

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГЕНА ИНДУЦИРУЕМОГО ЦИТОКИНАМИ SH2-СОДЕРЖАЩЕГО БЕЛКА (CISH)

5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/583,724, поданной 9 ноября 2017 г., и предварительной заявки на патент США № 62/716,002, поданной 8 августа 2018 г., описания которых настоящим полностью включены в данную заявку
10 посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к области геномной инженерии, в частности, к направленной модификации гена индуцируемого цитокинами
15 SH2-содержащего белка (CISH или CIS).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Клетки общаются друг с другом либо путем непосредственного контакта, либо путем высвобождения молекулярных «сообщений» во
20 внеклеточное пространство, чтобы скоординировать пролиферацию, миграцию, дифференцировку и влиять на изменения в экспрессии генов в клетках-мишенях, экспрессирующих соответствующие рецепторные комплексы на поверхности клетки. Для множества цитокинов и факторов роста, их связывание с рецептором запускает передачу сигнала внутри клеток-мишеней через сигнальный путь
25 JAK/STAT. См., например, Aaronson, и др. (2002) *Science* 296(5573):1653-5; Rawlings, и др. (2004) *J Cell Sci* 117 (часть 8):1281-3; и Jatiani, и др. (2010) *Genes Cancer* 1(10):979-93. В отсутствие лиганда цитоплазматический конец рецептора связан с неактивными представителями семейства тирозинкиназ Janus (JAK1-3 или Tyk2). Связывание лиганда индуцирует образование рецепторного
30 комплекса из двух или более субъединиц рецептора, приводя белки JAK в непосредственную близость, что обеспечивает возможность активации посредством транс-фосфорилирования. Активированные JAK затем могут фосфорилировать остатки тирозина на цитоплазматическом домене рецептора,

чтобы создать сайт связывания для одного из передающих сигнал белков и активаторов транскрипции (STAT).

[0004] У млекопитающих есть семь белков STAT: STAT1-4, STAT5a, STAT5b и STAT6. В структуре каждого белка STAT содержится домен Src-гомологии 2 (SH2) (см., Sadowski, и др. (1986) *Mol Cell Biol* 6(12):4396-408), который направляет связывание с содержащим фосфотирозин сайтом на рецепторе, где белок STAT может быть сам фосфорилирован по тирозину JAK-киназой. После фосфорилирования белки STAT образуют гомо- или гетеродимеры и переносятся в ядро, где они связываются с ДНК и стимулируют транскрипцию близлежащих генов. Поскольку путь JAK/STAT играет ключевую роль в регуляции роста, пролиферации клеток и иммунном ответе, нарушение регуляции данной системы может способствовать развитию рака или воспалительного заболевания.

[0005] Активация STAT быстро вызывает экспрессию ряда генов, кодирующих супрессор передачи сигналов цитокинов (SOCS) и семейство индуцируемых цитокинами содержащих домен SH2 (CISH) внутриклеточных белков. См., например, Palmer и др. (2009) 30(12):592-602; Yoshimura, и др. (2007) *Nat Rev Immunol* 7(6):454-65; Trengove, и др. (2013) *Am J Clin Exp Immunol* 2(1):1-29. Белки SOCS/CISH содержат N-концевой домен с вариательной последовательностью и функцией, за которым следует домен SH2 и C-концевой домен SOCS, который направляет сборку комплекса убиквитин-лигазы E3, который метит белки-мишени убиквитином, маркируя их для деградации в протеасоме. Белки SOCS/CISH ингибируют передачу сигналов JAK/STAT, конкурируя со STAT за связывание с фосфотирозиновым сайтом на рецепторе, тем самым ингибируя активацию STAT, и направляя накопление убиквитина на различных белках, повышая их метаболизм. Таким образом, белки SOCS/CISH создают классическую петлю отрицательной обратной связи, чтобы модулировать передачу сигналов цитокинов и факторов роста и чтобы увеличить затухание сигнала, когда лиганд больше не присутствует. У некоторых белков SOCS есть дополнительные активности, такие как непосредственное ингибирование JAK и повышение метаболизма других белков SOCS, что вносит дополнительную сложность в регуляцию передачи сигнала через рецептор. См. Kershaw и др. (2013) *Biochem Soc Trans.* 41(4):1042-7.

[0006] CISH (также известный как CIS) представлял собой первый белок SOCS, идентифицированный как ген, который быстро индуцируется (в течение 30 мин) после связывания лиганда с рецептором эритропоэтина (EPO) (EPOR). См. Yoshimura и др. (1995) *EMBO J* 14(12):2816-26. Экспрессию CISH также индуцировали интерлейкин-2 (IL-2), IL-3 и колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (ГМ-КСФ) в подходящих типах клеток. В анализе иммунопреципитации продемонстрировали, что белок CISH стабильно связывал бета-цепь IL-3R и EPOR, но только после связывания лиганда, что позволяет предположить, что было необходимо фосфорилирование тирозина рецептора. Сверхэкспрессия белка CISH подавляла рост клеток, свидетельствуя о том, что CISH оказывал отрицательное влияние на передачу сигнала. Затем показали, что экспрессия CISH зависит от активации STAT5, и в промоторной области CISH обнаружили несколько сайтов связывания STAT5. См., Matsumoto и др. (1997) *Blood* 89(9):3148-54. Более того, CISH ингибировал EPO-зависимую активацию STAT5 и подавлял активность других STAT5-зависимых рецепторов, свидетельствуя о том, что CISH представляет собой модулятор обратной связи для STAT5.

[0007] Большое разнообразие STAT5-зависимых рецепторов вызывают экспрессию CISH, включая (но не ограничиваясь перечисленными) гормон роста (GH), пролактин (PRL), тромбопоэтин (TPO), лептин, IL-2, IL-5 и IL-9. См. Bhattacharya и др. (2001) *Am J Respir Cell Mol Biol* 24(3):312-6. Было показано, что CISH связывается с рецептором GH (GHR), рецептором PRL и бета-цепью рецептора IL-2 и ингибирует передачу сигнала через них, и вызывает интернализацию и деактивацию GHR. См. Ram и др. (1999) *Biol Chem* 274(50):35553-61; Endo и др. (2003) *J Biochem* 133(1):109-13; Aman и др. (1999) *J Biol Chem* 274(42):30266-72; Landsman и др. (2005) *J Biol Chem* 280(45):37471-80. Экспрессию мРНК *Cish* обнаружили во множестве тканей (печени, почке, сердце, желудке, легком, яичнике и скелетной мышце). См. Palmer и др. (2009) 30(12):592-602; Anderson и др. (2009) 138(3):537-44; Clasen и др. (2013) *J Lipid Res* 54(7):1988-97. Помимо явного его участия в аппарате передачи сигналов большого количества важных цитокинов и факторов роста, у нокаутных по *Cish* мышей были минимальные нарушения (за исключением едва уловимых изменений в иммунном ответе). См. Palmer и др. (2009) *Trends Immunol* 30(12):592-602; Trengove и др. (2013) *Am J Clin Exp Immunol* 2(1):1-29. Это может

быть благодаря компенсаторной активности других белков семейства SOCS. Влияние CISH на биологию предполагаемых целевых генов наблюдали у трансгенных мышей, конститутивно экспрессирующих *Cish*, запускаемый с промотора бета-актина. У этих мышей наблюдали пониженную массу тела, дефекты развития молочной железы и пониженные количества гамма/дельта Т-клеток, клеток-естественных киллеров (NK) и NKT-клеток, данный фенотип был похож на таковой у мышей с недостатком Stat5a и/или Stat5b. См., Matsumoto и др. (1999) *Mol Cell Biol* 19(9):6396-407.

[0008] Поскольку CISH потенциально влияет на передачу сигналов множеством цитокинов и факторов роста, не удивительно, что обнаружили связь активности CISH и его вариантов с инфекционными заболеваниями и раком. В нескольких исследованиях показали повышенную чувствительность к различным инфекционным агентам у субъектов, несущих некоторые полиморфные варианты *CISH*, включая малярию, лептоспироз, вирус гепатита В и туберкулез. См., Khor и др. (2010) *N Engl J Med* 362(22):2092-101; Esteves и др. (2014) *PLoS One* 9(9):e108534; Hu и др. (2014) *PLoS One* 9(6):e100826; Tong и др. (2012) *Immunogenetics* 64(4):261-5; Ji и др. (2014) *Infect Genet Evol* 28:240-4; Sun и др. (2014) *PLoS* 9(3):e92020. Для одного ассоциированного с риском аллеля, общего для всех исследований (rs414171, -292 от начала транскрипции), выявили пониженные уровни экспрессии CISH в мононуклеарных клетках периферической крови по сравнению с альтернативным аллелем. См., Khor и Sun, выше. При раке молочной железы уровни экспрессии CISH были повышены в карциномах молочной железы и линиях клеток рака по сравнению с нормальными тканями, что привело к предположению, что CISH может способствовать онкогенезу благодаря его способности активировать киназу, регулируемую внеклеточными сигналами (ERK). Raccurt и др. (2003) *Br. J. Cancer* 89(3):524-32. Варианты *CISH* также связаны с характеристиками продукции молока у молочного скота. См., Arun и др. (2015) *Front Genet* 6:342.

[0009] Хотя Т-клетки не используют классический сигнальный путь JAK/STAT при ответе на стимуляцию через Т-клеточный рецептор (TCR), экспрессия *Cish* быстро вызывается (в течение 30 мин), когда Т-клетки активируются антителом к CD3. См., Ji, выше; Chen и др. (2003) *Int Immunol* 15(3):403-9; Palmer и др. (2015) *J Exp Med* 212(12):2095-113; Yang и др. (2013) *Nat Immunol* 14(7):732-40. STAT5 быстро фосфорилируется после стимуляции TCR,

вероятно ассоциированной с TCR лимфоцит-специфичной протеинтирозинкиназой (Lck). См., Welte и др. (1999) *Science* 283(5399): 222-5. Экспрессия IL-2 также вызывается стимуляцией TCR, но характеризуется кинетикой, слишком медленной, чтобы объяснить индукцию *Cish*. См. Yang и др., выше; Li и др. (2000) *J Exp Med* 191(6):985-94. Экспрессия *Cish in vivo* была

5 низкой в наивных по отношению к антигену Т-клетках, но неуклонно возрастала во взаимодействовавших с антигеном CD8⁺ Т-клетках центральной памяти (TCM) и эффекторной памяти (TEM), собранных после вакцинации. См., Sallusto и др. (1999) *Nature* 401(6754):708-12.

10 **[0010]** Также исследовали роль *Cish* в способности Т-клеток к ответу. Трансгенная экспрессия *Cish in vivo* с промотора CD4 приводила к получению мышей с конститутивной экспрессией в компартменте CD4⁺ хелперных Т-клеток. См. Li и др., выше. Циркулирующие субпопуляции Т-клеток не были поражены, но вместо ожидаемой угнетенной способности к ответу, CD4⁺ Т-

15 клетки проявили повышенную вызванную TCR пролиферацию и экспрессию цитокинов и повышенную выживаемость *in vitro*. Циркулирующие популяции Т-клеток также были нормальными у мышей с нокаутом *Cish*, но при этом снова наблюдали повышенный ответ (пролиферацию и продукцию цитокинов) на стимуляцию TCR *in vitro* в обеих субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. См.

20 Palmer и Yang, выше. Молекулярная основа действия *Cish* также неясна, так как повышенная способность к ответу CD4⁺ Т-клеток в трансгенных по *Cish* мышах объяснялась взаимодействием между *Cish* и протеинкиназой С тета, тогда как ингибирование активности CD8 Т-клеток посредством *Cish* объяснялась повышенной деградацией фосфолипазы С гамма 1.

25 **[0011]** Одним последствием повышенной активности Т-клеток у мышей с дефицитом *Cish* был длительный и более агрессивный ответ адоптивно перенесенных антиген-специфичных CD8 Т-клеток на развившиеся опухоли в модели меланомы. См. Palmer, выше. Кроме того, снижение экспрессии CISH в Т-клетках человека повышало функциональность совместно трансдуцированных

30 опухолеспецифичных TCR. Полученные результаты позволяют предположить, что некоторое уменьшение активности отрицательной обратной связи, которое уменьшает передачу сигналов TCR, может вызывать более сильную иммунореактивность по отношению к опухоли. Тем не менее, повышенная активность против меланомы в модели на мышах была связана с большей

аутоиммунной реакцией в глазу. Аналогично, даже несмотря на отсутствие значительных пороков развития в другой линии мышей с недостаточностью *Cish*, у более старших животных (> 6 месяцев) развивалось спонтанное заболевание легких, очевидно вызванное повышенным ростом субпопуляций TH2 и TH9 CD4

5 Т-клеток. Данные исследования наглядно показывают распространенные проблемы с иммуномодуляцией: слишком сильное подавление делает пациента уязвимым для инфекции и развития опухолей, и слишком сильная стимуляция может приводить к аутоиммунной реакции или хроническому воспалительному заболеванию.

10 **[0012]** Рекомбинантные факторы транскрипции, содержащие связывающие ДНК домены из белков с цинковыми пальцами («ZFP») или домены TAL-эффекторов («TALE»), и сконструированные нуклеазы, включая нуклеазы с цинковыми пальцами («ZFN»), TALEN, системы нуклеаз CRISPR/Cas и хоминг-эндонуклеазы, все из которых разработаны таким образом, чтобы
15 специфично связываться с целевыми сайтами на ДНК, обладают способностью регулировать экспрессию эндогенных генов и могут применяться в геномной инженерии, генотерапии и лечении расстройств, таких как рак и воспаление. См., например, патенты США № 9,877,988; 9,394,545; 9,150,847; 9,206,404; 9,045,763; 9,005,973; 8,956,828; 8,936,936; 8,945,868; 8,871,905; 8,586,526; 8,563,314;
20 8,329,986; 8,399,218; 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 заявок на патент США № 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2005/0064474; 2006/0063231; 2008/0159996; 2010/0218264; 2012/0017290; 2011/0265198; 2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983;
25 2013/0177960 и 2015/0056705, описания которых полностью включены в данную заявку посредством ссылки во всех отношениях. Кроме того, были разработаны направленные нуклеазы на основе системы Argonaute (например, из *T. thermophilus*, известная как ‘TtAgo’, см. Swarts и др. (2014) *Nature* 507(7491): 258-261), которые также потенциально можно применять для редактирования генома
30 и генотерапии.

[0013] Опосредованную нуклеазами генотерапию можно применять для генетического конструирования клетки, чтобы она содержала один или более инактивированных генов, и/или чтобы вызвать у этой клетки экспрессию продукта, ранее не продуцируемого в данной клетке (например, путем

встраивания трансгена и/или путем исправления эндогенной последовательности). Примеры применений встраивания трансгена включают встраивание одного или более генов, кодирующих один или более новых терапевтических белков, встраивание кодирующей последовательности, кодирующей белок, которого нет в клетке или у индивида, встраивание гена дикого типа в клетку, содержащую мутированную последовательность гена, и/или встраивание последовательности, которая кодирует структурную нуклеиновую кислоту, такую как кшРНК или миРНК. Примеры полезного применения «исправления» последовательности эндогенного гена включают изменения ассоциированных с заболеванием мутаций в гене, изменения в последовательностях, кодирующих сайты сплайсинга, изменения в регуляторных последовательностях и направленные изменения последовательностей, кодирующих структурные свойства белка. Трансгенные конструкции можно встроить либо путем репарации, направляемой гомологией (HDR), либо путем захвата концов во время процессов, запускаемых негомولوجичным соединением концов (НГСК). См., например, патенты США № 9,045,763; 9,005,973; 7,888,121 и 8,703,489.

[0014] Клинические испытания с применением данных сконструированных факторов транскрипции и нуклеаз показали, что данные молекулы способны лечить различные состояния, включая виды рака, ВИЧ и/или нарушения со стороны крови (такие как гемоглобинопатии и/или гемофилии). См., например, Yu и др. (2006) *FASEB J.* 20:479-481; Tebas и др. (2014) *New Eng J Med* 370(10):901. Таким образом, данные подходы можно применять для лечения заболеваний.

[0015] Тем не менее, остается потребность в дополнительных способах и композициях для исправления гена *CISH* и доставки молекулы-донора для лечения и/или предотвращения рака, воспалительных расстройств и другого заболевания, при котором желательна регуляция *CISH*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0016] В настоящем изобретении описаны композиции и способы для применения в генотерапии и геномной инженерии. В частности, описанные способы и композиции относятся к опосредованной нуклеазами геномной модификации (например, одной или более вставкам и/или делециям) эндогенного

гена *CISH* (мутантного или дикого типа). Геномная(-ые) модификация(-и) может(-гут) включать вставки и/или делеции («инделы», «indel»), которые инактивируют целевой ген (например, посредством НГСК после расщепления гена нуклеазой); направленное встраивание трансгена (донора), содержащего последовательность, кодирующую белок, например, белок, который отсутствует или дефектный у субъекта с раком или воспалительным состоянием, и/или направленное встраивание корректирующего донора (например, последовательности, которая восстанавливает функциональный *CISH* в клетке с мутантным геном), химерного антигенного рецептора (CAR) и/или одного или более компонентов или регуляторов комплекса HLA или слитых белков, содержащих комплекс HLA (например, слитый белок B2M-HLA-E или B2M-HLA-G). Указанные генетические модификации и/или клетки, содержащие данные модификации, можно применять в способах *ex vivo* или *in vivo*.

[0017] В некоторых аспектах настоящей заявки предложена генетически модифицированная клетка, содержащая геномную модификацию в экзоне 2 или экзоне 3 эндогенного гена *CISH*. Также предложены популяции данных генетически модифицированных клеток. Геномная модификация может включать одну или более вставок и/или делеций (инделов) и/или встраивание одного или более трансгенов в ген *CISH* (например, трансгена, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR), иммуномодулирующий фактор (например, PD1, CTLA-4 и т.д.), сконструированный или экзогенный Т-клеточный рецептор (TCR) (например, связанные с антителом Т-клеточные рецепторы (ACTR)). В некоторых аспектах ген *CISH* модифицируют после расщепления нуклеазой (например, одной или более нуклеазами с цинковыми пальцами, одной или более TALEN и/или одной или более системами нуклеаз CRISPR/Cas). В некоторых вариантах реализации нуклеаза содержит ДНК-связывающий домен, который связывается с целевым сайтом, представленным в Таблице 2, например, нуклеаза с цинковыми пальцами, содержащая белок с цинковыми пальцами, содержащий 4, 5 или 6 доменов с цинковыми пальцами, содержащих распознающую спираль, такой как белки с цинковыми пальцами, содержащие участки распознающей спирали из белков, обозначенных SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 или SBS#59580. Также предложены генетически модифицированные клетки (и популяции таких клеток), происходящие из любой из клеток,

описанных в данной заявке. В некоторых вариантах реализации клетка выбрана из группы, состоящей из гемопоэтической стволовой клетки, эффекторной Т-клетки и регуляторной Т-клетки.

