCATA CCAAGATACA CACGCACCCG
 CCGCGCCCGA TCCCGAAGCC CTTCAGTGT CGAATCTGCA TGCGTAACTT CAGTCGCTCC GACGACCTGA
 CCCGCCACAT CCGCACCCAC ACCGGCGAGA AGCCTTTTGC CTGTGACATT TGTGGGAGGA AATTTGCCCA
 GTCCGGCTCC CTGACCCGCC ATACCAAGAT ACACCTGCGG CAGAAGGACT GATAA (SEQ ID NO:184)

20 **[0245]** Аминокислотная последовательность открытой рамки считывания
 72732-2A-72678 представлена ниже.

MDYKDHDGDY KDHDIDYKDD DDKMAPKKKR KVGIHGVPA MAERPFQCRI CMRNFSRSDD 1-60 LSKHIRTHTG
 EKPFCADICG RKFADSSARK KHTKIHTGEK PFQCRICMRN FSDRSNLSRH 61-120 IRTHTGEKPF ADCICGRKFA
 QRTHLRDHTK IHTHPRAPIP KPFQCRICMR NFSQSGHLAR 121-180 HIRTHTGEKP FACDICGRKE
 25 ADSSNREAHT KIHLLRGSQLV KSELEEKKSE LRHKLKYVPH 181-240 EYIELIEIAR NSTQDRILEM
 KVMEFFMKVY GYRGKHLGGS RKP DGAIYTV GSPIDYGVIV 241-300 DTKAYSGGYN LDIGQADEME
 RYVEENQTRD KHLNPNEWK VYPSSVTEFK FLFVSGHFKG 301-360 NYKAQLTRLN HITNCNGAVL
 SVEELLIGGE MIKAGTLTLE EVRRKFNGE INFRRSGGEG 361-420 RGSLLTCGDV EENPGPRTMD
 YKDHDGDYKD HDIDYKDDDD KMAPKKRKV GIHGVPAAMG 421-480 QLVKSELEEK KSELRHKLKY
 30 VPHEYIELIE IAYNSTQDRI LEMKVMEFFM KVG YRGKHL 481-540 GGSRKPDGAI YTVGSPIDYG
 VIVDTKAYSG GYNLPIQAD EMQRYVKENQ TRNKHINPNE 541-600 WWKVYPSSVT EFKFLFVSGH
 FKGNKYAQLT RLNRKTNCNG AVLSVEELLI GGEMIKAGTL 601-660 TLEEVRRKFN NGEINFSGAQ
 GSTLDFRPFO CRICMRKFAA QCCLFHHTKI HTGEKPFQCR 661-720 ICMRNFSQS NLRAHIRTHT
 GEKPFACDIC GRKFARSANL TRHTKIHTHP RAPIKPFQOC 721-780 RICMRNFSRS DDLTRHIRT
 35 TGEKPFACDI CGRKFAQSGS LTRHTKIHLR QKD 781-833
 (SEQ ID NO:185)

[0246] Элементы аминокислотной последовательности 72732-2A-72678
 представлены ниже в таблице 14.

40 **Таблица 14: Элементы аминокислотной последовательности 72732-2A-72678**

Элемент	Обозначение	Расположение (в пределах
---------	-------------	-----------------------------

		SEQ ID NO:183)
3-кратная последовательность FLAG	<u>xx</u>	2-23
Последовательность ядерной локализации	<u>xx</u>	26-32
72732 ДНК-связывающий домен	<u>xx</u>	44- 213
Линкер L0	xx	214-217
Домен ELD P478D FokI	xx	218-413
Линкер 2A	<u>xx</u>	419- 436
3-кратная последовательность FLAG	<u>xx</u>	440- 461
Последовательность ядерной локализации	<u>xx</u>	464- 470
Домен KKR R416Y FokI	xx	481- 676
Линкер N6a	xx	677-686
72678 ДНК-связывающий домен	<u>xx</u>	687-828

Пример 6: Исследование реагирующих ZFN *in vivo*

[0247] Т-клетки, описанные в настоящем документе, вводили на моделях реакции «трансплантат против хозяина» и/или рака на животных (например, бестимусным мышам инъецировали раковые линии клеток, такие как множественная миелома, для установления моделей опухоли). Например, в активированные Т-клетки человека методом электропорации вводили мРНК, кодирующие В2М- и ТРАК-специфичные ZFN, в которых каждая пара кодировалась отдельной мРНК, отделенной последовательностью, кодирующей саморасщепляемый пептид 2A (MacLeod, *et al.* (2017) *Mol Ther.* 25(4):949-961). Клетки также трансдуцировали частицами AAV, содержащими донор CAR (например, CD19 CAR). Затем клетки культивировали и окрашивали в отношении экспрессии CAR и отсутствия CD3⁺ клеток. Любые остаточные CD3⁺ клетки истощали с помощью разделения в магнитном поле. Мышам NSG внутривенно инъецировали клетки Раджи, экспрессирующие люциферазу

светлячка (Raji-ffLuc), и через четыре дня инъецировали Т-клетки с CD3-/против-CD19 CAR. Приживление и рост клеток Raji-ffLuc становился выраженным на четвертый день после инъекции и значительно увеличивался у мышей, не получавших лечение. Пик частоты Т-клеток с CAR в крови мышей, получавших лечение, наблюдался в день 8, достигая ~10% клеток в периферической крови в группе высокой дозы. К дням 17 – 19 у всех мышей в контрольных группах наблюдались признаки значительной опухолевой нагрузки, в особенности, в спинном и костном мозге, которые привели к полному параличу задних конечностей, и мышам проводили эвтаназию. Напротив, во всех группах мышей, получавших лечение Т-клетками с против CD19-CAR, не наблюдались признаки роста опухоли к дню 11, и они оставались безопухолевыми до дня 32 исследования.