5 [0018] В других аспектах настоящей заявки предложен белок с цинковыми пальцами, содержащий 6 доменов с цинковыми пальцами, каждый из которых содержит участок распознающей спирали, при этом белок с цинковыми пальцами содержит участки распознающей спирали из белков, обозначенных SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 или SBS#59580. Также предложены слитые белки, содержащие
10 любой из белков с цинковыми пальцами, описанных в данной заявке, включая слитые белки из белка с цинковыми пальцами и расщепляющего домена или расщепляющего полудомена, дикого типа или сконструированного. Также предложены один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более ZFP и/или слитых белков, описанных в данной заявке. Также предложены
15 выделенные клетки (например, эффекторные Т-клетки, регуляторные Т-клетки и/или гемопоэтические стволовые клетки), содержащие один или более белков (например, ZFP или слитых белков) и/или один или более полинуклеотидов, кодирующих данные белки. Также предложены наборы, содержащие один или более белков, один или более полинуклеотидов и/или одну или более
20 выделенных клеток, описанных в данной заявке.

[0019] В других аспектах настоящего изобретения предложен способ получения генетически модифицированной клетки, описанной в данной заявке, указанный способ включает введение в клетку одного или более полинуклеотидов, кодирующих одну или более нуклеаз, содержащих ДНК-
25 связывающий домен, который связывается с целевым сайтом в экзоне 2 или экзоне 3 гена *CISH*, причем нуклеаза связывается с геном *CISH* и расщепляет его, тем самым генетически модифицируя клетку. В некоторых вариантах реализации генетически модифицированная клетка содержит трансген, который встраивается в ген *CISH* и экспрессируется в клетке. Также предложен способ
30 обеспечения белка нуждающемуся в этом субъекту, указанный способ включает введение генетически модифицированной клетки, описанной в данной заявке, причем указанная клетка экспрессирует трансген (например, CAR, иммуномодулирующий фактор и/или ACTR, и т.д.) в субъекте.

[0020] В одном аспекте в данной заявке раскрыты способы и композиции для направленной модификации гена *CISH* с применением одной или более нуклеаз. Нуклеазы, например, сконструированные мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) (термин «ZFN» включает пару ZFN), TALE-нуклеазы (TALEN, включая слитые белки доменов эффекторов TALE с доменами нуклеаз из эндонуклеаз рестрикции и/или из мегануклеаз (таких как мега-TALE и компактные TALEN) (термин «TALEN» включает пару TALEN), система Ttago и/или системы нуклеаз CRISPR/Cas применяют для расщепления ДНК в локусе гена *CISH* в клетке. Ген *CISH* может инактивироваться после расщепления (например, в результате вставок и/или делеций («инделы»)) и/или в результате направленного встраивания донорного трансгена. Донорный трансген можно встроить с помощью направляемой гомологией репарации (НГР) или механизмов негомологичной репарации (например, захвата донора НГСК). Нуклеазы, описанные в данной заявке, могут вызывать двухцепочечный (ДЦР) или одноцепочечный разрыв (ник) в целевой ДНК. В некоторых вариантах реализации две никазы применяют для получения ДЦР путем введения двух ников. В некоторых случаях никаза представляет собой ZFN, тогда как в других никаза представляет собой никазу TALEN или CRISPR/Cas. Любые из нуклеаз, описанных в данной заявке (например, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas и т.д.), могут быть нацелены на интрон и/или экзон (например, экзон 2 или 3) гена *CISH* (включая последовательности, перекрывающие интроны и экзоны), например, на целевые последовательности, представленные в Таблице 2, включая, например, целевой сайт, содержащий от 9 до 20 или более (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) смежных или несмежных аминокислот из последовательностей, представленных в Таблице 2.

[0021] В одном аспекте в данной заявке описан не встречающийся в природе белок с цинковыми пальцами (ZFP), который связывается с целевым сайтом в гене *CISH* в геноме, причем указанный ZFP содержит один или более сконструированных связывающих доменов с цинковыми пальцами. В одном варианте реализации ZFP представляет собой нуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN), которая расщепляет целевой интересующий участок в геноме, причем указанная ZFN содержит один или более сконструированных связывающих доменов с цинковыми пальцами и расщепляющий домен или расщепляющий полудомен из нуклеазы. Расщепляющие домены и расщепляющие полудомены

можно получить, например, из различных эндонуклеаз рестрикции и/или хоминг-эндонуклеаз, и они могут быть доменами дикого типа или сконструированными (мутантными) доменами. В одном варианте реализации расщепляющие полудомены получают из эндонуклеазы рестрикции типа IIS (например, *FokI*). В

5 некоторых вариантах реализации домен с цинковыми пальцами представляет собой белок с цинковыми пальцами с доменами распознающей спирали, упорядоченными как показано в одном ряду Таблицы 1. Нуклеазы, содержащие данные белки с цинковыми пальцами, могут содержать любую линкерную последовательность (например, соединяющую их с расщепляющим доменом) и

10 любой расщепляющий домен (например, мутант димеризации, такой как мутант ELD; домен *FokI*, содержащий мутацию в одном или более из положений 416, 422, 447, 448 и/или 525; и/или мутанты каталитического домена, которые приводят к функциональному состоянию никазы). См., например, патенты США № 8,703,489; 9,200,266; 8,623,618 и 7,914,796; и публикацию заявки на патент

15 США № 2018/0087072. В некоторых вариантах реализации ZFP из ZFN связывается с целевым сайтом из от 9 до 18 или более нуклеотидов внутри последовательности, представленной в Таблице 2 (SEQ ID NO: 40 - 47).

[0022] В другом аспекте в данной заявке описан белок эффектора, подобного активаторам транскрипции (TALE), который связывается с целевым

20 сайтом (например, целевым сайтом, содержащим по меньшей мере 9 или 12 (например, от 9 до 20 или более) нуклеотидов из целевой последовательности, представленной в Таблице 2, SEQ ID NO: 40 - 47) в гене *CISH* в геноме, причем TALE содержит один или более сконструированных связывающих TALE доменов. В одном варианте реализации TALE представляет собой нуклеазу

25 (TALEN), которая расщепляет целевой интересующий участок в геноме, причем TALEN содержит один или более сконструированных связывающих ДНК доменов TALE и расщепляющий домен или расщепляющий полудомен из нуклеазы. Расщепляющие домены и расщепляющие полудомены можно получить, например, из различных эндонуклеаз рестрикции и/или хоминг-

30 эндонуклеаз (мегануклеаз). В одном варианте реализации расщепляющие полудомены получают из эндонуклеазы рестрикции типа IIS (например, *FokI*). В других вариантах реализации расщепляющий домен получают из мегануклеазы, указанный домен мегануклеазы также может проявлять способность связывания ДНК.

[0023] В другом аспекте в данной заявке описана система CRISPR/Cas, которая связывается с целевым сайтом в гене *CISH* в геноме, причем система CRISPR/Cas содержит одну или более сконструированных одиночных направляющих РНК или ее функциональных эквивалентов, а также нуклеазу Cas9. В некоторых вариантах реализации одиночная направляющая РНК (онРНК) связывается с последовательностью, содержащей 9, 12 или более смежных нуклеотидов из целевого сайта, представленного в Таблице 2 (SEQ ID NO: 40 - 47).

[0024] Нуклеазы (например, ZFN, система CRISPR/Cas, Ttago и/или TALEN), описанные в данной заявке, могут связывать и/или расщеплять интересующий участок в кодирующей или не кодирующей области внутри или рядом с геном *CISH*, такой как, например, лидерная последовательность, трейлерная последовательность или интрон, или в нетранскрибируемой области либо против хода транскрипции, либо по ходу транскрипции от кодирующей области.

[0025] В другом аспекте в данной заявке описан полинуклеотид, кодирующий одну или более нуклеаз (например, ZFN, системы CRISPR/Cas, Ttago и/или TALEN, описанные в данной заявке). Полинуклеотид может представлять собой, например, мРНК. В некоторых аспектах мРНК можно химически модифицировать (см., например, Kormann и др. (2011) *Nature Biotechnology* 29(2):154-157).

[0026] В другом аспекте в данной заявке описан вектор экспрессии ZFN, системы CRISPR/Cas, Ttago и/или TALEN, содержащий полинуклеотид, кодирующий одну или более нуклеаз (например, ZFN, системы CRISPR/Cas, Ttago и/или TALEN), описанных в данной заявке, функционально связанный с промотором. В одном варианте реализации вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор (например, вектор AAV). В одном аспекте вирусный вектор проявляет тканеспецифичный тропизм.

[0027] В другом аспекте в данной заявке описана клетка-хозяин, содержащая один или более векторов экспрессии нуклеазы (например, ZFN, системы CRISPR/Cas, Ttago и/или TALEN).

[0028] В другом аспекте предложены фармацевтические композиции, содержащие вектор экспрессии, описанный в данной заявке. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция может содержать более чем

один вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит первый вектор экспрессии, содержащий первый полинуклеотид, и второй вектор экспрессии, содержащий второй полинуклеотид. В некоторых вариантах реализации первый полинуклеотид и второй полинуклеотид различны. В некоторых вариантах реализации первый полинуклеотид и второй полинуклеотид по существу одинаковы. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать донорную последовательность (например, трансген, кодирующий белок, который отсутствует или дефектный при заболевании или расстройстве, таком как LSD или гемофилия). В некоторых вариантах реализации донорная последовательность связана с вектором экспрессии.

[0029] В некоторых вариантах реализации предложен слитый белок, содержащий домен, связывающий ДНК *CISH* (например, белок с цинковыми пальцами, или TALE, или онРНК, или мегануклеаза), и дикого типа или сконструированный расщепляющий домен или расщепляющий полудомен.

[0030] Нуклеазы, описанные в данной заявке, могут связываться с геном *CISH* и/или расщеплять его внутри кодирующей области гена или в некодирующей последовательности внутри или рядом с геном, такой как, например, лидерная последовательность, трейлерная последовательность или интрон, или внутри нетранскрибируемой области, либо против хода транскрипции, либо по ходу транскрипции от кодирующей области. В некоторых вариантах реализации нуклеазы связываются с целевым сайтом из 9 - 20 или более нуклеотидов внутри последовательностей *CISH*, представленных в Таблице 2.

[0031] В другом аспекте в данной заявке описаны композиции, содержащие одну или более нуклеаз (например, ZFN, TALEN, TtAgo и/или системы CRISPR/Cas), описанных в данной заявке, включая нуклеазу, содержащую связывающую ДНК молекулу (например, ZFP, TALE, онРНК и т.д.) и домен нуклеазы (расщепляющий). В некоторых вариантах реализации композиция содержит одну или более нуклеаз в комбинации с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. В некоторых вариантах реализации композиция содержит два или более наборов (пар) нуклеаз, каждый набор с отличной специфичностью. В других аспектах композиция содержит различные типы нуклеаз. В некоторых вариантах реализации композиция содержит

полинуклеотиды, кодирующие *CISH*-нуклеазы, тогда как в других вариантах реализации композиция содержит белки *CISH*-специфичных нуклеаз. В других дополнительных вариантах реализации композиция содержит одну или более донорных молекул, например, доноры, которые кодируют функциональный(-е)

5 белок(-ки) *CISH*, включая любой его функциональный фрагмент. В предпочтительных вариантах реализации донор содержит последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) и/или другой иммуномодулирующий(-е) белок(-ки), такую как сконструированный или экзогенный ген Т-клеточного рецептора (TCR), ген, кодирующий

10 последовательность ACTR, ген бета-2-микроглобулина (B2M) и/или слитый белок, содержащий B2M и HLA-E и/или HLA-G. В других аспектах донор содержит корректирующую последовательность, которая встраивается в мутантный ген *CISH* в клетке, так что данная клетка экспрессирует функциональный *CISH*.

15 **[0032]** В другом аспекте в данной заявке описан полинуклеотид, кодирующий одну или более нуклеаз или компонентов нуклеаз (например, ZFN, TALEN, TtAgo или нуклеазные домены из системы CRISPR/Cas), описанных в данной заявке. Полинуклеотид может представлять собой, например, мРНК или ДНК. В некоторых аспектах мРНК можно химически модифицировать (см.,

20 например, Korgmann и др. (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 дополнительных вариантах реализации мРНК может содержать смесь немодифицированных и модифицированных нуклеотидов (см. публикацию заявки на патент США № 2012/0195936). В другом аспекте в данной

25 заявке описан вектор экспрессии нуклеазы, содержащий полинуклеотид, кодирующий одну или более из ZFN, TALEN, TtAgo или системы CRISPR/Cas, описанных в данной заявке, функционально связанный с промотором. В одном варианте реализации вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор, например, вектор AAV.

30 **[0033]** В другом аспекте в данной заявке описана клетка-хозяин, содержащая одну или более нуклеаз, один или более векторов экспрессии нуклеаз и/или один или более доноров, описанных в данной заявке. В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин содержит вставку и/или делецию, которая инактивирует ген *CISH*, например, происходит инактивация путем НГСК

(инделы) после расщепления нуклеазой или инактивация путем вставки одной или более экзогенных последовательностей (например, трансгенов) после расщепления. В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин содержит мутантный вариант одного или более генов (например, гена *CISH*), так что

5 встраивание экзогенной последовательности, опосредованное *CISH*-специфичной нуклеазой, приводит к образованию функционального варианта белка CISH. Клетку-хозяина можно стабильно трансформировать или временно трансфицировать, или использовать комбинацию указанных способов, одним или более векторами экспрессии нуклеаз. В одном варианте реализации клетка-

10 хозяин представляет собой эффекторную Т-клетку, регуляторную Т-клетку или стволовую клетку, например, гемопоэтическую стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку. В других вариантах реализации один или более векторов экспрессии нуклеаз экспрессируют одну или более нуклеаз в клетке-хозяине. В другом варианте реализации клетка-хозяин

15 может дополнительно содержать экзогенную полинуклеотидную донорную последовательность (например, кодирующую белок CISH). В любом из вариантов реализации, описанных в данной заявке, клетка-хозяин может включать клетку зародыша, например, одну или более клеток зародыша мыши, крысы, кролика или другого млекопитающего (например, отличного от человека

20 примата). В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин включает ткань. Также предложены клетки или линии клеток, происходящие из клеток, описанных в данной заявке, включая плюрипотентные, тотипотентные, мультипотентные или дифференцированные клетки, содержащие модификацию (например, встроенную донорную последовательность) в эндогенном гене *CISH*

25 (например, экзоне 2 или 3 эндогенного гена *CISH*). В некоторых вариантах реализации в данной заявке предложены дифференцированные клетки, описанные в данной заявке, содержащие модификацию (например, встроенную донорную последовательность) в эндогенном гене *CISH* (например, экзоне 2 или экзоне 3 эндогенного *CISH*), причем указанные дифференцированные клетки

30 происходят из стволовой клетки, описанной в данной заявке.

[0034] В другом аспекте в данной заявке описан способ расщепления гена CISH в клетке, указанный способ включает: (а) введение в клетку одного или более полинуклеотидов, кодирующих одну или более нуклеаз, которые нацелены на один или более генов *CISH*, при таких условиях, что нуклеаза(-ы)

экспрессируется(-ются) и один или более генов *CISH* расщепляются. В некоторых вариантах реализации после расщепления нуклеазой геномную последовательность в целевом гене *CISH* расщепляют, например, применяя нуклеазу (или вектор, кодирующий нуклеазу), описанную в данной заявке, и «донорную» последовательность встраивают в ген с последующим целевым расщеплением с помощью ZFN, TALEN, TtAgo или системы CRISPR/Cas, так что донорная последовательность экспрессируется в клетке. Донорная последовательность может кодировать функциональный белок *CISH*. В некоторых вариантах реализации донорная последовательность содержит часть последовательности гена *CISH*. В предпочтительных вариантах реализации донор содержит иммуномодулирующую молекулу, такую как химерный антигенный рецептор (CAR). Более того, донорная последовательность может присутствовать в системе доставки нуклеазы (например, невирусном векторе, липидной наночастице (LNP) или вирусном векторе), присутствовать в отдельном механизме доставки (например, нуклеаза доставляется в форме мРНК в виде голого полинуклеотида или посредством доставки LNP, и донор доставляется с применением вирусного вектора, такого как AAV), или, в качестве альтернативы, ее можно ввести в клетку, применяя отдельный и/или отличный механизм доставки нуклеиновых кислот. Встраивание донорной последовательности нуклеотидов в локус *CISH* может привести к экспрессии трансгена под контролем эндогенных генетических контролирующих элементов *CISH*, соответственно. В некоторых аспектах встраивание интересующего трансгена приводит к экспрессии интактной экзогенной белковой последовательности и к отсутствию каких-либо кодируемых *CISH* аминокислот. В других аспектах экспрессированный экзогенный белок представляет собой слитый белок и содержит аминокислоты, кодируемые трансгеном и геном *CISH*. В некоторых случаях последовательности *CISH* будут присутствовать на амино(N)-концевой части экзогенного белка, тогда как в других последовательности *CISH* будут присутствовать на карбокси(C)-концевой части экзогенного белка. В других случаях последовательности *CISH* будут присутствовать на обоих N- и C-концевых частях экзогенного белка. Донор также может представлять собой «корректирующую» последовательность, которая встраивается в мутантный эндогенный ген *CISH*, который не экспрессирует белок

CISH (или экспрессирует его на уровнях, ниже нормальных уровней дикого типа), так что экспрессия CISH восстанавливается.

[0035] В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены способы и композиции, которые можно применять для экспрессии трансгена под контролем промотора *CISH in vivo*. В некоторых аспектах трансген может кодировать интересующий терапевтический белок. Трансген может кодировать белок, так что способы согласно настоящему изобретению можно применять для замещения белка. В некоторых аспектах трансген кодирует белок, который модулирует способность к ответу Т-клеток и лечит и/или предотвращает рак или иммуноопосредованное состояние.

[0036] В некоторых вариантах реализации сайт нацеливания и/или расщепления нуклеазой находится в экзоне гена *CISH*, так что трансген (например, CAR, TCR дикого типа и сконструированные, такие как ACTR) встраивается в область экзона *CISH*, например, в экзон 2 или экзон 3. Трансген может находиться под контролем другого интересующего эндогенного или экзогенного промотора *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*, где указанный экзогенный промотор запускает экспрессию трансгена. Таким образом, указанные генетически модифицированные клетки, описанные в данной заявке, содержащие экспрессируемый трансген (с эндогенного или экзогенного промотора), можно применять в способах *in vitro* для получения белка (с трансгена) в культуре клеток (указанный белок можно выделить) или в способах *ex vivo* (клеточной терапии) для обеспечения белка нуждающемуся в этом субъекту (например, белка CAR субъекту с раком или обеспечения белка, который аберрантно экспрессируется или не экспрессируется у субъекта).

[0037] В другом аспекте предложен способ модификации эндогенного гена, указанный способ включает введение в клетку одного или более полинуклеотидов, кодирующих одну или более нуклеаз (например, ZFN, TALEN, TtAgo, систему CRISPR/Cas), в присутствии одной или более донорных последовательностей, кодирующих белок CISH, так что донор встраивается в эндогенный ген, на который нацелена нуклеаза. Встраивание одной или более донорных молекул происходит посредством направляемой гомологией репарации (НГР) или посредством репарации, связанной с негомологичным соединением концов (НГСК). В некоторых вариантах реализации применяют

одну или более пар нуклеаз, указанные нуклеазы могут кодироваться одинаковыми или различными нуклеиновыми кислотами.

[0038] В другом дополнительном аспекте в настоящей заявке предложена клетка (например, эффекторная Т-клетка, регуляторная Т-клетка или стволовая клетка), содержащая генетически модифицированный ген *CISH*. В некоторых вариантах реализации генетически модифицированная клетка содержит генетическую модификацию в экзоне 2 и/или экзоне 3 гена *CISH*, например, модификацию, созданную нуклеазой. В некоторых вариантах реализации генетически модифицированный ген *CISH* содержит одну или более вставок и/или делеций (известных как инделы) после расщепления нуклеазой, направленной на целевой сайт из 9 - 20 пар оснований с последовательностью, представленной в Таблице 2, в гене *CISH*, причем указанный ген инактивируется после расщепления нуклеазой. Указанные генетические модификации могут находиться внутри целевого(-ых) сайта(-ов) и/или сайта(-ов) расщепления и/или в пределах 1 - 50 пар оснований от края целевого сайта. В других вариантах реализации модификация включает вставку экзогенной последовательности, например, трансгена (например, CAR, иммуномодулирующего фактора, сконструированного или экзогенного TCR или ACTR и т.д.), после расщепления нуклеазой, как описано в данной заявке. В некоторых вариантах реализации клетку получают с помощью способов, описанных в данной заявке. В других предпочтительных вариантах реализации трансген встраивается в экзон *CISH* (например, экзон 2 или 3, включая, но не ограничиваясь встраиванием в пределах 5 - 10 пар оснований от последовательности или внутрь последовательности из 9 - 20 нуклеотидов из последовательностей, представленных в Таблице 2). Клетки, содержащие встроенный трансген, могут экспрессировать трансген с эндогенного промотора (например, промотора *CISH*, соответственно), или, в качестве альтернативы, трансген может содержать регуляторные и контролирующие элементы, такие как экзогенные промоторы, которые запускают экспрессию трансгена. В некоторых вариантах реализации клетки, содержащие трансген, не содержат какие-либо последовательности вирусного вектора, встроенные в геном. Генетически модифицированные клетки, описанные в данной заявке, можно использовать для применений *in vitro*, таких как получение белка (со встроенного трансгена), и/или для обеспечения клетке или моделям на животных измененных генов *CISH*, включая применение для

скрининга молекул для применения для лечения рака или воспалительного заболевания. Кроме того, генетически модифицированные клетки, описанные в данной заявке, можно использовать для применений *in vivo*, включая, но не ограничиваясь обеспечением белка нуждающемуся в этом субъекту путем

5 обеспечения клетки (клеточная терапия *ex vivo*).

[0039] В любых из способов и композиций, описанных в данной заявке, клетки могут представлять собой любую эукариотическую клетку. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой эффекторные Т-клетки, регуляторные Т-клетки или стволовые клетки. В других вариантах реализации

10 клетки получены из пациента, например, аутологичные CD34+ (гемопозитические) стволовые клетки (например, мобилизованные у пациентов из костного мозга в периферическую кровь путем введения колониестимулирующего фактора гранулоцитов (ГКСФ)). CD34+ клетки можно собрать, очистить, культивировать, и можно ввести в клетку нуклеазы и/или
15 донора *CISH* (например, донора на основе аденовирусного вектора) с помощью любого подходящего способа.

[0040] В некоторых аспектах стволовые или зрелые клетки можно применять для клеточной терапии, например, для трансплантации Т-клеток с применением зрелых клеток. В других вариантах реализации клетки для
20 применения для трансплантации Т-клеток содержат другую интересующую генетическую модификацию. В одном аспекте Т-клетки содержат встроенный химерный антигенный рецептор (CAR), специфичный к маркеру рака. В дополнительном аспекте встроенный CAR специфичен к маркеру CD19, характерному для В-клеточных злокачественных новообразований. В некоторых
25 вариантах реализации Т-клетки содержат CAR, специфичный для аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах реализации Т-клетки представляют собой регуляторные Т-клетки и содержат CAR, полезный для предотвращения отторжения трансплантата.

[0041] В другом аспекте в способах и композициях согласно настоящему
30 изобретению предложено применение композиций (нуклеаз, фармацевтических композиций, полинуклеотидов, векторов экспрессии, клеток, линий клеток и/или животных, таких как трансгенные животные), описанных в данной заявке, например, для применения для лечения рака, такого как В-клеточные злокачественные новообразования (например, В-клеточный острый

лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), В-клеточная неходжкинская лимфома (В-НХЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и лимфома Ходжкина (Wang и др. (2017) *J. Hematol Oncol* 10(1):53), или для лечения воспалительного заболевания (например, колита, см. Blat и др. (2014) *Mol Ther* 22(5):1018-1028).

- 5 В некоторых вариантах реализации данные композиции применяют при скрининге библиотек лекарственных средств и/или других терапевтических композиций (т.е., антител, структурных молекул РНК и т.д.) для применения для лечения рака или воспалительного расстройства. Такие скрининги могут начинаться на клеточном уровне с обрабатываемых линий клеток или первичных
- 10 клеток и могут прогрессировать до уровня лечения целого животного (например, для ветеринарии или терапии человека). Таким образом, в некоторых аспектах в данной заявке предложен способ лечения и/или предотвращения рака или воспалительного состояния у нуждающегося в этом субъекта, указанный способ включает введение субъекту одной или более нуклеаз, полинуклеотидов и/или
- 15 клеток, описанных в данной заявке. Способы могут быть *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах реализации клетку, описанную в данной заявке (например, клетку, содержащую трансген, встроенный в ген *CISH*), вводят субъекту. В любом из способов, описанных в данной заявке, клетка может представлять собой стволовую клетку, полученную из субъекта (полученную из пациента
- 20 стволовую клетку).

- [0042]** В любых из композиций и способов, описанных в данной заявке, нуклеазы вводят в форме мРНК и/или применяя один или более невирусных, LNP или вирусных векторов. В некоторых вариантах реализации нуклеазу(-ы) вводят в форме мРНК. В других вариантах реализации трансген вводят, применяя
- 25 вирусный вектор, например, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), включая AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV 8.2, AAV9, AAV rh10, AAV2/8, AAV2/5 и AAV2/6, или посредством лентивирусного или неспособного встраиваться лентивирусного вектора, и нуклеазу(-ы) вводят в форме мРНК. В других дополнительных вариантах реализации как нуклеазу(-ы),
- 30 так и доноры вводят, применяя один или более вирусных или невирусных векторов. Нуклеазу и донор может нести один вектор, различные векторы одинакового типа или различные векторы различных типов. В некоторых вариантах реализации нуклеазу(-ы) вводят в форме мРНК (например, путем электропорации) и донора вводят, применяя AAV (например, AAV2/6),

лентивирус или неспособный встраиваться лентивирус. В некоторых вариантах реализации донора вводят в виде одноцепочечной ДНК.

[0043] Нуклеазу(-ы) и доноров можно вводить одновременно или по порядку. При введении последовательно может пройти любой период времени (например, от секунд до часов) между введением нуклеаз и доноров. В некоторых вариантах реализации в клетку вводят доноров, а через 12 - 36 часов (или любой промежуток времени в указанном диапазоне) вводят нуклеазу(-ы). В некоторых вариантах реализации модифицированные клетки инкубируют в течение от часов до дней (или любого промежутка времени в указанном диапазоне), а затем разделяют на аликвоты и замораживают.

[0044] Любую клетку можно модифицировать, применяя композиции и способы согласно настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь перечисленными: прокариотические или эукариотические клетки, такие как клетки бактерий, насекомых, дрожжей, рыб, млекопитающих (включая отличных от человека млекопитающих) и растений. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой иммунную клетку, например, Т-клетку (например, CD4+, CD3+, CD8+ и т.д.), дендритную клетку, В-клетку или тому подобные клетки. В других вариантах реализации клетка представляет собой плюрипотентную, тотипотентную или мультипотентную стволовую клетку, например, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), гемопоэтические стволовые клетки (например, CD34+), эмбриональную стволовую клетку или тому подобные клетки. В любых из способов или композиций, описанных в данной заявке, клетка, содержащая кодирующий CISH трансген, может представлять собой стволовую клетку или клетку-предшественника. Конкретные типы стволовых клеток, которые можно применять в способах и композициях согласно настоящему изобретению, включают эмбриональные стволовые клетки (ESC), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) и гемопоэтические стволовые клетки (например, CD34+ клетки). iPSC можно получить из образцов из пациента и/или из нормальных контролей, причем полученные из пациента iPSC можно мутировать с получением нормальной последовательности гена или последовательности гена дикого типа в интересующем гене, или нормальные клетки можно изменить с получением известного аллеля заболевания в интересующем гене. Аналогично, гемопоэтические стволовые клетки можно

выделить из пациента или из донора. Данные клетки затем конструируют, чтобы они экспрессировали функциональный(-ые) белок(-и), такой как CAR, размножают, а затем вводят обратно пациенту. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой полученную из пациента

5 гемопоэтическую стволовую клетку. В других вариантах реализации клетка представляет собой 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 perC6.

10 **[0045]** Таким образом, в данной заявке предложены способы и композиции для модуляции экспрессии гена *CISH*, включая инактивацию *CISH* с экспрессией или без экзогенной последовательности (такой как CAR). Композиции и способы могут быть предназначены для применения *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo* и включают введение искусственного фактора транскрипции или

15 нуклеазы, которая содержит связывающий ДНК домен, нацеленный на ген *CISH*, необязательно в случае нуклеазы с донором, который встраивается в ген *CISH* после расщепления нуклеазой. В некоторых вариантах реализации клетка вовлечена в рак или воспалительное заболевание. В других вариантах реализации клетку модифицируют с помощью любого из способов, описанных в данной

20 заявке, и модифицированную клетку вводят нуждающемуся в этом субъекту (например, субъекту с раком или воспалительным расстройством). Также предложены генетически модифицированные клетки (например, стволовые клетки, клетки-предшественники, Т-клетки, клетки мышц и т.д.), содержащие генетически модифицированный ген *CISH* (например, экзогенную

25 последовательность), включая клетки, полученные с помощью способов, описанных в данной заявке. Данные клетки можно применять для обеспечения терапевтического(-их) белка(-ов) субъекту с раком или воспалительным заболеванием, например, путем введения клетки(-ок) нуждающемуся в этом субъекту или, в качестве альтернативы, путем выделения белка,

30 продуцированного клеткой, и введения белка нуждающемуся в этом субъекту (фермент-заместительная терапия).

[0046] Также предложен набор, содержащий нуклеиновые кислоты, белки и/или клетки согласно настоящему изобретению. Набор может содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные нуклеазы (например, молекулы

РНК или гены, кодирующие ZFN, TALEN, TtAgo или систему CRISPR/Cas, содержащиеся в подходящем векторе экспрессии), или алиquotы белков нуклеаз, донорных молекул, подходящих модификаторов стволовости, клеток, инструкции по осуществлению способов согласно настоящему изобретению, и

5 тому подобное.

[0047] Данные и другие аспекты будут сразу понятны квалифицированному специалисту в свете настоящего описания в целом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

10 [0048] На **Фигуре 1** показана частичная последовательность, содержащая экзоны 2 и 3 (заштрихованные), гена *CISH* (SEQ ID NO: 48), а также показаны примеры целевых сайтов нуклеазы (заключены в рамку) в данном гене.

[0049] На **Фигурах 2А - 2D** показан анализ FACS (сортировки клеток с возбуждением флуоресценции) Т-клеток, подвергнутых обработке в указанных

15 условиях. На **Фигуре 2А** («Ложная») показаны результаты для клеток, которые не были обработаны нуклеазными реагентами, но в остальном обработаны таким же способом, как и другие клетки. На **Фигуре 2В** («Только AAV») показаны результаты для клеток, которые получили только донора AAV-GFP. На **Фигуре 2С** («Только ZFN») показаны результаты для клеток, которые получили только

20 нацеленные на *CISH* нуклеазы (введенные в виде мРНК); и на **Фигуре 2D** («ZFN + AAV») показаны результаты для клеток, которые были подвергнуты обработке как донором AAV-GFP, так и нацеленными на *CISH* ZFN. Показано, что по меньшей мере 75% клеток, обработанных нуклеазами и донором, экспрессировали GFP, по сравнению со всеми другими условиями обработки, при

25 которых экспрессировалось небольшое количество GFP (Только AAV), или он не экспрессировался вовсе (Ложная и Только ZFN).

[0050] На **Фигуре 3** показан анализ FACS эффекторных Т-клеток, подвергнутых обработке в указанных условиях. «Донор отдельно» относится к клеткам, которые получили только донора AAV-hPGK-GFP, и «ZFN + донор»

30 относится к клеткам, подвергнутым обработке как донором AAV-hPGK-GFP, так и нацеленными на *CISH* ZFN. Показано, что ~72,6% клеток, обработанных нуклеазами и донором, экспрессировали GFP, по сравнению с клетками, обработанными донором AAV отдельно, которые вообще не экспрессировали GFP.

[0051] На **Фигуре 4** представлена диаграмма, на которой показаны результаты анализа с помощью Miseq генотипа эффекторных Т-клеток, подвергнутых обработке в указанных условиях. «Ложная» относится к клеткам, которые не обработаны нуклеазными реагентами, но в остальном обработаны таким же способом, как и другие клетки; «донор PGK-GFP» относится к клеткам, которые получили только донора AAV-hPGK-GFP; «ZFN» относятся к клеткам, в которые вводили только нацеленные на *CISH* нуклеазы в виде мРНК; и «ZFN + донор PGK-GFP» относится к клеткам, подвергнутым обработке как донором AAV-hPGK-GFP, так и нацеленными на *CISH* ZFN. Показано, что ~90% аллелей модифицированы в клетках, обработанных нуклеазами (ZFN и ZFN + донор), тогда как только в клетках, обработанных как донором AAV, так и ZFN, получили высокие уровни (~45%) направленного встраивания (НВ) донора. В группе, обработанной донором AAV отдельно или Ложной обработкой, не наблюдали детектируемых уровней модификации генома.

[0052] На **Фигуре 5** представлена диаграмма, на которой показан анализ с помощью Miseq генотипа эффекторных Т-клеток, подвергнутых обработке в указанных условиях. «Ложная» относится к клеткам, которые не обработаны нуклеазными реагентами, но в остальном обработаны таким же способом, как и другие клетки, и «ZFN + донор» относится к клеткам, подвергнутым обработке нацеленными либо на *AAVSI*, либо на *CISH* ZFN, вместе с соответствующим донором AAV-GFP. Показано, что ~50 - 60% аллелей модифицированы в клетках, обработанных нуклеазами (ZFN + донор), тогда как в Ложной группе не наблюдали детектируемых уровней модификации генома.

[0053] На **Фигуре 6** представлена диаграмма, на которой показаны функциональные данные для эффекторных Т-клеток, которые оценивали по секреции иммуностимулирующего цитокина посредством анализа Lumineх. «ZFN + донор» относится к клеткам, подвергнутым обработке нацеленными либо на *AAVSI*, либо на *CISH* ZFN, вместе с соответствующим донором AAV-GFP. Показано, что НВ трансгенного донора в *CISH* приводит к повышенной иммуностимулирующей функции (т.е., к повышенной экспрессии TNFα) эффекторных Т-клеток по сравнению с НВ в безопасный локус генома *AAVSI*, предположительно вследствие нокаута экспрессии *CISH* в большой доле клеток.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0054] В данной заявке описаны композиции и способы для направленной модификации гена *CISH*, включая модификацию посредством встраивания трансгенного белка (например, CAR, TCR, ACTR и/или любого другого терапевтического белка) в ген *CISH* клетки (например, Т-клеток или предшественников лимфоцитов, таких как CD34+ гемопоэтические стволовые клетки). Указанные способы и композиции можно применять для модификации эффекторной Т-клетки (CD4+ или CD8+) и регуляторных Т-клеток (CD4+, CD25+, CD127lo, FOXP3+). Указанные клетки подходят для инфузии пациентам, так что последующая дифференцировка *in vivo* данных предшественников в клетки, экспрессирующие функциональные белки, у субъекта с раком, воспалительным расстройством, аутоиммунным заболеванием или трансплантатом, обеспечивается клеткой, указанные клетки могут лечить и/или предотвращать заболевание у получившего их пациента. Генетически модифицированные клетки, описанные в данной заявке (например, инделы и/или трансгены в гене *CISH*), подходят для инфузии пациентам, так что последующая дифференцировка *in vivo* данных стволовых клеток в клетки, которые экспрессируют функциональный белок CISH, лечит и/или предотвращает заболевание (например, рак, воспалительные расстройства и т.д.) у пациента. Кроме того, клетки, описанные в данной заявке (популяции клеток или линии клеток), можно применять *in vitro* для получения клеток, линий клеток или моделей на животных для скрининга и/или для получения белков со встроенного трансгена, указанный белок можно выделить и применять для лечения субъекта.

[0055] В соответствии с настоящим изобретением предложена любая генетическая модификация гена *CISH*, включая, но не ограничиваясь встраиванием донора, содержащего последовательность, кодирующую любой функциональный белок, включая белки, которые лечат и/или предотвращают рак, воспалительные расстройства, аутоиммунное заболевание или отторжение трансплантата, или служат в качестве рецептора, чтобы перенаправлять Т-клетку.

Общая информация.