[0248] Было обнаружено, что в ткани животных (например, костном мозге, селезенке, легких, печени, сердце, и т.д.), получавших Т-клетки, описанные в настоящем документе, остаточное заболевание отсутствовало или было минимальным. Напротив, у контрольных субъектов в большинстве тканей присутствовали обнаруживаемые опухолевые клетки.

[0249] Все патенты, заявки на патенты и публикации, упоминаемые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0250] Несмотря на то, что настоящее изобретение было представлено в некоторых деталях в качестве иллюстрации и примера для целей ясности и понимания, специалистам в данной области техники понятно, что на практике можно реализовать различные изменения и модификации в пределах духа или объема настоящего изобретения. Соответственно, изложенное выше раскрытие и следующие примеры не следует истолковывать как ограничивающие.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеаза с цинковым пальцем, содержащая:
ZFP (белок с цинковым пальцем) из ZFN (нуклеазы с цинковым пальцем),
5 обозначенной 68957, 72678, 72732 или 72748;
сконструированный домен расщепления FokI; и
линкер между указанным доменом расщепления FokI и указанным ZFP.
2. Нуклеаза с цинковым пальцем по п. 1, содержащая первую и вторую ZFN
10 следующим образом: ZFN, обозначенную 57531, и ZFN, обозначенную 72732; ZFN,
обозначенную 57531, и ZFN, обозначенную 72748; ZFN, обозначенную 68957, и ZFN,
обозначенную 57071; ZFN, обозначенную 68957, и ZFN, обозначенную 72732; ZFN,
обозначенную 68957, и ZFN, обозначенную 72748; ZFN, обозначенную 72678, и ZFN,
обозначенную 57071; ZFN, обозначенную 72678, и ZFN, обозначенную 72732; и
15 содержащую ZFP ZFN, обозначенной 72678, и ZFN, обозначенной 727482.
3. Нуклеаза с цинковым пальцем, содержащая первую и вторую ZFN по п. 1 или
п. 2 следующим образом: ZFN, содержащая ZFP из ZFN, обозначенной 72678, и ZFN,
содержащая ZFP из ZFN, обозначенной 72732.
20
4. Полинуклеотид, кодирующий нуклеазу с цинковым пальцем по любому из пп.
1 – 3.
5. Полинуклеотид по п. 4, содержащий последовательность 2A между
25 последовательностями, кодирующими указанные первую и вторую ZFN.
6. Клетка, содержащая нуклеазу с цинковым пальцем по любому из пп. 1 – 3 или
полинуклеотид по любому из пп. 4 и 5, причем геном указанной клетки
модифицирован указанной нуклеазой с цинковым пальцем.
30
7. Клетка по п. 6, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой
стволовую клетку или клетку-предшественницу.
8. Клетка по п. 7, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой

клетку человека.

9. Клетка по любому из пп. 6 – 8, отличающаяся тем, что указанная геномная модификация выбрана из группы, состоящей из вставок, делеций и их комбинаций.

5

10. Клетка по п. 6, дополнительно содержащая одну или более дополнительных геномных модификаций.

10 11. Клетка по п. 10, отличающаяся тем, что указанные дополнительные геномные модификации включают модификацию гена Т-клеточного рецептора (ТКР), модификацию гена HLA-A, модификацию гена HLA-B, модификацию гена HLA-C, модификацию гена TAP, модификацию гена CTLA-4, модификацию гена PD1, модификацию гена CISH, модификацию гена tet-2 и/или вставку трансгена в геном.

15 12. Клетка по п. 11, отличающаяся тем, что указанный трансген кодирует по меньшей мере один химерный антигенный рецептор (CAR).

13. Клетка по п. 12, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой эффекторную Т-клетку или регуляторную Т-клетку.

20

14. Клетка или линия клеток, происходящие из клетки по любому из пп. 6 – 13.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая нуклеазу с цинковым пальцем согласно полинуклеотиду по п. 4 или п. 5 либо клетку по п. 12 или п. 13.

25

16. Способ модификации гена эндогенного бета-2-микроглобулина (B2M) в клетке, причем указанный способ включает введение в указанную клетку полинуклеотида по п. 4 или п. 5, в результате чего происходит модификация указанного эндогенного гена B2M.

30

17. Способ по п. 16, дополнительно включающий введение в указанную клетку экзогенной последовательности, в результате чего указанная экзогенная последовательность встраивается в указанный эндогенный ген B2M.

18. Способ по п. 16 или п. 17, отличающийся тем, что указанная модификация включает делецию.

19. Способ получения генетически модифицированной клетки, содержащей
5 геномную модификацию в пределах эндогенного гена В2М, причем указанный способ включает этапы:

- а) приведения в контакт клетки с полинуклеотидом по п. 4 или п. 5;
- б) обеспечения воздействия на указанную клетку условий, благоприятствующих экспрессии слитого белка на основе указанного полинуклеотида; и
- 10 в) модификации эндогенного гена В2М указанным экспрессированным слитым белком, достаточной для получения указанной генетически модифицированной клетки.

20. Набор, содержащий полинуклеотид по п. 4 или п. 5.

15 21. Способ лечения и предотвращения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение указанному субъекту клетки по любому из пп. 6 - 14 или фармацевтической композиции по п. 15.