[0056] При осуществлении указанных способов, а также получении и применении композиций, описанных в данной заявке, используют, если не указано иначе, обычные методики молекулярной биологии, биохимии, анализа структуры хроматина, вычислительной химии, культуры клеток,

рекомбинантной ДНК и смежных областей, которые находятся в рамках компетенции в данной области. Данные методики полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, и третье издание, 2001; Ausubel и др., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, Нью-Йорк, 1987 и периодические переиздания; серия *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Academic Press, Сан-Диего; Wolffe, *CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION*, третье издание, Academic Press, Сан-Диего, 1998; *METHODS IN ENZYMOLOGY*, том 304, «Chromatin» (P.M. Wassarman и A. P. Wolffe, ред.), Academic Press, Сан-Диего, 1999; и *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, том 119, «Chromatin Protocols» (P.B. Becker, ред.) Humana Press, Тотова, 1999.

Определения.

[0057] Термины «нуклеиновая кислота», «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» используют взаимозаменяемо, и они относятся к дезоксирибонуклеотидному или рибонуклеотидному полимеру в линейной или кольцевой конформации и либо в одно-, либо в двухцепочечной форме. Для целей настоящего изобретения данные термины не должны истолковываться как ограничивающие длину полимера. В объем данных терминов могут входить известные аналоги природных нуклеотидов, а также нуклеотиды, которые модифицированы по основанию, сахарной и/или фосфатной группам (например, фосфоротиоатному остову). Обычно, аналог конкретного нуклеотида обладает такой же специфичностью спаривания оснований; т.е., аналог А будет спариваться с Т.

[0058] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используют взаимозаменяемо по отношению к полимеру из аминокислотных остатков. Термин также используют по отношению к полимерам аминокислот, в которых одна или более аминокислот представляют собой аналоги или модифицированные производные соответствующих встречающихся в природе аминокислот.

[0059] «Связывание» относится к специфичному к последовательности нековалентному взаимодействию между макромолекулами (например, между

белком и нуклеиновой кислотой). Не все компоненты связывающего взаимодействия должны быть специфичными к последовательности (например, контакты с фосфатными остатками в осто́ве ДНК), при условии, что взаимодействие в целом специфично к последовательности. Такие взаимодействия, как правило, характеризуют константой диссоциации (K_d), равной 10^{-6} M^{-1} или меньше. «Аффинность» относится к силе связывания: большая аффинность связывания коррелирует с меньшей K_d .

[0060] «Связывающий домен» представляет собой молекулу, которая способна нековалентно связываться с другой молекулой. Связывающая молекула может связываться, например, с молекулой ДНК (связывающий ДНК белок, такой как белок с цинковыми пальцами, или белок с доменом TAL-эффектора, или одиночная направляющая РНК), молекулой РНК (связывающий РНК белок) и/или молекулой белка (белок, связывающий белок). В случае связывающей белок молекулы, она может связываться сама с собой (с образованием гомодимеров, гомотримеров и т.д.) и/или она может связываться с одной или более молекулами отличного белка или белков. Связывающая молекула может обладать более чем одним типом связывающей активности. Например, белки с цинковыми пальцами обладают ДНК-связывающей, РНК-связывающей и белок-связывающей активностью. Таким образом, связывающие ДНК молекулы, включая связывающие ДНК компоненты искусственных нуклеаз и факторов транскрипции, включают, но не ограничены перечисленными: ZFP, TALE и онРНК.

[0061] «Связывающий ДНК белок с цинковыми пальцами» (или связывающий домен) представляет собой белок, или домен внутри большего белка, который связывает ДНК специфичным к последовательности образом посредством одного или более цинковых пальцев, которые представляют собой участки последовательности аминокислот внутри связывающего домена, структура которого стабилизирована посредством координации иона цинка. Термин «связывающий ДНК белок с цинковыми пальцами» часто сокращают до «белок с цинковыми пальцами» или «ZFP». Искусственные нуклеазы и факторы транскрипции могут содержать связывающий ДНК домен ZFP и функциональный домен (нуклеазный домен для ZFN или регулирующий транскрипцию домен для ZFP-TF). Термин «нуклеаза с цинковыми пальцами» включает как один ZFN, так и пару ZFN (представителей пары называют «левым и правым», или «первым и вторым», или «парой»), которые димеризуются, чтобы расщепить целевой ген.

[0062] «Связывающий ДНК домен TALE» или «TALE» представляет собой полипептид, содержащий один или более повторяющихся доменов/звеньев TALE. Повторяющиеся домены участвуют в связывании TALE с распознаваемой ею целевой последовательностью ДНК. Одно «повторяющееся звено» (также называют «повтором») обычно имеет длину 33 - 35 аминокислот и проявляет по меньшей мере некоторую гомологию последовательности с другими повторяющимися последовательностями TALE внутри встречающегося в природе белка TALE. См., например, патенты США № 8,586,526 и 9,458,205. Искусственные нуклеазы и факторы транскрипции могут содержать связывающий ДНК домен TALE и функциональный домен (нуклеазный домен для TALEN или регулирующий транскрипцию домен для TALEN-TF). Термин «TALEN» включает как один TALEN, так и пару TALEN (представителей пары называют «левым и правым», или «первым и вторым», или «парой»), которые димеризуются, чтобы расщепить целевой ген.

[0063] Связывающие домены с цинковыми пальцами и TALE можно «сконструировать» таким образом, чтобы они связывались с заранее определенной последовательностью нуклеотидов, например, путем конструирования (изменения одной или более аминокислот) участка распознающей спирали встречающегося в природе белка с цинковыми пальцами или белка TALE. Следовательно, сконструированные связывающие ДНК белки (с цинковыми пальцами или TALE) представляют собой белки, которые не встречаются в природе. Лишь некоторыми из примеров способов конструирования связывающих ДНК белков являются разработка и селекция. Разработанный связывающий ДНК белок представляет собой белок, не встречающийся в природе, дизайн/состав которого, главным образом, является результатом рационалистических критериев. Рационалистические критерии для разработки включают применение правил замен и компьютеризированных алгоритмов для обработки сведений в базе данных, в которой хранятся сведения о существующих разработанных ZFP и/или TALE и данные об их связывании. См., например, патенты США № 6,140,081; 6,453,242; 6,534,261; и 8,585,526; см. также публикации международных заявок на патент № WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496.

[0064] «Прошедший селекцию» белок с цинковыми пальцами или TALE представляет собой не встречающийся в природе белок, получение которого, главным образом, происходит в результате эмпирического процесса, такого как

фаговый дисплей, основанная на взаимодействии ловушка или гибридная селекция. См., например, патенты США № 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; 8,586,526; и публикации международных заявок на патент № WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; 5 WO 01/60970; WO 01/88197 и WO 02/099084.

[0065] «TtAgo» представляет собой прокариотический белок Argonaute, который считают участвующим в замалчивании генов. TtAgo получают из бактерий *Thermus thermophilus*. См., например, Swarts и др., там же, G. Sheng и др. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 652. «Система TtAgo» представляет 10 собой все необходимые компоненты, включая, например, направляющие ДНК для расщепления ферментом TtAgo.

[0066] «Рекомбинация» относится к процессу обмена генетической информацией между двумя полинуклеотидами, включая, но не ограничиваясь захватом донора путем нехомологичного соединения концов (НГСК) и 15 гомологичной рекомбинации. Для целей настоящего изобретения «гомологичная рекомбинация (ГР)» относится к специализированной форме такого обмена, который происходит, например, во время репарации двухцепочечных разрывов в клетках посредством механизмов направляемой гомологией репарации. Для данного процесса требуется гомология последовательности нуклеотидов, 20 использование «донорной» молекулы в качестве матрицы для репарации «целевой» молекулы (т.е., молекулы, которая претерпела двухцепочечный разрыв), и данный процесс известен под такими различными названиями как «конверсия гена без кроссинговера» или «конверсия короткого участка гена», так как он приводит к переносу генетической информации от донора к мишени. Без 25 привязки к какой-либо конкретной теории, такой перенос может включать коррекцию несовпадения в гетеродуплексной ДНК, которое образуется между сломанной мишенью и донором, и/или «синтез-зависимый отжиг цепи», при которой донора используют для ресинтезирования генетической информации, которая станет частью мишени, и/или связанных процессов. Такая 30 специализированная ГР часто приводит к изменению последовательности целевой молекулы, так что часть или вся последовательность донорного полинуклеотида встроена в целевой полинуклеотид.

[0067] В способах согласно настоящему описанию одна или более нацеленных нуклеаз, описанных в данной заявке, создают двухцепочечный

- разрыв (ДЦР) в целевой последовательности (например, клеточном хроматине) в заранее определенном сайте. ДЦР может приводить к делециям и/или вставкам посредством механизмов направляемой гомологией репарации или направляемой не гомологией репарации. Делеции могут содержать любое количество пар оснований. Аналогично, вставки могут содержать любое количество пар оснований, включая, например, встраивание «донорного» полинуклеотида, необязательного гомологичного последовательности нуклеотидов на участке разрыва. Донорная последовательность может встраиваться физически, или, в качестве альтернативы, донорный полинуклеотид используется в качестве матрицы для репарации разрыва посредством гомологичной рекомбинации, приводя к внедрению всей или части последовательности нуклеотидов, как в доноре, в клеточный хроматин. Таким образом, первую последовательность в клеточном хроматине можно изменить и, в некоторых вариантах реализации, можно превратить в последовательность, присутствующую в донорном полинуклеотиде. Таким образом, использование терминов «заменить» или «замена» можно понимать как описание замещения одной последовательности нуклеотидов на другую (т.е., замещение последовательности в информационном смысле), и не требует обязательного физического или химического замещения одного полинуклеотида другим.
- 20 **[0068]** В любом из способов, описанных в данной заявке, можно использовать дополнительную пару белков с цинковыми пальцами, TALEN, TtAgo или систем CRISPR/Cas для дополнительного двухцепочечного расщепления дополнительных целевых сайтов в клетке.
- 25 **[0069]** Любой из способов, описанных в данной заявке, можно применять для встраивания донора любого размера и/или частичной или полной инактивации одной или более целевых последовательностей в клетке путем направленного встраивания донорной последовательности, которая нарушает экспрессию интересующего(-их) гена(-ов). Также предложены линии клеток с частично или полностью инактивированными генами.
- 30 **[0070]** В любом из способов, описанных в данной заявке, экзогенная последовательность нуклеотидов («донорная последовательность» или «трансген») может содержать последовательности, которые гомологичны, но не идентичны геномным последовательностям на интересующем участке, тем самым стимулируя гомологичную рекомбинацию к встраиванию неидентичной

последовательности в интересующий участок. Таким образом, в некоторых вариантах реализации части донорной последовательности, которые гомологичны последовательностям на интересующем участке, проявляют идентичность от приблизительно 80 до 99% (или любое целое число между ними)

5 геномной последовательности, которая замещается. В других вариантах реализации гомология между донором и геномной последовательностью выше 99%, например, если только 1 нуклеотид отличается между донором и геномными последовательностями из более 100 смежных пар оснований. В некоторых случаях негомологичная часть донорной последовательности может
10 содержать последовательности, не присутствующие в интересующем участке, так что в интересующий участок встраивают новые последовательности. В данных случаях негомологичная последовательность, как правило, фланкирована последовательностями из 50 - 1000 пар оснований (или любое целое значение между ними) или любого количества пар оснований более 1000, которые
15 гомологичны или идентичны последовательностям в интересующем участке. В других вариантах реализации донорная последовательность не гомологична первой последовательности, и ее встраивают в геном с помощью механизмов негомологичной рекомбинации.

[0071] «Расщепление» относится к разрыву ковалентного каркаса
20 молекулы ДНК. Расщепление можно вызвать различными способами, включая, но не ограничиваясь ферментативным или химическим гидролизом фосфодиэфирной связи. Возможно как одноцепочечное расщепление, так и двухцепочечное расщепление, и двухцепочечное расщепление может происходить в результате двух различных событий одноцепочечного
25 расщепления. Расщепление ДНК может привести к получению либо тупых концов, либо ступенчатых концов. В некоторых вариантах реализации слитые полипептиды применяют для направленного расщепления двухцепочечной ДНК.

[0072] «Расщепляющий полудомен» представляет собой полипептидную последовательность, которая вместе со вторым полипептидом (либо
30 идентичным, либо отличным) образует комплекс, обладающий активностью расщепления (предпочтительно активностью двухцепочечного расщепления). Термины «первый и второй расщепляющие полудомены», «+ и – расщепляющие полудомены» и «правый и левый расщепляющие полудомены» используют

взаимозаменяемо по отношению к паре расщепляющих полудоменов, которые димеризуются.

[0073] «Сконструированный расщепляющий полудомен» представляет собой расщепляющий полудомен, который был модифицирован таким образом, чтобы образовывать обязательные гетеродимеры с другим расщепляющим полудоменом (например, другим сконструированным расщепляющим полудоменом). См. также патенты США № 8,623,618; 7,888,121; 7,914,796 и 8,034,598, описания которых полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

[0074] Термин «последовательность» относится к последовательности нуклеотидов любой длины, которая может представлять собой ДНК или РНК; может быть линейной, кольцевой или разветвленной и может быть либо одноцепочечной, либо двухцепочечной. Термин «донорная последовательность» относится к последовательности нуклеотидов, которую встраивают в геном.

Донорная последовательность может быть любой длины, например, длиной от 2 до 100000000 нуклеотидов (или любое целое значение между ними, или больше), предпочтительно длиной приблизительно от 100 до 100000 нуклеотидов (или любое целое число между ними), более предпочтительно длиной приблизительно от 2000 до 20000 нуклеотидов (или любое значение между ними) и еще более предпочтительно приблизительно от 5 до 15 т.п.н. (или любое значение между ними).

[0075] «Хроматин» представляет собой нуклеопротеиновую структуру, содержащую геном клетки. Клеточный хроматин содержит нуклеиновую кислоту, главным образом, ДНК, и белок, включая гистоны и негистонные хромосомные белки. Большая часть эукариотического клеточного хроматина находится в виде нуклеосом, причем нуклеосомное ядро содержит приблизительно 150 пар оснований ДНК, связанных с октамером, содержащим по два каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4; и линкерная ДНК (различной длины в зависимости от организма) протягивается между нуклеосомными ядрами. Молекула гистона H1, как правило, связана с линкерной ДНК. Для целей настоящего изобретения подразумевают, что в объем термина «хроматин» входят все типы клеточных нуклеопротеинов, как прокариотических, так и эукариотических. Клеточный хроматин включает как хромосомный, так и эписомный хроматин.

[0076] «Хромосома» представляет собой комплекс хроматина, содержащий весь или часть генома клетки. Геном клетки часто характеризуют по его кариотипу, который представляет собой набор всех хромосом, которые содержат геном клетки. Геном клетки может включать одну или более хромосом.

5 **[0077]** «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 некоторые вирусные геномы.

[0078] «Доступный участок» представляет собой сайт в клеточном хроматине, в котором целевой сайт, присутствующий в нуклеиновой кислоте, может быть связан экзогенной молекулой, которая распознает целевой сайт. Без привязки к какой-либо конкретной теории, полагают, что доступный участок представляет собой участок, который не упакован в нуклеосомную структуру. Определенную структуру доступного участка часто можно обнаружить по его
10 чувствительности к химическим и ферментативным зондам, например, нуклеазам.

[0079] «Целевой сайт» или «целевая последовательность» представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая определяет часть нуклеиновой кислоты, с которой будет связываться молекула, при условии
20 наличия достаточных условий для связывания. Целевые сайты могут быть любой длины, например, от 9 до 20 или более нуклеотидов длиной, и связанные нуклеотиды могут быть смежными или несмежными.

[0080] «Экзогенная» молекула представляет собой молекулу, которая обычно не присутствует в клетке, но которую можно внедрить в клетку с
25 помощью одного или более генетических, биохимических или других способов. «Нормальное присутствие в клетке» определяют, учитывая конкретную стадию развития клетки и условия окружающей среды. Таким образом, например, молекула, которая присутствует только во время эмбрионального развития мышцы, представляет собой экзогенную молекулу по отношению к клетке
30 мышцы взрослого субъекта. Аналогично, молекула, индуцированная тепловым шоком, представляет собой экзогенную молекулу по отношению к клетке, не подвергнутой тепловому шоку. Экзогенная молекула может включать, например, функционирующий вариант неправильно функционирующей эндогенной

молекулы или неправильно функционирующий вариант нормально функционирующей эндогенной молекулы.

[0081] Экзогенная молекула может представлять собой, среди прочего, низкомолекулярное соединение, такое как полученное с помощью процесса комбинаторной химии, или макромолекулу, такую как белок, нуклеиновая кислота, углевод, липид, гликопротеин, липопротеин, полисахарид, любое модифицированное производное указанных выше молекул, или любой комплекс, содержащий одну или более из указанных выше молекул. Нуклеиновые кислоты включают ДНК и РНК, могут быть одно- или двухцепочечными; могут быть линейными, разветвленными или кольцевыми; и могут быть любой длины. Нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, способные образовывать дуплексы, а также нуклеиновые кислоты, способные образовывать триплекс. См., например, патенты США № 5,176,996 и 5,422,251. Белки включают, но не ограничены перечисленными: связывающие ДНК белки, факторы транскрипции, факторы ремоделирования хроматина, метилированные связывающие ДНК белки, полимеразы, метилазы, деметилазы, ацетилазы, деацетилазы, киназы, фосфатазы, интегразы, рекомбиназы, лигазы, топоизомеразы, гиразы и геликазы.

[0082] Экзогенная молекула может относиться к тому же типу молекул, что и эндогенная молекула, например, экзогенный белок или нуклеиновая кислота. Например, экзогенная нуклеиновая кислота может включать инфицирующий вирусный геном, плазмиду или эписому, внедренные в клетку, или хромосому, которые в норме не присутствуют в клетке. Способы внедрения экзогенных молекул в клетки известны специалистам в данной области и включают, но не ограничены перечисленными: липид-опосредованный перенос (т.е., липосомы, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние клеток, бомбардировку частицами, осаждение фосфатом кальция, опосредованный диэтиламиноэтилдекстраном перенос и опосредованный вирусным вектором перенос. Экзогенная молекула также может представлять собой тот же тип молекул, что и эндогенная молекула, но полученный из вида, отличного от вида, из которого получена указанная клетка. Например, последовательность нуклеиновой кислоты человека можно внедрить в линию клеток, изначально полученную из мыши или хомяка.

[0083] Напротив, «эндогенная» молекула представляет собой молекулу, которая обычно присутствует в конкретной клетке на конкретной стадии развития при определенных условиях окружающей среды. Например, эндогенная нуклеиновая кислота может включать хромосому, геном митохондрии, хлоропласта или другой органеллы, или встречающуюся в природе эписомную нуклеиновую кислоту. Дополнительные эндогенные молекулы могут включать белки, например, факторы транскрипции и ферменты.

[0084] В данной заявке термин «продукт экзогенной нуклеиновой кислоты» включает как полинуклеотидные, так и полипептидные продукты, например, продукты транскрипции (полинуклеотиды, такие как РНК) и продукты трансляции (полипептиды).

[0085] «Слитая» молекула представляет собой молекулу, в которой связаны две или более молекул субъединиц, предпочтительно ковалентно. Молекулы субъединиц могут относиться к одному химическому типу молекул или могут относиться к различным химическим типам молекул. Примеры первого типа слитой молекулы включают, но не ограничены перечисленными: слитые белки (например, слитые связывающий ДНК домен ZFP или TALE и один или более активирующих доменов) и слитые нуклеиновые кислоты (например, нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, описанный выше). Примеры второго типа слитой молекулы включают, но не ограничены слитой образующей триплекс нуклеиновой кислотой и полипептидом, и слитым белком, связывающимся с малой бороздкой, и нуклеиновой кислотой.

[0086] Экспрессия слитого белка в клетке может происходить в результате доставки слитого белка в клетку или в результате доставки в клетку полинуклеотида, кодирующего указанный слитый белок, причем полинуклеотид транскрибируется и транскрипт транслируется с образованием слитого белка. Транс-сплайсинг, расщепление полипептида и лигирование полипептида также могут быть вовлечены в экспрессию белка в клетке. Способы доставки полинуклеотида и полипептида в клетки представлены в других местах в настоящем описании.

[0087] «Ген» для целей настоящего изобретения включает участок ДНК, кодирующий продукт гена (см. выше), а также все участки ДНК, которые регулируют образование продукта гена, независимо от того, расположены ли такие регуляторные последовательности в непосредственной близости к

кодирующим и/или транскрибируемым последовательностям. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничен перечисленными: промоторные последовательности, терминаторы, регулирующие трансляцию последовательности, такие как участки связывания рибосомы и внутренние участки посадки рибосомы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, точки начала репликации, участки прикрепления к матриксу и регуляторные области локусов.

[0088] «Экспрессия генов» относится к переводу информации, содержащейся в гене, в продукт гена. Продукт гена может представлять собой непосредственный продукт транскрипции гена (например, мРНК, тРНК, рРНК, антисмысловую РНК, рибозим, структурную РНК или любой другой тип РНК) или белок, полученный путем трансляции мРНК. Продукты гена также включают молекулы РНК, которые модифицированы с помощью таких процессов, как кэпирование, полиаденилирование, метилирование и редактирование, и белки, модифицированные, например, путем метилирования, ацетилирования, фосфорилирования, убиквитинирования, АДФ-рибозилирования, миристилирования и гликозилирования.

[0089] «Модуляция» экспрессии генов относится к изменению активности гена. Модуляция экспрессии может включать, но не ограничена активацией гена и репрессией гена. Редактирование генома (например, расщепление, изменение, инактивация, случайная мутация) можно применять для модуляции экспрессии. Инактивация гена относится к любому снижению экспрессии генов по сравнению с клеткой, которая не содержит ZFP, TALE, TtAgo или систему CRISPR/Cas, описанные в данной заявке. Таким образом, инактивация гена может быть частичной или полной.

[0090] «Интересующий участок» представляет собой любой участок хроматина клетки, такой как, например, ген или некодирующая последовательность внутри или рядом с геном, с которым желательно связать экзогенную молекулу. Связывание может быть с целью направленного расщепления ДНК и/или направленной рекомбинации. Интересующий участок может присутствовать, например, в хромосоме, эписоме, геноме органеллы (например, митохондрии, хлоропласта) или геноме инфицирующего вируса. Интересующий участок может находиться внутри кодирующей области гена, внутри транскрибируемых некодирующих областей, таких как, например,

лидерные последовательности, трейлерные последовательности или интроны, или внутри нетранскрибируемых участков, либо против хода транскрипции, либо по ходу транскрипции от кодирующей области. Интересующий участок может быть настолько малым как одна пара нуклеотидов, или его длина может

5 составлять 2000 пар нуклеотидов или любое целое значение пар нуклеотидов.

[0091] «Эукариотические» клетки включают, но не ограничены клетками грибов (таких как дрожжи), клетками растений, клетками животных, клетками млекопитающих и клетками человека (например, Т-клетками), включая стволовые клетки (плюрипотентные и мультипотентные).

10 **[0092]** «Эффекторная Т-клетка» (Teff) представляет собой CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетку, которая незамедлительно отвечает на стимул. Данные клетки играют центральную роль в опосредованном клетками иммунитете после дифференцировки. Т-клетки активируются после стимуляции антигенпредставляющей клеткой и дифференцируются в эффекторные Т-клетки,

15 которые осуществляют важные эффекторные функции, такие как продукция цитотоксических молекул и антител. Эффекторные Т-клетки мигрируют в очаг воспаления (например, инфекции) и продуцируют хемокины, чтобы привлечь дополнительные иммунные клетки.

[0093] «Регуляторная Т-клетка» (Treg) также известна как супрессорная

20 Т-клетка и представляет собой субпопуляцию Т-клеток, которые модулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к собственным антигенам и предотвращают аутоиммунное заболевание. Treg являются иммуносупрессорными и, как правило, подавляют или понижающим образом регулируют индукцию и пролиферацию эффекторных Т-клеток. Treg являются

25 CD4⁺, CD25⁺, CD127^{lo} и FOXP3⁺.

[0094] Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному из того же индивида, которому его позже будут обратно вводить.

[0095] Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному из отличного индивида того же вида, что и индивид, которому

30 указанный материал вводят. Двух или более индивидов называют аллогенными друг для друга, когда гены в одном или более локусах не идентичны. В некоторых аспектах аллогенный материал из индивидов одного вида может быть достаточно непохож генетически, чтобы взаимодействовать антигенно.

[0096] Термины «функциональная связь» и «функционально связанный» (или «эффективно связанный») используют взаимозаменяемо по отношению к сосуществованию двух или более компонентов (таких как элементы последовательности), при котором компоненты расположены так, что оба компонента нормально функционируют и обеспечивают возможность того, что по меньшей мере один из компонентов может опосредовать функцию, которая действует на по меньшей мере один из других компонентов. В качестве примера, регулирующая транскрипцию последовательность, такая как промотор, функционально связана с кодирующей последовательностью, если указанная регулирующая транскрипцию последовательность контролирует уровень транскрипции кодирующей последовательности в ответ на присутствие или отсутствие одного или более регулирующих транскрипцию факторов. Регулирующая транскрипцию последовательность, как правило, функционально связана в цис-положении относительно кодирующей последовательности, но не обязательно должна быть расположена непосредственно рядом с ней. Например, энхансер представляет собой регулирующую транскрипцию последовательность, которая функционально связана с кодирующей последовательностью, даже несмотря на то, что они не смежные.

[0097] В отношении слитых полипептидов термин «функционально связанный» может относиться к тому факту, что каждый из компонентов выполняет ту же функцию в связи с другим компонентом, какую он бы выполнял, не будучи связанным таким образом. Например, в отношении слитого полипептида, в котором связывающий ДНК домен ZFP, TALE, TtAgo или Cas слит с активирующим доменом, связывающий ДНК домен ZFP, TALE, TtAgo или Cas и активирующий домен находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде часть, содержащая связывающий ДНК домен ZFP, TALE, TtAgo или Cas, способна связываться с целевым сайтом и/или сайтом связывания, тогда как активирующий домен способен повышать экспрессию генов. В случае слитого полипептида, в котором связывающий ДНК домен ZFP, TALE, TtAgo или Cas слит с расщепляющим доменом, связывающий ДНК домен ZFP, TALE, TtAgo или Cas и расщепляющий домен находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде часть, содержащая связывающий ДНК домен ZFP, TALE, TtAgo или Cas, способна связываться с целевым сайтом и/или сайтом связывания,

тогда как расщепляющий домен способен расщеплять ДНК вблизи целевого сайта.

[0098] «Функциональный фрагмент» белка, полипептида или нуклеиновой кислоты представляет собой белок, полипептид или нуклеиновую кислоту, последовательности которых не идентичны полноразмерному белку, полипептиду или нуклеиновой кислоте, но все же сохраняют ту же функцию, что и полноразмерный белок, полипептид или нуклеиновая кислота. Функциональный фрагмент может содержать больше, меньше или такое же количество 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. Аналогично, способы определения функции белка хорошо известны. Например, функцию связывания ДНК полипептидом можно определить, например, с помощью анализа методом связывания на фильтрах, изменения электрофоретической подвижности или иммунопреципитации. Расщепление ДНК можно проанализировать с помощью электрофореза в геле. См. Ausubel и др., выше. Способность белка взаимодействовать с другим белком можно определить, например, с помощью коиммунопреципитации, двугибридного анализа или комплементации, как генетически, так и биохимически. См., например, Fields и др. (1989) *Nature* 340:245-246; патент США № 5,585,245 и международную публикацию заявки на патент № WO 98/44350.

[0099] «Вектор» способен переносить последовательности генов в клетки-мишени. Обычно, «векторная конструкция», «вектор экспрессии» и «вектор переноса генов» означают любую конструкцию нуклеиновой кислоты, способную направлять экспрессию интересующего гена, и которая может переносить последовательности генов в клетки-мишени. Таким образом, термин включает средство клонирования и экспрессии, а также интегрирующие векторы.

[0100] Термины «субъект» и «пациент» используют взаимозаменяемо, и они относятся к млекопитающим, таким как пациенты-люди и отличные от человека приматы, а также экспериментальные животные, такие как кролики, собаки, кошки, крысы, мыши и другие животные. Соответственно, термин «субъект» или «пациент» в данной заявке означает любого млекопитающего

пациента или субъекта, которому можно вводить нуклеазы, доноры и/или генетически модифицированные клетки согласно настоящему изобретению. Субъекты согласно настоящему изобретению включают субъектов с расстройством.

5 **[0101]** «Аутоиммунное заболевание» представляет собой заболевание, при котором иммунная система нападает на аутоантигены. Примеры аутоиммунного заболевания включают дискоидную красную волчанку/глубокую красную волчанку/красную волчанку обморожения/нефропатию при опухолевидной красной волчанке, и химерный рецептор содержит аутоантиген
10 (или его вариант или фрагмент), связанный с дискоидной красной волчанкой/глубокой красной волчанкой/красной волчанкой обморожения/нефропатией при опухолевидной красной волчанке. Примеры аутоантигенов, связанных с дискоидной красной волчанкой/глубокой красной волчанкой/красной волчанкой обморожения/нефропатией при опухолевидной
15 красной волчанке, включают, но не ограничены ANA.

[0102] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Хашимото, и химерный рецептор содержит аутоантиген, связанный с болезнью Хашимото. Примеры аутоантигенов, связанных с болезнью Хашимото, включают, но не ограничены тиреоидной
20 пероксидазой и тиреоглобулином.

[0103] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой энцефалит с антителами к NMDA-рецепторам, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с энцефалитом с антителами к NMDA-рецепторам. Примеры аутоантигенов,
25 связанных с энцефалит с антителами к NMDA-рецепторам, включают, но не ограничены антителом против рецептора N-метил-D-аспартата (субъединицей NR1).

[0104] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунную гемолитическую анемию, и химерный
30 рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с аутоиммунной гемолитической анемией. Примеры аутоантигенов, связанных с аутоиммунной гемолитической анемией, включают, но не ограничены антигенами крови группы Rh и антигеном I.

[0105] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой обыкновенную пузырчатку, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с обыкновенной пузырчаткой. Примеры аутоантигенов, связанных с обыкновенной пузырчаткой, включают, но не ограничены Dsg1/3.

[0106] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой буллезный пемфигоид, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с буллезным пемфигоидом. Примеры аутоантигенов, связанных с буллезным пемфигоидом, включают, но не ограничены BP180 и BP230.

[0107] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой тяжелую миастению, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с тяжелой миастенией. Примеры аутоантигенов, связанных с тяжелой миастенией, включают, но не ограничены ацетилхолиновыми никотиновыми постсинаптическими рецепторами.

[0108] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Грейвса, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с болезнью Грейвса. Примеры аутоантигенов, связанных с болезнью Грейвса, включают, но не ограничены рецепторами тиреотропина.

[0109] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой (ИТП). Примеры аутоантигенов, связанных с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой, включают, но не ограничены интегрином тромбоцитов и GpIIb:IIIa.

[0110] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой синдром Гудпасчера, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с синдромом Гудпасчера. Примеры аутоантигенов, связанных с синдромом Гудпасчера, включают, но не ограничены цепью альфа-3 коллагена IV типа.

[0111] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, и химерный рецептор содержит

аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с ревматоидным артритом. Примеры аутоантигенов, связанных с ревматоидным артритом, включают, но не ограничены ревматоидным фактором и кальпастатином.

[0112] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой ювенильный идиопатический артрит, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с ювенильным идиопатическим артритом. Примеры аутоантигенов, связанных с ювенильным идиопатическим артритом, включают, но не ограничены RF, цитруллинированными белками.

[0113] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с рассеянным склерозом. Примеры аутоантигенов, связанных с рассеянным склерозом, включают, но не ограничены основным белком миелина (MBP), пептидами миелин-олигодендроцитарного гликопротеина (MOG) и альфа-бета-кристаллином.

[0114] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой целиакию, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с целиакией. Примеры аутоантигенов, связанных с целиакией, включают, но не ограничены тканевой трансглутаминазой (TG2).

[0115] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой злокачественную анемию, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный со злокачественной анемией. Примеры аутоантигенов, связанных со злокачественной анемией, включают, но не ограничены внутренним фактором париетальных клеток желудка.

[0116] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой витилиго, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с витилиго. Примеры аутоантигенов, связанных с витилиго, включают, но не ограничены 65-кДа антигеном.

[0117] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Бехчета, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с болезнью Бехчета. Примеры аутоантигенов, связанных с болезнью Бехчета, включают, но не

ограничены фосфатидилсерином, рибосомными фосфобелками и цитоплазматическим антителом против нейтрофилов.

5 [0118] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой склеродермию, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный со склеродермией. Примеры аутоантигенов, связанных со склеродермией, включают, но не ограничены Scl-70, U1-RNP.

10 [0119] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой псориаз, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с псориазом. Примеры аутоантигенов, связанных с псориазом, включают, но не ограничены кальпастатином.

15 [0120] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с ЯК и болезнью Крона. Примеры аутоантигенов, связанных с ЯК и болезнью Крона, включают, но не ограничены ANA.

20 [0121] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой синдром Шегрена, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с синдромом Шегрена. Примеры аутоантигенов, связанных с синдромом Шегрена, включают, но не ограничены SSA и против SSB.

25 [0122] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой гранулематоз Вегенера, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с гранулематозом Вегенера. Примеры аутоантигенов, связанных с гранулематозом Вегенера, включают, но не ограничены ANA и ANCA.

30 [0123] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой полимиозит или дерматомиозит, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с полимиозитом или дерматомиозитом. Примеры аутоантигенов, связанных с полимиозитом или дерматомиозитом, включают, но не ограничены Jo-1.

[0124] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой первичный билиарный цирроз, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с первичным

билиарным циррозом. Примеры аутоантигенов, связанных с первичным билиарным циррозом, включают, но не ограничены антимитохондриальными антителами, gp210, p62, sp 100.

5 [0125] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой антифосфолипидный синдром (АФС), и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с антифосфолипидным синдромом. Примеры аутоантигенов, связанных с антифосфолипидным синдромом, включают, но не ограничены антифосфолипидными антителами.

10 [0126] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой смешанное заболевание соединительной ткани (СЗСТ, MCTD), и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный со смешанным заболеванием соединительной ткани. Примеры аутоантигенов, связанных со смешанным заболеванием соединительной ткани, включают, но не ограничены Ul-РНП, Ul-70 кДа мяРНП.

15 [0127] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой синдром Миллера-Фишера, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с синдромом Миллера-Фишера. Примеры аутоантигенов, связанных с синдромом Миллера-Фишера, включают, но не ограничены ганглиозидом GQ1b.

20 [0128] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой синдром Гийена-Барре, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с синдромом Гийена-Барре. Примеры аутоантигенов, связанных с синдромом Гийена-Барре, включают, но не ограничены GM1, асиало-GM1 и GD1b.

25 [0129] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой острую моторную аксональную нейропатию, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с острой моторной аксональной нейропатией. Примеры аутоантигенов, связанных с острой моторной аксональной нейропатией, включают, но не ограничены GM1.

30 [0130] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунный гепатит, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с аутоиммунным гепатитом. Примеры аутоантигенов, связанных с аутоиммунным гепатитом,

включают, но не ограничены антинуклеарными антителами (ANA) и антителами против гладких мышц (ASMA), антителами против микросом печени и почек типа 1 (ALKM-1) и антителом против цитозольного антигена 1 типа печени (ALC-1).

5 **[0131]** В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой герпетиформный дерматит, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с герпетиформным дерматитом. Примеры аутоантигенов, связанных с герпетиформным дерматитом, включают, но не ограничены антиэндомизальными антителами IgA.

10 **[0132]** В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой синдром Черджа-Страусса, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с синдромом Черджа-Страусса. Примеры аутоантигенов, связанных с синдромом Черджа-Страусса, включают, но не ограничены антитела против цитоплазмы нейтрофилов (ANCA).

15 **[0133]** В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой микроскопический полиангиит, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с микроскопическим полиангиитом. Примеры аутоантигенов, связанных с микроскопическим полиангиитом, включают, но не ограничены ANCA.

20 **[0134]** В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой васкулит ANCA, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с васкулитом ANCA. Примеры аутоантигенов, связанных с васкулитом ANCA, включают, но не ограничены белками гранул нейтрофилов.

25 **[0135]** В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой острую ревматическую лихорадку, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с острой ревматической лихорадкой. Примеры аутоантигенов, связанных с острой ревматической лихорадкой, включают, но не ограничены антигеном клеточной
30 стенки стрептококка.

[0136] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой диабет 1 типа (Д1Т), и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с Д1Т. Примеры аутоантигенов, связанных с Д1Т, включают, но не ограничены инсулином (IAA),

декарбоксилазой глутаминовой кислоты (GAA или GAD) и протеин-тирозинфосфатазой (IA2 или ICA512).