22. Способ лечения или предотвращения аутоиммунного заболевания у субъекта,
20 причем указанный способ включает введение указанному субъекту клетки по любому из пп. 6 – 14 или фармацевтической композиции по п. 15.

23. Нуклеаза с цинковым пальцем (ZFN), содержащая левую и правую ZFN следующим образом: ZFN, обозначенную 68796, и ZFN, обозначенную 68813; ZFN, обозначенную 68796, и ZFN, обозначенную 68861; ZFN, обозначенную 68812, и ZFN, обозначенную 68813; ZFN, обозначенную 68876, и ZFN, обозначенную 68877; ZFN, обозначенную 68815, и ZFN, обозначенную 55266; ZFN, обозначенную 68879, и ZFN, обозначенную 55266; ZFN, обозначенную 68798, и ZFN, обозначенную 68815; или ZFN, обозначенную 68846, и ZFN, обозначенную 53853.

30

24. Полинуклеотид, кодирующий одну или более нуклеаз с цинковым пальцем по п. 23, причем указанный полинуклеотид необязательно представляет собой мРНК.

25. Полинуклеотид по п. 24, содержащий последовательность 2А между последовательностями, кодирующими указанные левую и правую ZFN.
26. Клетка, содержащая нуклеазу с цинковым пальцем по любому из пп. 23 - 25,
5 причем геном указанной клетки модифицирован указанной нуклеазой с цинковым пальцем.
27. Клетка по п. 26, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой стволовую клетку или клетку-предшественницу.
- 10 28. Клетка по п. 26 или 27, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку человека.
29. Клетка по любому из пп. 26 – 28, отличающаяся тем, что указанная геномная
15 модификация выбрана из группы, состоящей из вставок, делеций и их комбинаций.
30. Клетка по п. 29, дополнительно содержащая одну или более дополнительных геномных модификаций.
- 20 31. Клетка по п. 30, отличающаяся тем, что указанные дополнительные геномные модификации включают модификацию гена В2М, модификацию гена HLA-A, модификацию гена HLA-B, модификацию гена HLA-C, модификацию гена TAP, модификацию гена CTLA-4, модификацию гена PD1 и/или вставку трансгена в геном.
- 25 32. Клетка по п. 31, отличающаяся тем, что указанный трансген кодирует по меньшей мере один химерный антигенный рецептор (CAR).
33. Клетка по п. 31 или п. 32, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой стволовую клетку.
- 30 34. Клетка или линия клеток, происходящие из клетки по любому из пп. 26 - 33.
35. Фармацевтическая композиция, содержащая нуклеазу с цинковым пальцем согласно полинуклеотиду по п. 24 или п. 25 или клетку по любому из пп. 26 - 34.

36. Способ модификации гена эндогенного Т-клеточного рецептора (ТКР) в клетке, причем указанный способ включает введение в указанную клетку полинуклеотида по п. 24 или п. 25, в результате чего происходит модификация
5 указанного эндогенного гена ТКР.

37. Способ по п. 36, дополнительно включающий введение в указанную клетку экзогенной последовательности, в результате чего указанная экзогенная последовательность встраивается в указанный эндогенный ген ТКР.
10

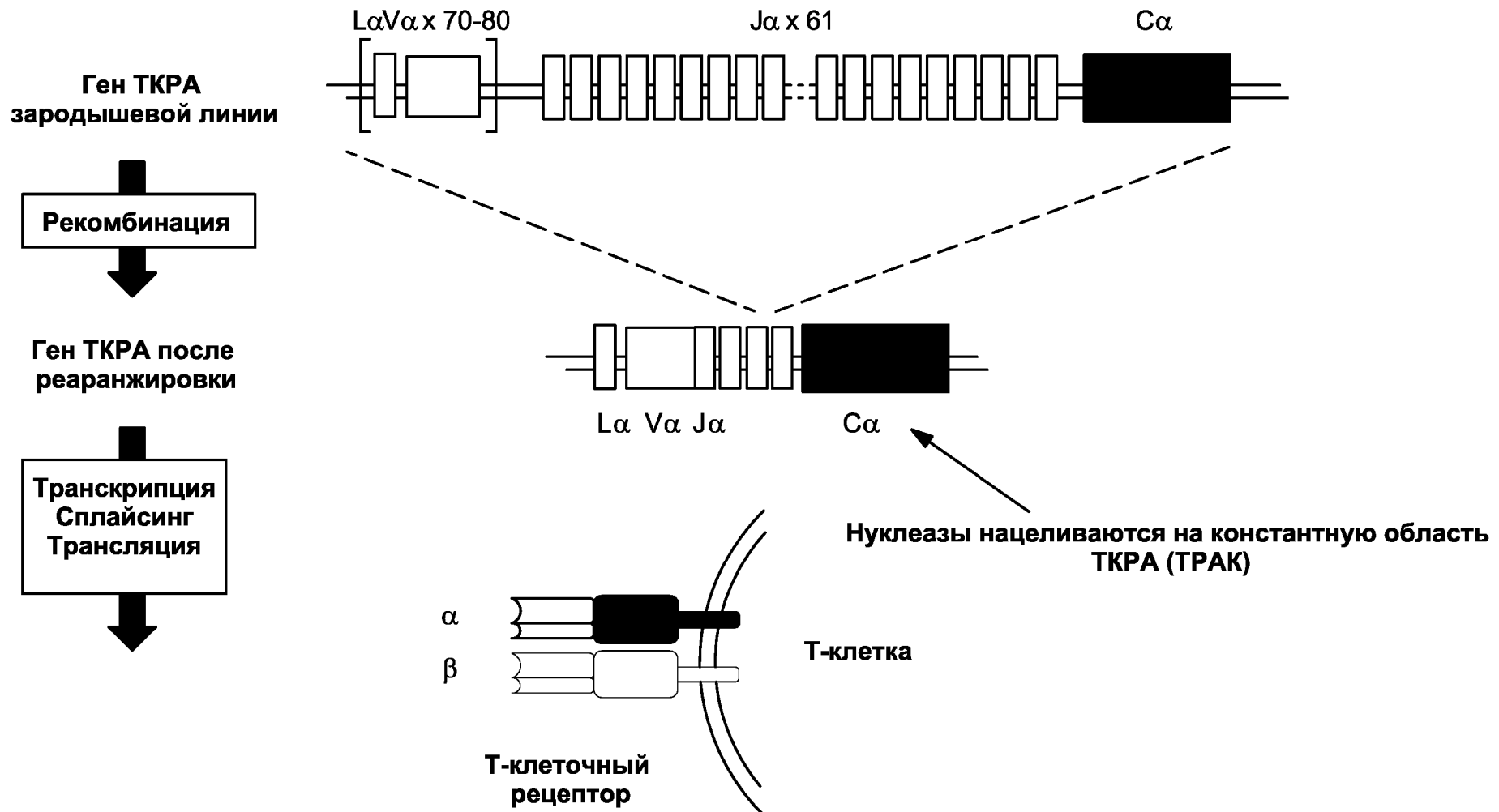
38. Способ по п. 36, отличающийся тем, что указанная модификация включает делецию.