[0137] В одном варианте реализации аутоиммунное заболевание представляет собой мембранозную нефропатию, и химерный рецептор содержит аутоантиген (или его вариант или фрагмент), связанный с мембранозной нефропатией. Примеры аутоантигенов, связанных с мембранозной нефропатией, включают, но не ограничены PLA2R1 и THSD7A1.

[0138] «Стволовость» относится к относительной способности любой клетки действовать подобным стволовой клетке образом, т.е., степень тотиплюри- или олигопотентности и повышенное или бесконечное самообновление, которые может проявлять любая конкретная стволовая клетка. «ACTR» представляет собой связанный с антителом Т-клеточный рецептор, который является сконструированным компонентом Т-клетки, способным связываться с экзогенно доставленным антителом. Связывание антитела с компонентом ACTR Т-клетки приводит к взаимодействию с антигеном, распознаваемым антителом, и когда указанный антиген встречается, содержащая ACTR Т-клетка начинает взаимодействовать с антигеном (см. публикацию заявки на патент США № 2015/0139943).

Слитые молекулы

[0139] В данной заявке предложены композиции, например, нуклеазы, которые пригодны для расщепления выбранного целевого гена (например, *CISH*) в клетке. В некоторых вариантах реализации один или более компонентов слитых молекул (например, нуклеазы) встречаются в природе. В других вариантах реализации один или более компонентов слитых молекул (например, нуклеазы) не встречаются в природе, т.е., сконструированы в области связывающих ДНК молекул и/или расщепляющего(-их) домена(-ов). Например, связывающую ДНК часть встречающейся в природе нуклеазы можно изменить, чтобы она связывалась с выбранным целевым сайтом (например, одиночная направляющая РНК системы CRISPR/Cas или мегануклеаза, которая была сконструирована, чтобы связываться с сайтом, отличным от распознаваемого сайта связывания). В других вариантах реализации нуклеаза содержит гетерологичные связывающие ДНК и расщепляющие домены (например, нуклеазы с цинковыми пальцами; связывающие ДНК белки с доменом TAL-эффектора; связывающие ДНК домены

мегануклеазы с гетерологичными расщепляющими доменами). Таким образом, для осуществления настоящего изобретения можно применять любую нуклеазу, включая, но не ограничиваясь по меньшей мере одной из ZFN, TALEN, мегануклеазы, нуклеазы CRISPR/Cas или тому подобных нуклеаз, причем
5 указанные нуклеазы расщепляют целевой ген, и указанное расщепление приводит к геномной модификации целевого гена (например, вставкам и/или делециям в расщепленном гене).

[0140] Также в данной заявке предложены способы повышения специфичности активности расщепления путем независимого титрования сконструированных расщепляющих полудоменов-партнеров нуклеазного
10 комплекса. В некоторых вариантах реализации соотношение двух партнеров (расщепляющих полудоменов) составляет 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8, 1:9, 1:10 или 1:20 или любое значение между ними. В других вариантах реализации соотношение двух партнеров больше чем 1:30. В других вариантах реализации
15 двух партнеров используют при соотношении, которое выбирают отличным от 1:1. При применении отдельно или в комбинации, способы и композиции согласно настоящему изобретению обеспечивают поразительное и неожиданное повышение специфичности нацеливания посредством снижения активности нецелевого расщепления. Нуклеазы, применяемые в данных вариантах
20 реализации, могут включать ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, CRISPR/dCas и TtAgo, или любую комбинацию перечисленных нуклеаз.

А. Связывающие ДНК молекулы.

[0141] Слитые молекулы, описанные в данной заявке, могут содержать
25 любую связывающую ДНК молекулу (также называемую связывающим ДНК доменом), включая белковые домены и/или полинуклеотидные связывающие ДНК домены. В некоторых вариантах реализации связывающий ДНК домен связывается с последовательностью, содержащей от 9 до 12 смежных нуклеотидов из последовательностей, представленных в Таблице 2 (SEQ ID NO:
30 40 - 47).

[0142] В некоторых вариантах реализации в композициях и способах, описанных в данной заявке, используют связывающий ДНК домен мегануклеазы (хоминг-эндонуклеазы) для связывания с донорной молекулой и/или связывания с интересующим участком в геноме клетки. Встречающиеся в природе

мегануклеазы распознают сайты расщепления из 15 - 40 пар оснований, и их обычно группируют в четыре семейства: семейство LAGLIDADG, семейство GIY-YIG, семейство His-Cyst-бокс и семейство HNH. Примеры хоминг-эндонуклеаз 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 патенты США № 5,420,032 и 6,833,252; Belfort и др. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon и др. (1989) *Gene* 82:115-118; Perler и др. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble и др. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast и др. (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 и каталог New England Biolabs. Кроме того, специфичность связывания с ДНК хоминг-эндонуклеаз и мегануклеаз можно изменить генно-инженерным способом, чтобы они связывались с неприродными целевыми сайтами. См., например, Chevalier и др. (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat и др. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth и др. (2006) *Nature* 441:656-659; Paques и др. (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; и публикацию заявки на патент США № 2007/0117128. Связывающие ДНК домены хоминг-эндонуклеаз и мегануклеаз можно изменить в контексте нуклеазы в целом (т.е., так что нуклеаза содержит когнатный расщепляющий домен), или можно соединить с гетерологичным расщепляющим доменом.

20 **[0143]** В других вариантах реализации связывающий ДНК домен одной или более нуклеаз, применяемых в способах и композициях, описанных в данной заявке, включает встречающийся в природе или сконструированный (не встречающийся в природе) связывающий ДНК домен TAL-эффектора. См., например, патент США № 8,586,526, полностью включенный в данную заявку

25 посредством ссылки. Известно, что патогенные для растений бактерии рода *Xanthomonas* вызывают множество заболеваний у важных сельскохозяйственных растений. Патогенность *Xanthomonas* зависит от консервативной системы секреции III типа (T3S), которая вводит более 25 различных эффекторных белков в клетку растения. Среди данных введенных белков присутствуют подобные

30 активаторам транскрипции (TAL) эффекторы, которые имитируют активаторов транскрипции растения и управляют транскриптомом растения (см. Кау и др. (2007) *Science* 318:648-651). Данные белки содержат связывающий ДНК домен и активирующий транскрипцию домен. Один из наиболее хорошо изученных TAL-эффекторов представляет собой AvrBs3 из *Xanthomonas campestris* pv.

Vesicatoria (см. Bonas и др. (1989) *Mol Gen Genet* 218:127-136 и международную публикацию заявки на патент № WO 2010/079430). TAL-эффекторы содержат центрированный домен из tandemных повторов, каждый повтор содержит приблизительно 34 аминокислоты, которые очень важны для специфичности связывания ДНК данными белками. Кроме того, они содержат последовательность ядерной локализации и кислый активирующий транскрипцию домен (обзор см. в Schornack S и др. (2006) *J Plant Physiol* 163(3):256-272). Кроме того, в фитопатогенных бактериях *Ralstonia solanacearum* обнаружили два гена, названные *brg11* и *hpx17*, которые гомологичны семейству AvrBs3 из *Xanthomonas* в штамме GMI1000 биовара 1 *R. solanacearum* и в штамме RS1000 биовара 4 (см. Heuer и др. (2007) *Appl and Envir Micro* 73(13):4379-4384). Данные гены на 98,9% идентичны друг другу по последовательности нуклеотидов, но отличаются делецией 1575 п.о. в повторяющемся домене *hpx17*. Тем не менее, оба продукта гена менее чем на 40% идентичны по последовательности белкам семейства AvrBs3 из *Xanthomonas*. См., например, патент США № 8,586,526, полностью включенный в данную заявку посредством ссылки.

[0144] Специфичность данных TAL-эффекторов зависит от последовательностей, обнаруженных в tandemных повторах. Повторяющаяся последовательность содержит приблизительно 102 п.о., и повторы, как правило, на 91 - 100% гомологичны друг другу (Bonas и др., там же). Полиморфизм повторов обычно находится в положениях 12 и 13, и, похоже, наблюдается соответствие один к одному между конкретными двумя гипервариабельными остатками (RVD) в положениях 12 и 13 и конкретными смежными нуклеотидами в целевой последовательности TAL-эффектора (см. Moscou и Bogdanove, (2009) *Science* 326:1501 и Boch и др. (2009) *Science* 326:1509-1512). Экспериментально определили природный код для распознавания ДНК данными TAL-эффекторами, так что последовательность HD в положениях 12 и 13 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 связывающие ДНК повторы собирали в белки с новыми комбинациями и количествами повторов, чтобы получить искусственные факторы транскрипции, которые способны взаимодействовать с новыми последовательностями и активировать экспрессию неэндогенного репортерного гена в клетках растений (Boch и др., там же). Сконструированные

белки TAL соединяли с расщепляющим полудоменом *FokI* с получением слитой нуклеазы с доменом TAL-эффектора (TALEN). См., например, патент США № 8,586,526; Christian и др. (2010) *Genetics* 186(2):757-61, электронную публикацию 10.1534/Genetics.110.120717. В некоторых вариантах реализации домен TALE

5 содержит N-кэп и/или C-кэп, как описано в патенте США № 8,586,526.

[0145] В некоторых вариантах реализации связывающий ДНК домен одной или более нуклеаз, применяемых для расщепления *in vivo* и/или направленного расщепления генома клетки, включает белок с цинковыми пальцами. Предпочтительно, белок с цинковыми пальцами не встречается в

10 природе в том смысле, что он сконструирован, чтобы связываться с выбранным целевым сайтом. См., например, Beerli и др. (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo и др. (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan и др. (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal и др. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo и др. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; патенты США № 6,453,242;

15 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; 7,253,273; и публикации заявок на патент США № 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061, все описания которых полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

[0146] Сконструированный связывающий домен с цинковыми пальцами

20 может иметь новую специфичность связывания, по сравнению со встречающимся в природе белком с цинковыми пальцами. Способы конструирования, включают, но не ограничены рациональным дизайном и различными типами селекции. Рациональный дизайн включает, например, использование баз данных, содержащих триплетные (или квадруплетные)

25 последовательности нуклеотидов и отдельные последовательности аминокислот с цинковыми пальцами, в которых каждый триплетная или квадруплетная последовательность нуклеотидов ассоциирована с одной или более последовательностями аминокислот цинковых пальцев, которые связывают конкретную триплетную или квадруплетную последовательность. См.,

30 например, патенты США с совместным правообладанием № 6,453,242 и 6,534,261, полностью включенные в данную заявку посредством ссылки.

[0147] Примеры способов селекции, включая фаговый дисплей и двугибридные системы, описаны 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 заявок на патент № WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197; и патенте Великобритании № 2,338,237. Кроме того, было описано повышение специфичности связывания со связывающими доменами с цинковыми пальцами, например, в международной публикации заявки на патент с совместным правообладанием № WO 02/077227.

[0148] Кроме того, как описано в данных и других источниках, домены с цинковыми пальцами и/или белки с множеством цинковых пальцев можно соединить, применяя любые подходящие линкерные последовательности, включая, например, линкеры длиной 5 или более аминокислот. См. также, в патентах США № 6,479,626; 6,903,185 и 7,153,949 примеры линкерных последовательностей длиной 6 или более аминокислот. Белки, описанные в данной заявке, могут содержать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка.

[0149] ZFP может быть функционально ассоциирован (связан) с одним или более нуклеазными (расщепляющими) доменами с образованием ZFN. Термин «ZFN» включает пару ZFN, которые димеризуются для расщепления целевого гена. Способы и композиции также можно применять для повышения специфичности ZFN, включая пару нуклеаз, к предполагаемой мишени относительно других непредусмотренных сайтов расщепления, известных как нецелевые сайты (см. публикацию заявки на патент США № 20180087072). Таким образом, нуклеазы, описанные в данной заявке, могут содержать мутации в одном или более участках остова их связывающих ДНК доменов и/или одну или более мутаций в их нуклеазных расщепляющих доменах. Данные нуклеазы могут содержать мутации в аминокислотах внутри связывающего ДНК домена ZFP («остова ZFP»), которые могут неспецифично взаимодействовать с фосфатами на остове ДНК, но они не содержат изменений в спиральных, распознающих ДНК. Таким образом, настоящее изобретение включает мутации катионных аминокислотных остатков в остове ZFP, которые не требуются для специфичности к целевому нуклеотиду. В некоторых вариантах реализации данные мутации в остове ZFP включают мутирование катионного аминокислотного остатка на нейтральный или анионный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах реализации данные мутации в остове ZFP включают мутирование полярного аминокислотного остатка на нейтральный или

неполярный аминокислотный остаток. В предпочтительных вариантах реализации мутации вводят в положения (-5), (-9) и/или положение (-14) относительно связывающей ДНК спирали. В некоторых вариантах реализации цинковый палец может содержать одну или более мутаций в положении (-5), (-9) и/или (-14). В дополнительных вариантах реализации один или более цинковых пальцев в белке с множеством цинковых пальцев могут 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)) мутируют на аланин (A), лейцин (L), Ser (S), Asp (N), Glu (E), Tyr (Y) и/или глутамин (Q).

[0150] В некоторых аспектах связывающий ДНК домен (например, ZFP, TALE, онРНК и т.д.) нацелен на ген *CISH*. В некоторых вариантах реализации связывающий ДНК домен нацелен на область экзона гена *CISH*, например, на экзон 2 или экзон 3.

[0151] Выбор целевых сайтов (например, внутри интрона и/или экзона гена *CISH*); ZFP и способов разработки и конструирования слитых белков (и полинуклеотидов, кодирующих их) известны специалистам в данной области 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 международных публикациях заявок на патент № 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.

[0152] Кроме того, как описано в данных и других источниках, домены с цинковыми пальцами и/или белки с множеством цинковых пальцев можно соединить, применяя любые подходящие линкерные последовательности, включая, например, линкеры длиной 5 или более аминокислот. См. также, в патентах США № 6,479,626; 6,903,185 и 7,153,949 примеры линкерных последовательностей длиной 6 или более аминокислот. Белки, описанные в данной заявке, могут содержать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка.

[0153] В некоторых вариантах реализации связывающая ДНК молекула является частью нуклеазной системы CRISPR/Cas. См., например, патент США № 8,697,359 и публикацию заявки на патент США № 2015/0056705. Локус CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные

группами), который кодирует компоненты РНК данной системы, и локус *cas* (CRISPR-ассоциированный), который кодирует белки (Jansen и др. (2002) *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575; Makarova и др. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:482-496; Makarova и др. (2006). *Biol. Direct* 1:7; Haft и др. (2005) *PLoS Comput. Biol.* 1:e60),
5 составляют последовательности генов нуклеазной системы CRISPR/Cas. Локусы CRISPR в микробных хозяевах содержат комбинацию CRISPR-ассоциированных (Cas) генов, а также элементов некодирующей РНК, способных программировать специфичность опосредованного CRISPR расщепления нуклеиновых кислот.

[0154] CRISPR II типа является одной из наиболее хорошо изученных
10 систем и осуществляет направленный двухцепочечный разрыв ДНК в четыре последовательных этапа. Во-первых, две некодирующие РНК – массив пре-крРНК и тракрРНК – транскрибируются с локуса CRISPR. Во-вторых, тракрРНК гибридизуется с повторяющимися участками пре-крРНК и опосредует процессинг пре-крРНК с получением зрелых крРНК, содержащих отдельные
15 спейсерные последовательности. В третьих, комплекс зрелая крРНК:тракрРНК направляет Cas9 к целевой ДНК посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику между спейсером на крРНК и протоспейсером на целевой ДНК рядом со смежным с протоспейсером мотивом (PAM) - дополнительное необходимое условие для направленного распознавания. Наконец, Cas9 опосредует
20 расщепление целевой ДНК с получением двухцепочечного разрыва внутри протоспейсера. Активность системы CRISPR/Cas включает три этапа: (i) встраивание чужеродных последовательностей ДНК в массив CRISPR, чтобы предотвратить будущие атаки, в процессе, называемом «адаптация», (ii) экспрессию соответствующих белков, а также экспрессию и процессинг массива,
25 а затем (iii) РНК-опосредованную интерференцию с чужеродной нуклеиновой кислотой. Таким образом, в бактериальной клетке несколько так называемых белков «Cas» вовлечены в природную функцию системы CRISPR/Cas и играют роли в таких функциях, как встраивание чужеродной ДНК и т.д.

[0155] В некоторых вариантах реализации белок Cas может представлять
30 собой «функциональное производное» встречающегося в природе белка Cas. «Функциональное производное» полипептида с нативной последовательностью представляет собой соединение, обладающее таким же качественным биологическим свойством, как у полипептида с нативной последовательностью. «Функциональные производные» включают, но не ограничены фрагментами

нативной последовательности и производными полипептида с нативной последовательностью и его фрагментов, в том случае, если они обладают такой же биологической активностью, как у соответствующего полипептида с нативной последовательностью. Биологическая активность, предполагаемая в данной заявке, представляет собой способность функционального производного гидролизовать субстрат ДНК на фрагменты. В объем термина «производное» входят как варианты последовательности аминокислот полипептида, так и ковалентные модификации, а также слитые белки из них. Подходящие производные полипептида Cas или его фрагмента включают, но не ограничены перечисленными: мутанты, слитые белки, ковалентные модификации белка Cas или его фрагмента. Белок Cas, который включает белок Cas или его фрагмент, а также производные белка Cas или его фрагмента, можно получить из клетки или синтезировать химическим способом, или получить путем комбинирования данных двух процедур. Клетка может представлять собой клетку, которая в природе продуцирует белок Cas, или клетку, которая в природе продуцирует белок Cas и генетически сконструирована, чтобы продуцировать эндогенный белок Cas на более высоком уровне экспрессии или чтобы продуцировать белок Cas с экзогенно внедренной нуклеиновой кислоты, указанная нуклеиновая кислота кодирует Cas, такой же или отличный от эндогенного Cas. В некотором случае, клетка в природе не продуцирует белок Cas, и ее подвергают генной инженерии, чтобы она продуцировала белок Cas. В некоторых вариантах реализации белок Cas представляет собой малый ортолог Cas9 для доставки посредством вектора AAV (Ran и др. (2015) *Nature* 510:186).

[0156] В некоторых вариантах реализации связывающая ДНК молекула является частью системы TtAgo (см. Swarts и др., там же; Sheng и др., там же). В эукариотах замалчивание генов опосредовано семейством белков Argonaute (Ago). В данной концепции Ago связывается с малыми (19 - 31 нт) РНК. Данный замалчивающий комплекс белок-РНК распознает целевые РНК посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику между малой РНК и мишенью и эндонуклеолитически расщепляет целевую РНК (Vogel (2014) *Science* 344:972-973). Напротив, прокариотические белки Ago связываются с малыми фрагментами одноцепочечной ДНК, и, вероятно, их функция заключается в детектировании и удалении чужеродной (часто вирусной) ДНК (Yuan и др. (2005) *Mol. Cell* 19, 405; Olovnikov и др. (2013) *Mol. Cell* 51:594; Swarts и др., там же).

Примеры прокариотических белков Ago включают белки из *Aquifex aeolicus*, *Rhodobacter sphaeroides* и *Thermus thermophilus*.

[0157] Одним из наиболее хорошо изученных прокариотических белков Ago является белок из *T. thermophilus* (TtAgo; Swarts и др., там же). TtAgo ассоциируется либо с 15 нт, либо с 13 - 25 нт фрагментами одноцепочечной ДНК с 5'-фосфатными группами. Данная «направляющая ДНК», связанная с TtAgo, служит для направления комплекса белок-ДНК на связывание с комплементарной по Уотсону-Крику последовательностью ДНК в сторонней молекуле ДНК. После того как информация в последовательности данных направляющих ДНК позволила идентифицировать целевую ДНК, комплекс TtAgo-направляющая ДНК расщепляет целевую ДНК. Такой механизм также подкрепляется структурой комплекса TtAgo-направляющая ДНК в связанном состоянии с целевой ДНК (G. Sheng и др., там же). Ago из *Rhodobacter sphaeroides* (RsAgo) обладает сходными свойствами (Olovnikov и др., там же).

[0158] Экзогенные направляющие ДНК из произвольной последовательности ДНК можно загрузить на белок TtAgo (Swarts и др., там же). Поскольку специфичность расщепления TtAgo определяется направляющей ДНК, комплекс TtAgo-ДНК, образованный экзогенной, определенной исследователем направляющей ДНК, следовательно, будет направлять расщепление TtAgo целевой ДНК на комплементарную определенную исследователем направляющую ДНК. Таким образом, можно создать целевой двухцепочечный разрыв в ДНК. Применение системы TtAgo-направляющая ДНК (или ортологичных систем Ago-направляющая ДНК из других организмов) обеспечивает возможность направленного расщепления геномной ДНК внутри клетки. Такое расщепление может быть либо одно-, либо двухцепочечным. Для расщепления геномной ДНК млекопитающего будет предпочтительным применение варианта TtAgo, кодон-оптимизированного для экспрессии в клетках млекопитающих. Кроме того, может быть предпочтительной обработка клеток комплексом TtAgo-ДНК, образованным *in vitro*, в котором белок TtAgo соединен с проникающим в клетку пептидом. Кроме того, может быть предпочтительным применение варианта белка TtAgo, который был изменен посредством мутагенеза, чтобы он обладал улучшенной активностью при 37 градусах Цельсия. Опосредованное Ago-РНК расщепление ДНК можно применять, чтобы влиять на множество результатов, включая нокаут гена, добавление целевого

гена, исправление гена, делецию целевого гена, применяя методики, стандартные в данной области для использования разрывов ДНК.

5 **[0159]** Таким образом, нуклеаза содержит связывающую ДНК молекулу, которая специфично связывается с целевым сайтом в любом гене, в который желательно вставить донора (трансген).

В. Расщепляющие домены.

10 **[0160]** Любой подходящий расщепляющий домен может быть функционально связан со связывающим ДНК доменом с образованием нуклеазы. Например, связывающие ДНК домены ZFP соединяли с нуклеазными доменами с получением ZFN – функциональной молекулы, которая способна распознавать определенную целевую нуклеиновую кислоту посредством сконструированного связывающего ДНК домена (ZFP) и вызывать разрезание ДНК рядом с сайтом связывания ZFP посредством нуклеазной активности, включая для применения

15 для модификации генома в различных организмах. См., например, патенты США № 7,888,121; 8,623,618; 7,888,121; 7,914,796 и 8,034,598; и публикацию заявки на патент США № 2011/0201055. Аналогичным образом, связывающие ДНК домены TALE соединяли с нуклеазными доменами с получением TALEN. См., например, патент США № 8,586,526.

20 **[0161]** Выше отмечено, что расщепляющий домен может быть гетерологичен связывающему ДНК домену, например, связывающий ДНК домен с цинковыми пальцами и расщепляющий домен из нуклеазы, или связывающий ДНК домен TALEN и расщепляющий домен, или связывающий ДНК домен мегануклеазы и расщепляющий домен из отличной нуклеазы. Гетерологичные

25 расщепляющие домены можно получить из любой эндонуклеазы или экзонуклеазы. Примеры эндонуклеаз, из которых можно получить расщепляющий домен, включают, но не ограничены эндонуклеазами рестрикции и хоминг-эндонуклеазами. Известны дополнительные ферменты, которые расщепляют ДНК (например, нуклеаза S1; нуклеаза из бобов мунг; ДНКазы I поджелудочной железы; микрококковая нуклеаза; эндонуклеаза дрожжей HO).

30 Один или более из данных ферментов (или их функциональных фрагментов) можно применять в качестве источника расщепляющих доменов и расщепляющих полудоменов.

- [0162]** Аналогично, расщепляющий полудомен можно получить из любой нуклеазы или ее части, как описано выше, и для его расщепляющей активности требуется димеризация. Обычно, для расщепления необходимо два слитых белка, если указанные слитые белки содержат расщепляющие полудомены. В качестве альтернативы, можно применять один белок, содержащий два расщепляющих полудомена. Два расщепляющих полудомена можно получить из одной эндонуклеазы (или ее функциональных фрагментов), или каждый расщепляющий полудомен можно получить из различных эндонуклеаз (или их функциональных фрагментов). Кроме того, целевые сайты для указанных двух слитых белков предпочтительно расположены по отношению друг к другу так, что связывание двух слитых белков с соответствующими целевыми сайтами располагает расщепляющие полудомены в такой пространственной ориентации друг к другу, которая позволяет расщепляющим полудоменам образовывать функциональный расщепляющий домен, например, путем димеризации. Таким образом, в некоторых вариантах реализации ближние края целевых сайтов разделены 5 - 8 нуклеотидами или 15 - 18 нуклеотидами. Тем не менее, любое целое количество нуклеотидов или пар нуклеотидов может находиться между двумя целевыми сайтами (например, от 2 до 50 пар нуклеотидов или более). Обычно, сайт расщепления находится между целевыми сайтами.
- [0163]** Эндонуклеазы рестрикции (ферменты рестрикции) присутствуют во множестве видов и способны сайт-специфично связываться с ДНК (в распознаваемом сайте) и расщеплять ДНК в сайте связывания или около него. Некоторые ферменты рестрикции (например, типа II) расщепляют ДНК в сайтах, удаленных от распознаваемого сайта, и содержат разделяемые связывающий и расщепляющий домены. Например, фермент типа II *FokI* катализирует двухцепочечное расщепление ДНК в 9 нуклеотидах от распознаваемого сайта на одной цепи и в 13 нуклеотидах от распознаваемого сайта на другой. См., например, патенты США № 5,356,802; 5,436,150 и 5,487,994; а также Li и др. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li и др. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim и др. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim и др. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31978-31982. Таким образом, в одном варианте реализации слитые белки содержат расщепляющий домен (или расщепляющий полудомен) из по меньшей мере одного фермента

рестрикции типа II^S и один или более связывающих доменов с цинковыми пальцами, которые могут быть или не быть сконструированными.

[0164] Примером фермента рестрикции типа II^S, расщепляющий домен которого отделен от связывающего домена, является *FokI*. Данный конкретный фермент активен в виде димера. Bitinaite и др. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10,570-10,575. Соответственно, для целей настоящего изобретения часть фермента *FokI*, применяемую в описанных слитых белках, рассматривают как расщепляющий полудомен. Таким образом, для направленного двухцепочечного расщепления и/или направленного замещения клеточных последовательностей с применением слитых белков цинковые пальцы-*FokI*, два слитых белка, каждый из которых содержит расщепляющий полудомен *FokI*, можно применять для воссоздания каталитически активного расщепляющего домена. В качестве альтернативы, также можно применять одну полипептидную молекулу, содержащую связывающий домен с цинковыми пальцами и два расщепляющих полудомена *FokI*. Параметры для направленного расщепления и направленного изменения последовательности с применением слитых белков цинковые пальцы-*FokI* предложены в других местах в настоящем описании.

[0165] Расщепляющий домен или расщепляющий полудомен может представлять собой любую часть белка, которая сохраняет расщепляющую активность или которая сохраняет способность мультимеризоваться (например, димеризоваться) с образованием функционального расщепляющего домена.

[0166] Примеры ферментов рестрикции типа II^S описаны в международной публикации заявки на патент № WO 07/014275, полностью включенной в данную заявку. Дополнительные ферменты рестрикции также содержат разделяемые связывающие и расщепляющие домены, и они также предложены в настоящем описании. См., например, Roberts и др. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:418-420.

[0167] В некоторых вариантах реализации расщепляющий домен содержит один или более сконструированных расщепляющих полудоменов (также называемых мутантами домена димеризации), которые минимизируют или предотвращают гомодимеризацию, как описано, например, в патентах США № 8,623,618; 7,888,121; 7,914,796 и 8,034,598; и публикации заявки на патент США № 2011/0201055, описания всех из которых полностью включены в данную заявку посредством ссылки. Все аминокислотные остатки в положениях 446, 447,

479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 и 538 *FokI* являются мишенями для влияния на димеризацию расщепляющих полудоменов *FokI*.

[0168] В некоторых вариантах реализации сконструированные расщепляющие полудомены получают из *FokI*, и они содержат одну или более мутаций в одном или более аминокислотных остатках 416, 422, 447, 448 и/или 525 (см., например, публикацию заявки на патент США № 2018/0087072), пронумерованных относительно полноразмерного *FokI* дикого типа, как показано ниже:

10 Расщепляющий полудомен *FokI* дикого типа (SEQ ID NO: 1)
QLVKSELEEKKSELNRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRG
KHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNK
HINPNEWKVPSSVTEFKFLFVSGHFHFGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIG
GEMIKAGTLTLEEVRKFNNGEINF

15

Данные мутации уменьшают неспецифичное взаимодействие между доменом *FokI* и молекулой ДНК. В других вариантах реализации расщепляющие полудомены, полученные из *FokI*, содержат мутацию в одном или более аминокислотных остатках 414 - 426, 443 - 450, 467 - 488, 501 - 502 и/или 521 - 531.

20 Указанные мутации могут включать мутации в остатках, находящихся в природных ферментах рестрикции, гомологичных *FokI*. В некоторых вариантах реализации мутации представляют собой замены, например, замену остатка дикого типа на отличную аминокислоту, например, серин (S), например, R416S или K525S. В предпочтительном варианте реализации мутация в положениях 416, 422, 447, 448 и/или 525 включает замену положительно заряженной аминокислоты на незаряженную или отрицательно заряженную аминокислоту. В другом варианте реализации сконструированный расщепляющий полудомен содержит мутации в аминокислотных остатках 499, 496 и 486, дополнительно к мутациям в одном или более аминокислотных остатках 416, 422, 447, 448 или 525.

30 В предпочтительном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены слитые белки, в которых сконструированный расщепляющий полудомен содержит полипептид, в котором остаток Gln (Q) дикого типа в положении 486 заменен на остаток Glu (E), остаток Ile (I) дикого типа в положении 499 заменен на остаток Leu (L) и остаток Asn (N) дикого типа в положении 496 заменен на остаток Asp (D) или Glu (E) («ELD» или «ELE»),

35

дополнительно к одной или более мутациям в положениях 416, 422, 447, 448 или 525.

[0169] Можно использовать расщепляющие домены с более чем одной мутацией, например, с мутациями в положениях 490 (E→K) и 538 (I→K) в одном расщепляющем полудомене с получением сконструированного расщепляющего полудомена, названного «E490K:I538K», и с мутированием положений 486 (Q→E) и 499 (I→L) в другом расщепляющем полудомене с получением сконструированного расщепляющего полудомена, названного «Q486E:I499L»; с мутациями, которые заменяют остаток Gln (Q) дикого типа в положении 486 на остаток Glu (E), остаток Iso (I) дикого типа в положении 499 на остаток Leu (L) и остаток Asn (N) дикого типа в положении 496 на остаток Asp (D) или Glu (E) (также называют доменами «ELD» и «ELE», соответственно); сконструированный расщепляющий полудомен, содержащий мутации в положениях 490, 538 и 537 (пронумерованы относительно FokI дикого типа), например, мутации, которые заменяют остаток Glu (E) дикого типа в положении 490 на остаток Lys (K), остаток Iso (I) дикого типа в положении 538 на остаток Lys (K) и остаток His (H) дикого типа в положении 537 на остаток Lys (K) или остаток Arg (R) (также называют доменами «KKK» и «KKR», соответственно); и/или сконструированный расщепляющий полудомен, содержащий мутации в положениях 490 и 537 (пронумерованы относительно FokI дикого типа), например, мутации, которые заменяют остаток Glu (E) дикого типа в положении 490 на остаток Lys (K) и остаток His (H) дикого типа в положении 537 на остаток Lys (K) или остаток Arg (R) (также называют доменами «KIK» и «KIR», соответственно). См., например, патенты США № 7,914,796; 8,034,598 и 8,623,618, описания которых полностью включены посредством ссылки во всех отношениях. В других вариантах реализации сконструированный расщепляющий полудомен содержит «Sharkey» и/или мутации «Sharkey» (см. Guo и др. (2010) *J. Mol. Biol.* 400(1):96-107).

[0170] В качестве альтернативы нуклеазы можно собрать *in vivo* в сайте целевой нуклеиновой кислоты, применяя так называемую методику «разделенного фермента» (см., например, публикацию заявки на патент США № 2009/0068164). Компоненты таких разделенных ферментов либо можно экспрессировать на отдельных экспрессионных конструкциях, либо можно соединить в одну открытую рамку считывания, где отдельные компоненты

разделены, например, последовательностью самоотщепляющегося пептида 2A или последовательностью IRES. Компоненты могут представлять собой отдельные связывающие домены с цинковыми пальцами или домены связывающего нуклеиновую кислоту домена мегануклеазы.

5 [0171] Нуклеазы можно подвергнуть скринингу на активность перед применением, например, в хромосомной системе на основе дрожжей, как описано в патенте США № 8,563,314.

[0172] Родственная Cas9 система CRISPR/Cas содержит два некодирующих РНК-компонента: тракрРНК и массив пре-крРНК, содержащие
10 направляющие последовательности нуклеазы (спейсеры), между которыми расположены идентичные прямые повторы (ПП). Для применения системы CRISPR/Cas для осуществления геномной инженерии должны присутствовать обе функции данных РНК (см. Cong и др. (2013) *Scienceexpress* 1/10.1126/science 1231143). В некоторых вариантах реализации тракрРНК и пре-крРНК
15 поставляются в виде отдельных экспрессионных конструкций или в виде отдельных молекул РНК. В других вариантах реализации конструируют химерную РНК, причем сконструированную зрелую крРНК (придающую специфичность к мишени) соединяют с тракрРНК (обеспечивающей взаимодействие с Cas9) с получением химерного гибрида крРНК-тракрРНК
20 (также названного одиночной направляющей РНК) (см. Jinek и др. (2012) *Science* 337:816-821; Jinek и др. (2013) *eLife* 2:e00471. DOI: 10.7554/eLife.00471 и Cong, там же).

[0173] В некоторых вариантах реализации применяют систему CRISPR-Cpf1. Система CRISPR-Cpf1, обнаруженная у вида *Francisella*, представляет
25 собой систему CRISPR-Cas 2 класса, которая опосредует надежную ДНК-интерференцию в клетках человека. Хотя они функционально консервативны, Cpf1 и Cas9 отличаются множеством аспектов, включая их направляющие РНК и субстратную специфичность (см. Fagerlund и др. (2015) *Genom Bio* 16:251). Главное отличие между белками Cas9 и Cpf1 состоит в том, что Cpf1 не
30 использует тракрРНК и, следовательно, ему требуется только крРНК. крРНК FnCpf1 длиной 42 – 44 нуклеотида (19-нуклеотидный повтор и 23 – 25-нуклеотидный спейсер) и содержат одну структуру петля-на-стебле, которая допускает изменения в последовательности, при которых сохраняется вторичная структура. Кроме того, молекулы крРНК Cpf1 значительно короче, чем ~100-

нуклеотидные сконструированные онРНК, необходимые для Cas9, и требования к РАМ для FnCpf1 представляют собой 5'-TTN-3' и 5'-СТА-3' на вытесняемой цепи. Хотя как Cas9, так и Cpf1 создают двухцепочечные разрывы в целевой ДНК, Cas9 использует свои подобные RuvC и HNH домены, чтобы создать разрывы с тупыми концами внутри затравочной последовательности направляющей РНК, тогда как Cpf1 использует подобный RuvC домен для получения ступенчатых разрывов за пределами затравки. Так как Cpf1 создает ступенчатые разрывы в стороне от важного участка затравки, НГСК не разрушит целевой сайт, следовательно, гарантируя, что Cpf1 может продолжать разрезать тот же сайт до тех пор, пока не произойдет желательное событие рекомбинации НГР. Таким образом, должно быть понятно, что в способах и композициях, описанных в данной заявке, в объем термина «Cas» входит оба белка Cas9 и Cpf1. Таким образом, в данной заявке «система CRISPR/Cas» относится к системам CRISPR/Cas и/или CRISPR/Cpf1, включая обе системы нуклеаз и/или факторов транскрипции.

Целевые сайты (сайты-мишени).

[0174] Выше подробно описано, что связывающие ДНК домены можно сконструировать, чтобы они связывались с любой выбранной последовательностью. У сконструированного связывающего ДНК домена может быть новая специфичность связывания, по сравнению со встречающимся в природе связывающим ДНК доменом.

[0175] В некоторых вариантах реализации нуклеаза(-ы) нацелена(-ы) на ген CISH, например, на интрон и/или экзон (например, экзон 2 или 3) указанного гена. В некоторых вариантах реализации нуклеаза связывается с целевым сайтом из 9 - 20 или более нуклеотидов (смежных или несмежных) внутри последовательности, представленной в Таблице 2.

[0176] В некоторых вариантах реализации нуклеаза(-ы) нацелена(-ы) на «безопасные» локусы, такие как гены *AAVS1*, *HPRT*, *ALB* и *CCR5* в клетках человека, *Rosa26* в клетках мыши (см., например, патенты США № 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 8,586,526; публикации заявок на патент США № 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2006/0063231; 2008/0159996; 2010/00218264; 2012/0017290; 2011/0265198;

2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983 и 2013/0177960) и локус *Zp15* в растениях (см. патент США № 8,329,986).