39. Способ получения генетически модифицированной клетки, содержащей
15 геномную модификацию в пределах эндогенного гена ТКР, причем указанный способ включает этапы:

- а) приведения в контакт клетки с полинуклеотидом по п. 24 или п. 25;
- б) обеспечения воздействия на указанную клетку условий, благоприятствующих экспрессии слитого белка на основе указанного полинуклеотида; и
20
- с) модификации указанного эндогенного гена ТКР указанным экспрессированным слитым белком, достаточной для получения указанной генетически модифицированной клетки.

40. Набор, содержащий полинуклеотид по п. 24 или п. 25.
25

41. Способ лечения и предотвращения рака или реакции «трансплантат против хозяина» у субъекта, причем указанный способ включает введение указанному субъекту клетки по любому из пп. 26 – 34.



ФИГ. 1А

Экзон с1

1 aTATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGT

101 GTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAAC

201 AAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAggtaagggcagctttggtgccttcgcag

Экзон с2

2101 tctggatgctgaaagaatgtctgtttttccttttaGAAAGTTCCTGTGATGTCAAGCTGGTTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGgtaagacaggggtctagcc

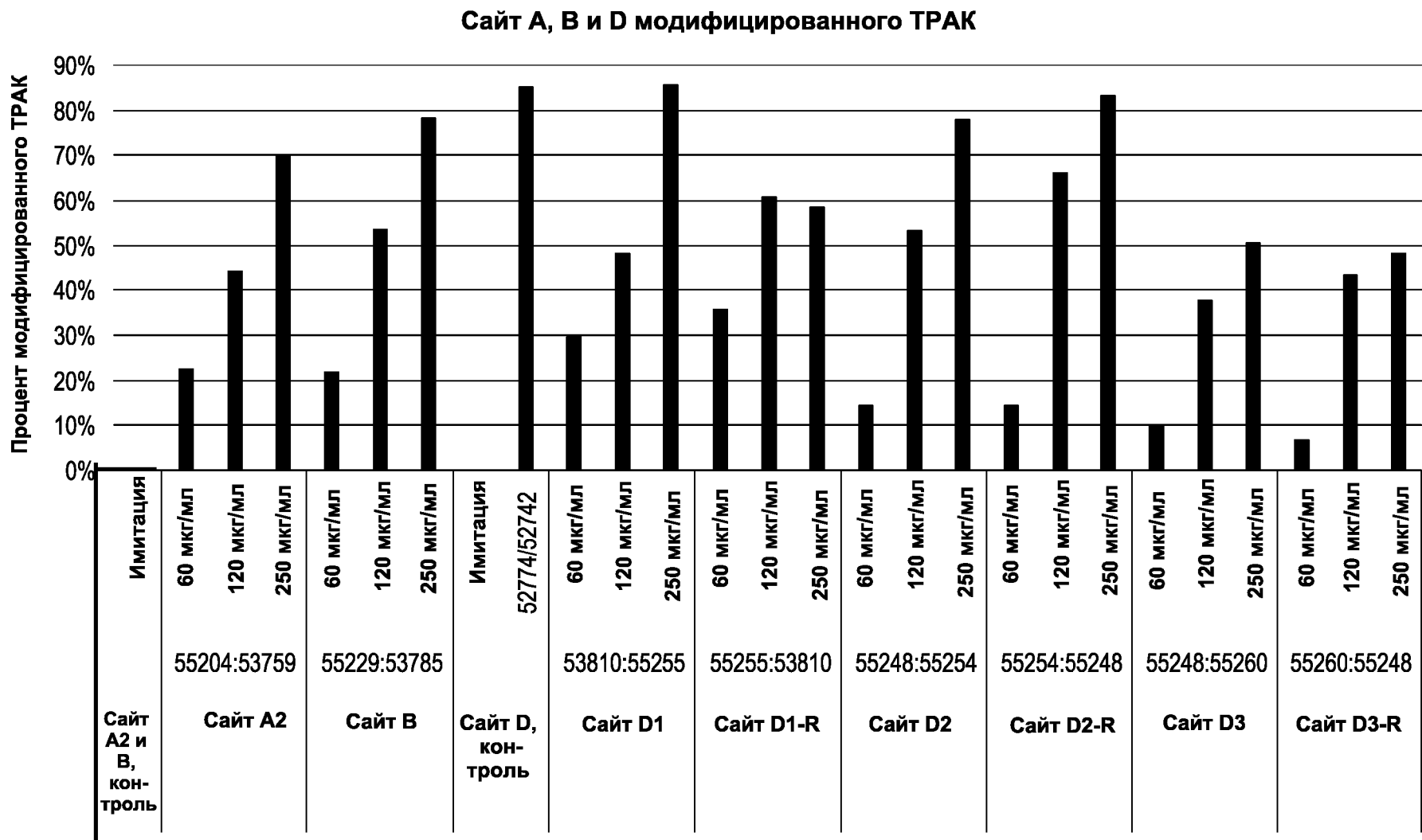
Экзон с3

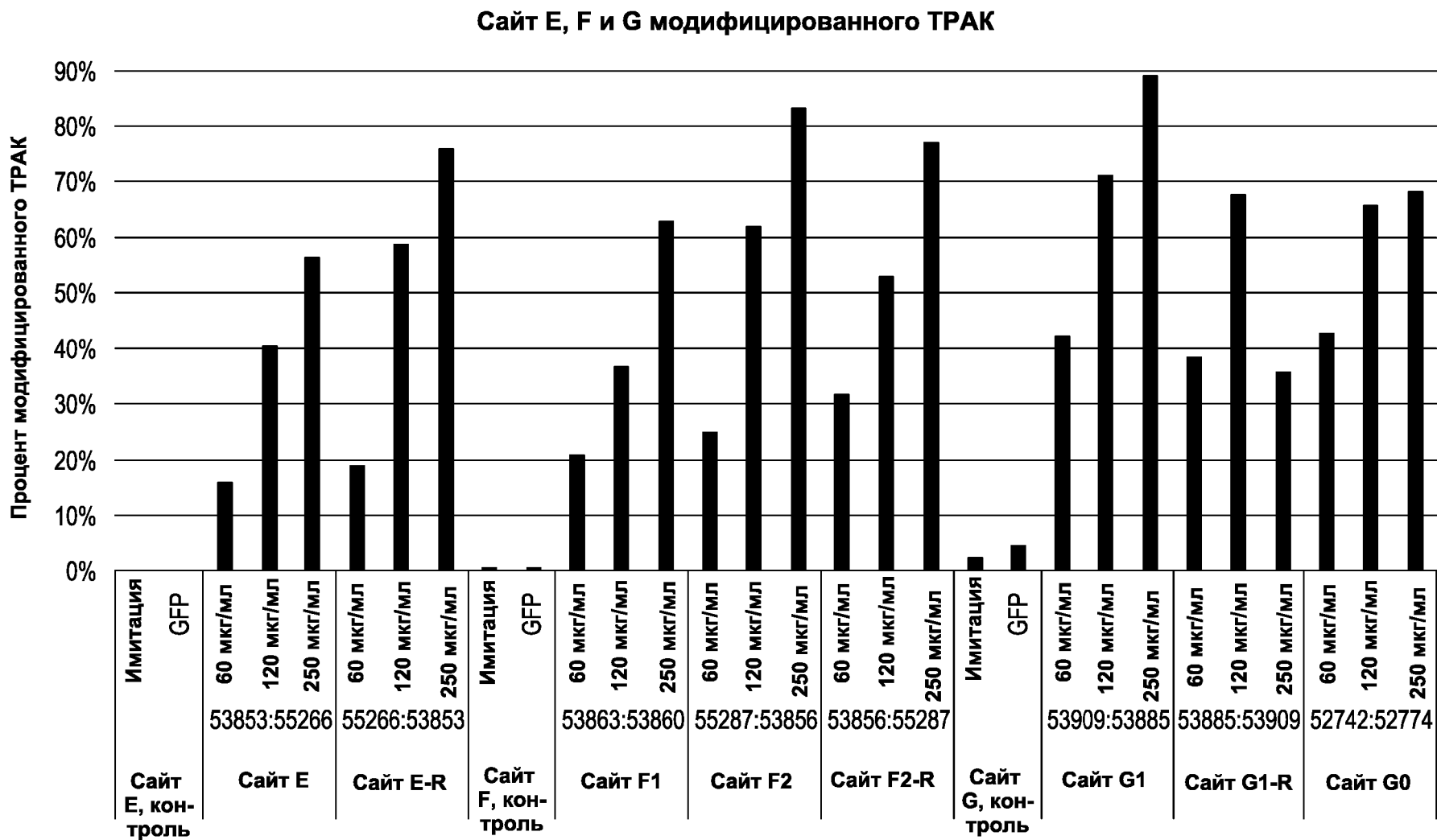
3021 aagcccataaccgctgtggcctcttggttttacagATACGAACCTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCGAAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCC

3121 GGGTTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGgtgaggggccttgaagc

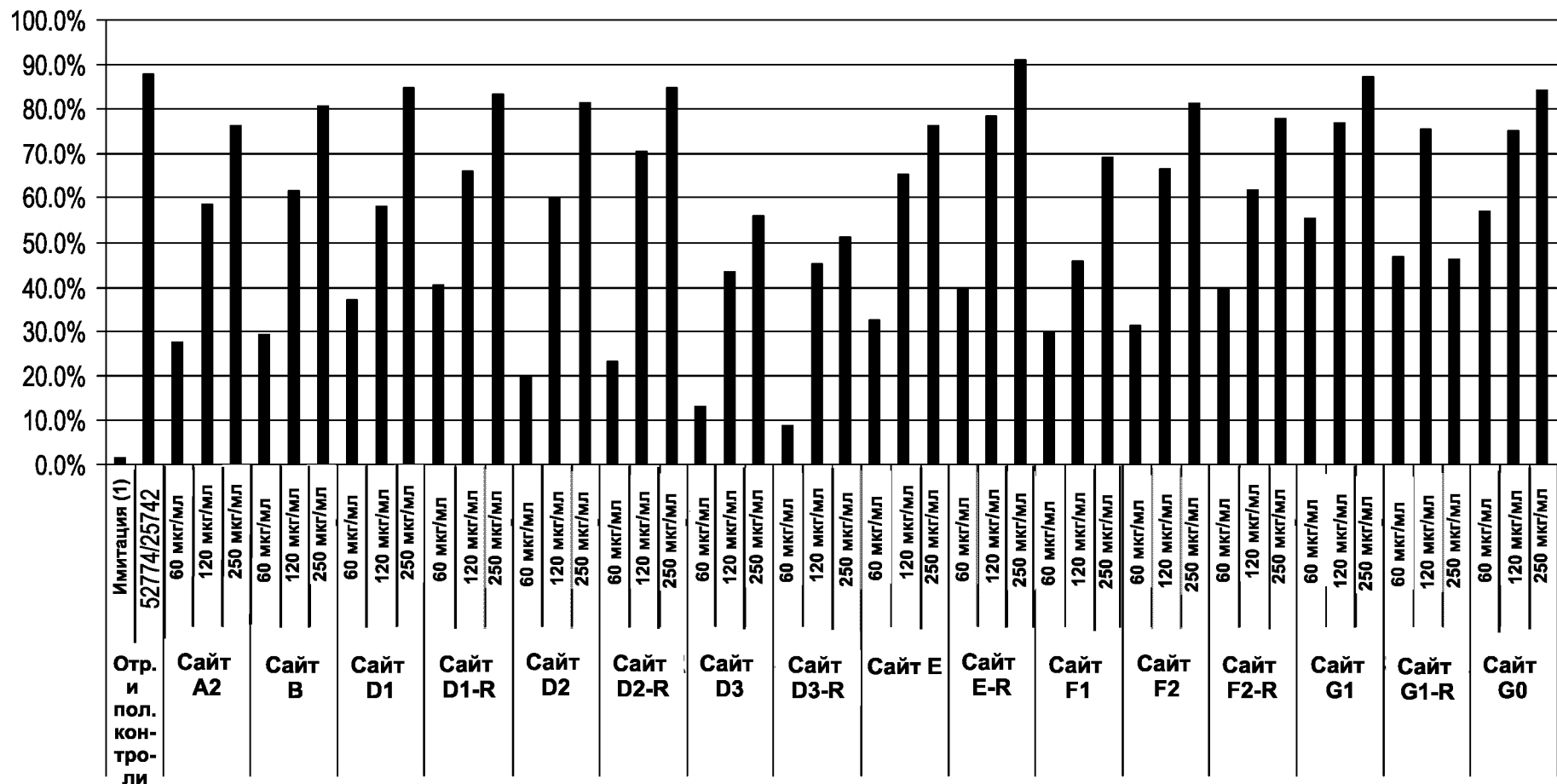
*

ФИГ. 1В

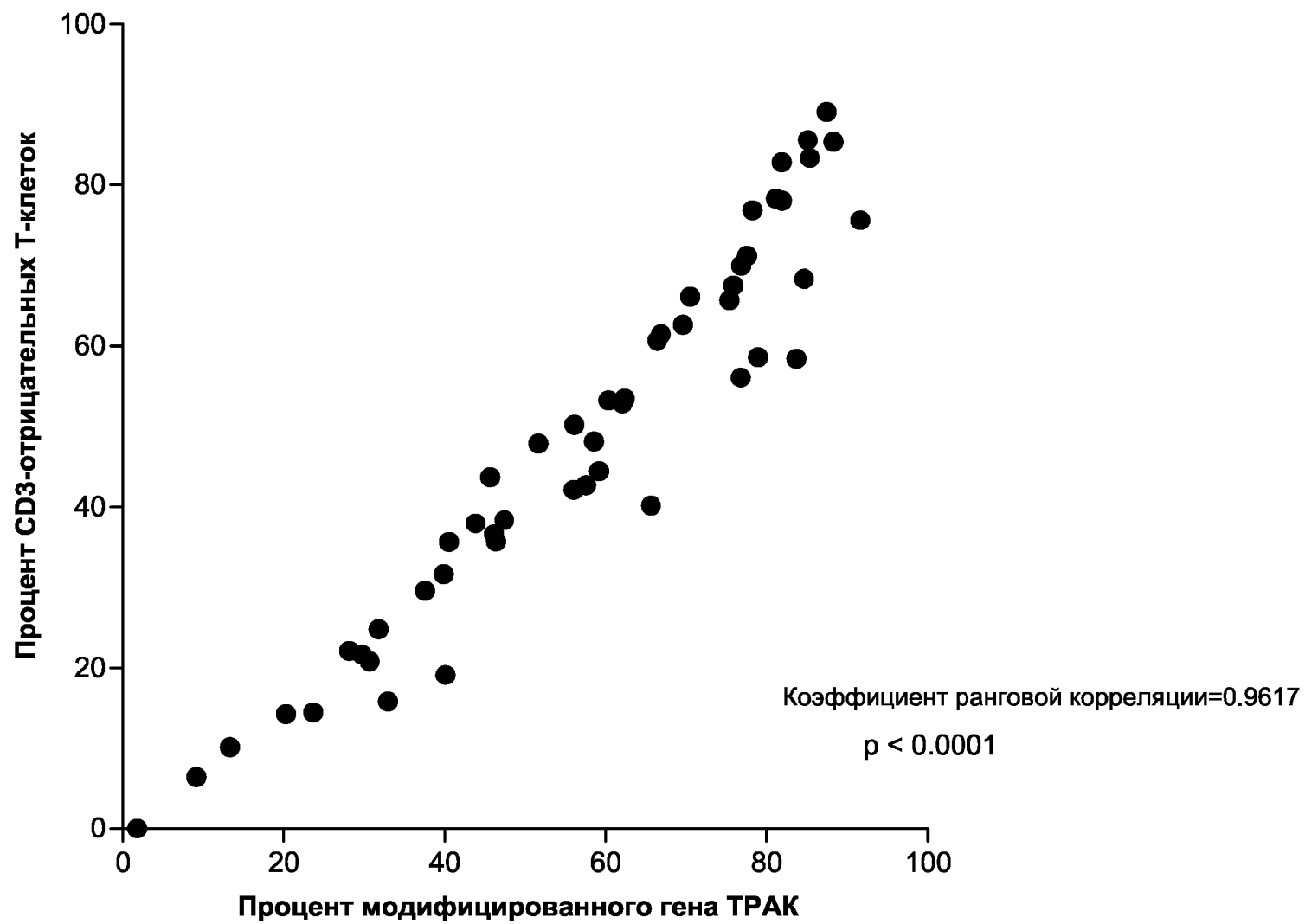
**ФИГ. 2А**



ФИГ. 2В

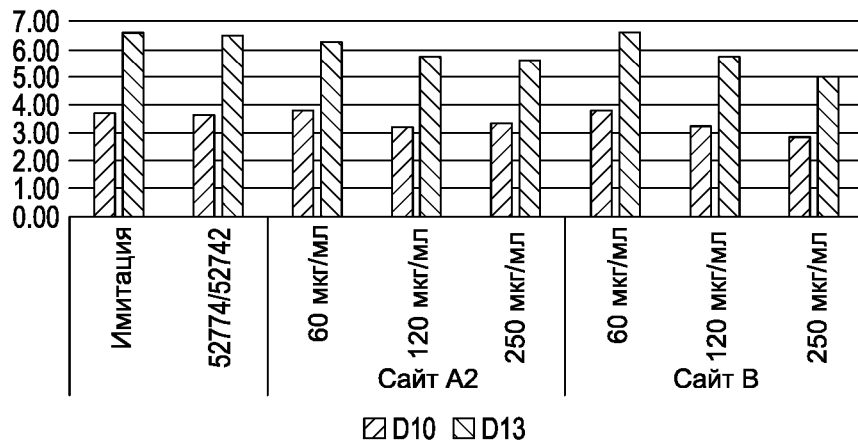


ФИГ. 3



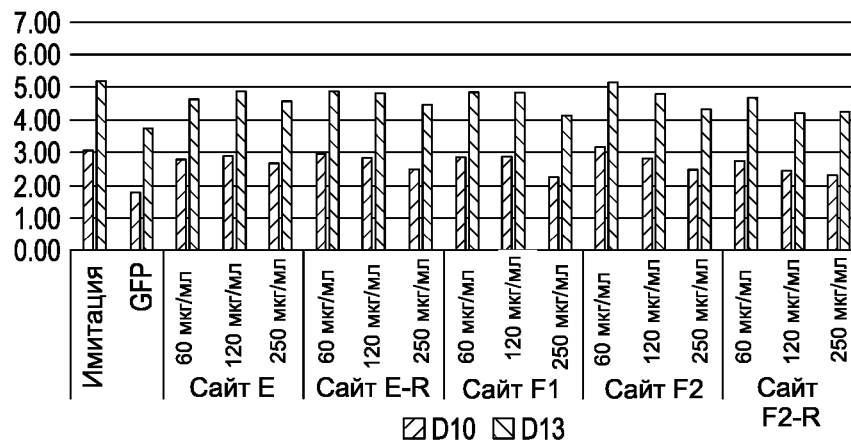
ФИГ. 4

Рост клеток для сайтов A и B



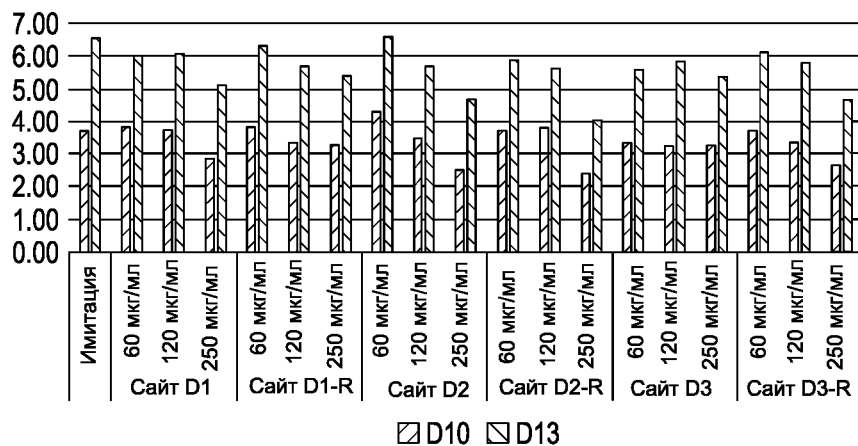
ФИГ. 5А

Рост клеток для сайтов E и F



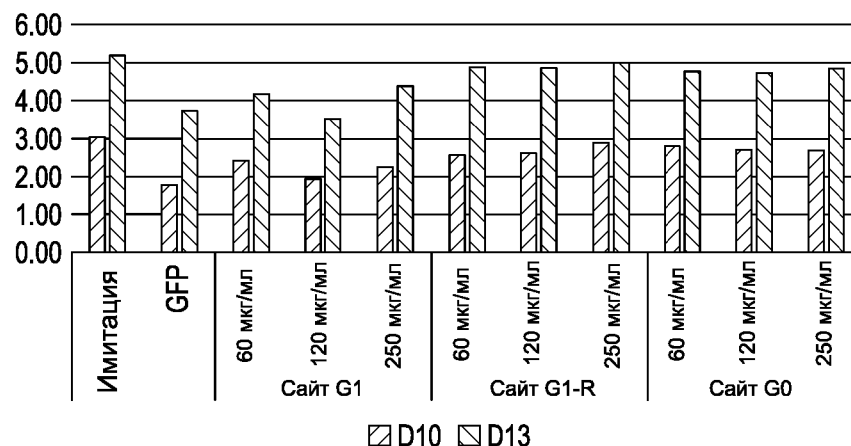
ФИГ. 5В

Рост клеток для сайтов D



ФИГ. 5С

Рост клеток для сайта G

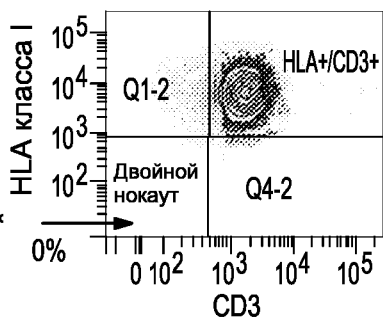


ФИГ. 5D

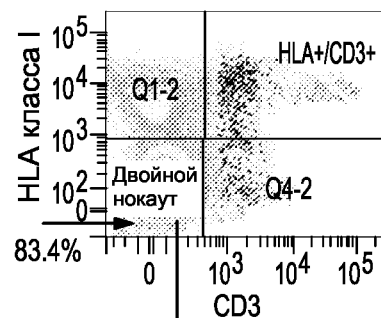
	FACS				
	Д10				
мкг/мл	ТРАК-	В2М-	ДВОЙНОЙ-	Общий GFP+	ДВОЙНОЙ-GFP+
имитация	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0
только нокаут ТРАК/ В2М	85.0	83.6	80.0	0.0	0.0
нокаут ТРАК/ В2М + 1Е5 вир. ген. / клетку AAV донора, локус ТРАК	91.9	92.7	89.3	80.8	83.0
нокаут ТРАК/ В2М + 3Е4 вир. ген. / клетку AAV донора, локус ТРАК	91.2	93.4	89.1	71.9	74.3
нокаут ТРАК/ В2М + 1Е5 вир. ген. / клетку AAV донора, локус В2М	88.2	90.5	86.4	54.9	59.6
нокаут ТРАК/ В2М + 3Е4 вир. ген. / клетку AAV донора, локус В2М	89.8	92.2	87.9	43.2	46.7

ФИГ. 6

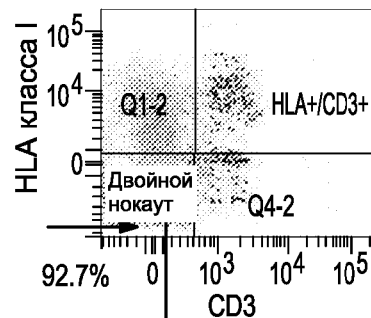
Имитация



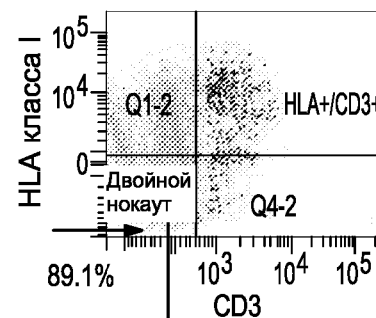
Только ZFN



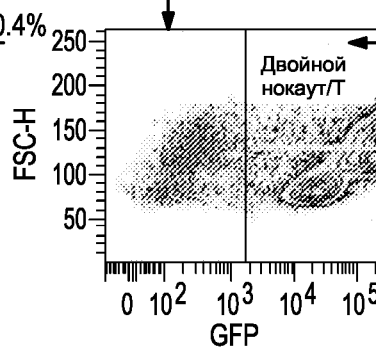
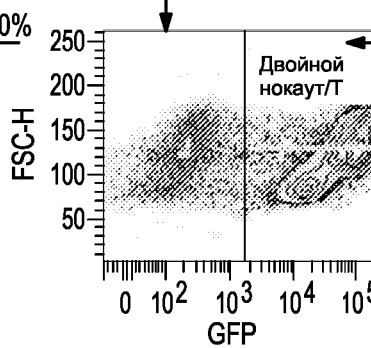
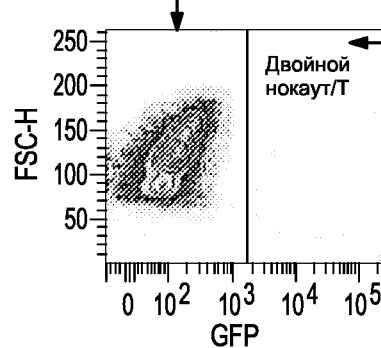
ZFN + донор B2M



ZFN + донор ТРАК



HLA-/CD3-



HLA-/CD3-/GFP+

ФИГ. 7