[0177] Дополнительные лишь некоторые из примеров подходящих целевых генов включают ген бета(β)-глобина (HBB), ген гамма(γ)-глобина (HBG1), ген В-клеточной лимфомы/лейкоза 11A (BCL11A), ген Kruppel-подобного фактора 1 (KLF1), ген CCR5, ген CXCR4, ген PPP1R12C (AAVS1), ген гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген альбумина, ген фактора VIII, ген фактора IX, ген киназы 2 с богатым лейцином повтором (LRRK2), ген гентингина (Htt), ген родопсина (RHO), ген муковисцидозного регулятора трансмембранной проводимости (CFTR), ген поверхностно-активного белка В (SFTPB), ген Т-клеточного рецептора альфа (TRAC), ген Т-клеточного рецептора бета (TRBC), ген запрограммированной гибели клеток 1 (PD1), ген антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), ген антигена лейкоцитов человека (HLA) А, ген HLA В, ген HLA С, ген HLA-DРА, ген HLA-DQ, ген HLA-DРА, ген LMP7, ген транспортера 1, связанного с процессингом антигена (ТАР1), ген ТАР2, ген тапазина (ТАРВР), ген трансактиватора главного комплекса гистосовместимости II класса (СИТА), ген дистрофина (DMD), ген глюкокортикоидного рецептора (GR), ген CISH, ген Rag-1, ген RFX5, ген FAD2, ген FAD3, ген ZP15, ген KASII, ген MDH и/или ген EPSPS. В некоторых аспектах нуклеаза(-ы) связывает(-ют) и/или расщепляет(-ют) ген ингибитора контрольных точек, например, PD-1, CTLA4, рецепторы для семейства В7 ингибиторных лигандов, или расщепляет(-ют) ген рецептора или лиганда, участвующего в передаче сигналов через LAG3, 2В4, ВТLА, TIM3, А2аR и рецепторы подавления цитотоксичности (рецепторы KIR и лектиновые рецепторы С-типа), см. Pardoll (2012) *Nat Rev Cancer* 12(4):252, ген комплекса HLA (класса I: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, В2М; класса II: HLA-DМА, HLA-DOА, HLA-DРА1, HLA-DQА, HLA-DРА, HLA-DМВ, HLA-DOВ, HLA-DРВ1, HLA-DQВ, HLA-DRВ) или TCR; и/или ген, кодирующий продукт, участвующий в процессе загрузки пептида и процессинга антигена для комплексов HLA (например, ТАР, тапазин, кальретикулин, кальнексин, LMP2, LMP7 или Erp57). См., например, патенты США № 8,956,828 и 8,945,868.

Доноры.

[0178] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложено опосредованное нуклеазами направленное встраивание экзогенной последовательности (например, трансгена, кодирующего терапевтический белок) в геном клетки. Выше отмечено, что встраивание экзогенной последовательности (также называемой «донорной последовательностью», или «донором», или «трансгеном») осуществляют, например, для делеции определенного участка, и/или исправления мутантного гена, или для повышенной экспрессии гена дикого типа. Легко можно понять, что донорная последовательность обычно не идентична геномной последовательности, в которую ее помещают. Донорная последовательность может содержать негомологичную последовательность (например, трансген), фланкированную двумя участками гомологии, чтобы обеспечить возможность эффективной НГР в интересующем положении, или может встроиться посредством механизмов направляемой не гомологией репарации. См., например, патенты США № 9,045,763; 9,005,973 и 7,888,121. Кроме того, донорные последовательности могут содержать молекулу вектора, содержащую последовательности, которые не гомологичны интересующему участку в хроматине клетки. Донорная молекула может содержать несколько прерывающихся участков гомологии клеточной ДНК. Кроме того, для направленного встраивания последовательностей, обычно не присутствующих в интересующем участке, указанные последовательности могут присутствовать в донорной молекуле нуклеиновой кислоты и быть фланкированными участками гомологии последовательности в интересующем участке.

[0179] Аналогично нуклеазам, доноры можно внедрять в любой форме. В некоторых вариантах реализации доноры можно внедрять, применяя ДНК и/или вирусные векторы с помощью способов, известных в данной области. См., например, патенты США № 9,005,973; 8,936,936 и 8,703,489. Донора можно вводить в клетку в двух- или одноцепочечной форме. Донора можно вводить в клетку в кольцевой или линейной форме. При введении в линейной форме, концы донорной последовательности можно защитить (например, от экзонуклеолитической деградации) с помощью способов, известных специалистам в данной области. Например, к 3'-концу линейной молекулы добавляют один или более остатков дидезоксинуклеотида и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируют с одним или обоими концами. См., например, Chang и др. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4959-

4963; Nehls и др. (1996) *Science* 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от деградации включают, но не ограничены добавлением концевых(-ой) аминогрупп(ы) и применением модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфоротиоаты, фосфорамидаты и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы.

[0180] В некоторых вариантах реализации донор содержит последовательности (например, кодирующие последовательности, также называемые трансгенами) длиной более 1 т.п.н., например, от 2 до 200 т.п.н., от 2 до 10 т.п.н. (или любое значение между ними). Донор также может содержать по меньшей мере один целевой сайт для нуклеазы. В некоторых вариантах реализации донор содержит по меньшей мере 2 целевых сайта, например, для пары нуклеаз ZFN, TALEN, TtAgo или CRISPR/Cas. Как правило, целевые сайты нуклеазы находятся за пределами последовательности трансгена, например, с 5'-и/или 3'-стороны от последовательности трансгена, для расщепления трансгена.

Сайт(-ы) расщепления нуклеазой может(-гут) быть для любых(-ой) нуклеаз(ы). В некоторых вариантах реализации целевой(-ые) сайт(ы) нуклеазы, содержащийся(-еся) в двухцепочечном доноре, предназначены для тех(-ой) же нуклеаз(ы), применяемых(-ой) для расщепления эндогенной мишени, в которую встраивается расщепленный донор посредством независимых от гомологии способов.

[0181] Донора можно встроить таким образом, что его экспрессия будет запускаться эндогенным промотором в сайте встраивания, то есть, промотором, который запускает экспрессию эндогенного гена, в который встроен донор. Тем не менее, должно быть понятно, что донор может содержать промотор и/или энхансер, например, конститутивный промотор или индуцируемый или тканеспецифичный промотор.

[0182] Донорную молекулу можно встроить в эндогенный ген так, что экспрессируется весь, часть или не экспрессируется эндогенный ген. В некоторых вариантах реализации трансген встраивается в эндогенный локус гена *CISH*, чтобы исправить мутантный вариант (например, в клетке из пациента, у которого нет или недостаточно функционального варианта гена *CISH*), например, трансген встраивается в эндогенный ген *CISH*, например, экзон (например, экзон 2 или экзон 3) гена *CISH*. В других вариантах реализации трансген встраивается в эндогенный локус гена *CISH*, так что экспрессируется функциональный белок.

Таким образом, донор может содержать любые кодирующие белок последовательности, которые продуцируют функциональный белок, включая, но не ограничиваясь CAR, сконструированными или экзогенными TCR (см. патент США № 8,956,828) и/или ACTR (публикация заявки на патент США № 2017/0281682) и их комбинациями.

[0183] Более того, хотя они не обязательны для экспрессии, экзогенные последовательности также могут включать регуляторные последовательности транскрипции или трансляции или другие последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, внутренний участок посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды 2A, и/или сигналы полиаденилирования. Кроме того, могут быть включены последовательности акцептора сплайсинга.

[0184] Трансгены, которые несут донорные последовательности, описанные в данной заявке, можно выделить из плазмид, клеток или других источников, применяя стандартные методики, известные в данной области, такие как ПЦР. Доноры для применения могут включать различные типы топологии, включая суперскрученную кольцевую, релаксированную кольцевую, линейную и тому подобные типы. В качестве альтернативы, их можно синтезировать химическим способом, применяя стандартные методики синтеза олигонуклеотидов. Кроме того, доноры могут быть метилированы или не содержать метилирования. Доноры могут находиться в форме бактериальных или дрожжевых искусственных хромосом (BAC или YAC).

[0185] Донорные полинуклеотиды, описанные в данной заявке, могут содержать одно или более неприродных оснований и/или остовов. В частности, встраивание донорной молекулы с метилированными цитозинами можно осуществить, применяя способы, описанные в данной заявке, чтобы добиться состояния неактивности транскрипции в интересующей области.

[0186] Экзогенный (донорный) полинуклеотид может содержать любую интересующую последовательность (экзогенную последовательность). Примеры экзогенных последовательностей включают, но не ограничены перечисленными: любая кодирующая полипептид последовательность (например, кДНК), последовательности промотора, последовательности энхансера, эпитопные метки, маркерные гены, распознаваемые ферментами сайты расщепления и различные типы экспрессионных конструкций. Маркерные гены, включают, но

не ограничены последовательностями, кодирующими белки, которые опосредуют устойчивость к антибиотикам (например, устойчивость к ампициллину, устойчивость к неомицину, устойчивость к G418, устойчивость к пурамицину), последовательностями, кодирующими окрашенные или

5 флуоресцентные или люминесцентные белки (например, зеленый флуоресцентный белок, усиленный зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, люцифераза), и белки, которые опосредуют повышенный рост клеток и/или амплификацию гена (например, дигидрофолатредуктаза).

Эпитопные метки включают, например, одну или более копий FLAG, His, мус,

10 Таp, HA или любой детектируемой последовательности аминокислот.

[0187] В некоторых вариантах реализации донор дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий любой полипептид, экспрессия которого в клетке желательна, включая, но не ограничиваясь перечисленными: антитела, антигены, ферменты, рецепторы (на поверхности клетки или ядерные, или

15 химерные антигенные рецепторы (CAR)), гормоны, лимфокины, цитокины, репортерные полипептиды, факторы роста и функциональные фрагменты любого из перечисленных полипептидов. Кодирующие последовательности могут представлять собой, например, кДНК.

[0188] В некоторых вариантах реализации экзогенные

20 последовательности могут содержать маркерный ген (описанный выше), позволяющий селекцию клеток, которые подверглись целевому встраиванию, и связанную последовательность, кодирующую дополнительную функциональную группу. Лишь некоторые из примеров маркерных генов включают GFP, маркер(ы) отбора по чувствительности к лекарственному препарату и тому

25 подобные гены.

[0189] В некоторых вариантах реализации трансген может включать, например, гены дикого типа для замены мутированных эндогенных последовательностей. Например, последовательность гена CISH дикого типа (или другую функциональную последовательность) можно встроить в геном

30 стволовой клетки, в которой эндогенная копия гена мутирована. Трансген можно встроить в эндогенный локус или, в качестве альтернативы, можно направить в безопасный локус.

[0190] При конструировании таких кассет экспрессии, следуя идеям согласно настоящему описанию, используют методики, хорошо известные в

области молекулярной биологии (см., например, Ausubel или Maniatis). Перед применением кассеты экспрессии для получения трансгенного животного, можно исследовать способность кассеты экспрессии отвечать на индуктор стресса, ассоциированный с выбранными контролирующими элементами, путем введения кассеты экспрессии в подходящую линию клеток (например, первичные

клетки, трансформированные клетки или линии immortalized клеток).

[0191] Более того, хотя они не требуются для экспрессии, экзогенные последовательности также могут содержать регулирующие транскрипцию или трансляцию последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, внутренний участок посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды 2A, и/или сигналы полиаденилирования. Кроме того, регуляторные элементы интересующих генов можно функционально связать с репортерными генами с получением химерных генов (например, репортерных кассет экспрессии).

[0192] Также можно добиться направленного встраивания некодирующей последовательности нуклеиновой кислоты. Последовательности, кодирующие антисмысловые РНК, РНКи, кшРНК и микроРНК (миРНК) также можно использовать для направленного встраивания.

[0193] В дополнительных вариантах реализации донорная нуклеиновая кислота может содержать некодирующие последовательности, которые являются специальными целевыми сайтами для дополнительных конструкций нуклеаз. Затем дополнительные нуклеазы можно экспрессировать в клетках, так что исходная донорная молекула расщепляется и модифицируется путем вставки другой интересующей донорной молекулы. Таким образом, можно получить повторяющиеся встраивания донорных молекул, позволяя накопление признака в конкретном интересующем локусе или безопасном локусе.

Клетки.

[0194] Таким образом, в данной заявке предложены генетически модифицированные клетки, содержащие генетически модифицированный ген *CISH*. Генетически модифицированные клетки можно модифицировать в любом месте внутри гена *CISH*, включая некодирующие или кодирующие области, например, в экзоне 2 и/или экзоне 3 гена *CISH*. В некоторых вариантах реализации модификация включает встраивание трансгена, который

экспрессирует функциональный белок в клетке, включая клетки (например, Т-клетки или стволовые клетки), полученные с помощью способов, описанных в данной заявке. Трансген встраивается направленным образом в геном клетки с помощью одной или более нуклеаз. В некоторых вариантах реализации трансген встраивается в ген *CISH*, например, у страдающего раком пациента или пациента с воспалительным заболеванием. Трансген можно встроить в любую область интрона и/или экзона *CISH*, например, в экзон 2 или экзон 3. В некоторых вариантах реализации трансген встраивается в целевой сайт или в пределах 5 - 10 нуклеотидов с обеих сторон от целевого сайта из по меньшей мере 9 пар оснований, как показано в Таблице 2. Таким образом, в данной заявке предложены генетически модифицированные клетки, содержащие трансген (который экспрессирует функциональный белок), встроенный в экзон 2 или 3 гена *CISH*, а также клетки, происходящие из данных клеток, которые содержат генетическую модификацию.

[0195] В отличие от произвольного встраивания, направленное встраивание гарантирует, что трансген встраивается в определенный ген. Трансген можно встроить в любое место в целевом гене. В некоторых вариантах реализации трансген встраивается в сайт расщепления нуклеазой или рядом с ним, например, в пределах 1 - 300 (или любое значение между ними) пар оснований против хода транскрипции или по ходу транскрипции от сайта расщепления, более предпочтительно в пределах 1 - 100 пар оснований (или любое значение между ними) с любой стороны от сайта расщепления, еще более предпочтительно в пределах 1 - 50 пар оснований (или любое значение между ними) с любой стороны от сайта расщепления. В некоторых вариантах реализации встроенная последовательность, содержащая трансген, не содержит каких-либо последовательностей вектора (например, последовательностей вирусного вектора).

[0196] Любой тип клеток можно генетически модифицировать, как описано в данной заявке, чтобы они содержали трансген, включая, но не ограничиваясь клетками и линиями клеток. Другие лишь некоторые из примеров содержащих трансген клеток, описанных в данной заявке, включают Т-клетки (например, CD4+, CD3+, CD8+ и т.д.); дендритные клетки; В-клетки; аутологичные (например, полученные из пациента) или гетерологичные плюрипотентные, тотипотентные или мультипотентные стволовые клетки

(например, CD34+ клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), эмбриональные стволовые клетки или тому подобные клетки). В некоторых вариантах реализации клетки, описанные в данной заявке, представляют собой CD34+ клетки, полученные из пациента. Клетки можно

5 генетически модифицировать в культуре или, в качестве альтернативы, можно генетически модифицировать *in vivo* путем обеспечения субъекту нуклеаз и/или доноров, описанных в данной заявке.

[0197] Клетки, описанные в данной заявке, полезны для лечения и/или предотвращения рака или воспалительного заболевания у субъекта с

10 расстройством, например, с помощью методов лечения *ex vivo*. Модифицированные нуклеазой клетки можно размножить, а затем ввести обратно пациенту, применяя стандартные методики. См., например, Tebas и др. (2014) *New Eng J Med* 370(10):901. В случае стволовых клеток, после инфузии субъекту также происходит дифференцировка *in vivo* данных предшественников

15 в клетки, экспрессирующие функциональный белок CISH. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие клетки, описанные в данной заявке. Кроме того, клетки можно криосохранить перед введением пациенту.

[0198] Клетки и способы *ex vivo*, описанные в данной заявке, обеспечивают лечение и/или предотвращение расстройства (например, рака или

20 воспалительного заболевания) у субъекта (например, млекопитающего субъекта) и устраняют потребность в непрерывном профилактическом введении лекарств или рискованных процедурах, таких как аллогенные трансплантации костного мозга или гамма-ретровирусная доставка. По этой причине, настоящее изобретение, описанное в данной заявке, обеспечивает более безопасный,

25 экономически выгодный и экономный по времени способ лечения и/или предотвращения типов рака, воспалительных заболеваний и других состояний, при которых желательна иммунорегуляция.

Доставка.

[0199] Нуклеазы, полинуклеотиды, кодирующие данные нуклеазы, донорные полинуклеотиды и композиции, содержащие белки и/или

30 полинуклеотиды, описанные в данной заявке, можно доставить с помощью любых подходящих средств. В некоторых вариантах реализации нуклеазы и/или доноры доставляют *in vivo*. В других вариантах реализации нуклеазы и/или

доноры доставляют в выделенные клетки (например, аутологичные или гетерологичные стволовые клетки), чтобы заготовить модифицированные клетки, полезные для доставки *ex vivo* пациентам (для клеточной терапии).

[0200] Способы доставки нуклеаз, описанные в данной заявке, 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, описания всех из которых полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

[0201] Нуклеазы и/или донорные конструкции, описанные в данной заявке, также можно доставлять, применяя любой механизм доставки нуклеиновой кислоты, включая голую ДНК и/или РНК (например, мРНК) и векторы, содержащие последовательности, кодирующие один или более компонентов. Можно применять любые векторные системы включая, но не ограничиваясь перечисленными: плазмидные векторы, миникольца ДНК, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы; герпесвирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированного вируса, и т.д., и комбинации перечисленных векторов. 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; и публикацию заявки на патент США № 2014/0335063, полностью включенные в данную заявку посредством ссылки. Более того, должно быть понятно, что любая из данных систем может содержать одну или более последовательностей, необходимых для лечения. Таким образом, когда одну или более нуклеаз и донорную конструкцию вводят в клетку, нуклеазы и/или донорный полинуклеотид могут находиться на одной системе доставки или на различных механизмах доставки. Если применяют множество систем, то каждый механизм доставки может содержать последовательность, кодирующую одну или множество нуклеаз и/или донорных конструкций (например, мРНК, кодирующую одну или более нуклеаз, и/или мРНК или AAV, несущие одну или более донорных конструкций).

[0202] Можно применять обычные способы переноса генов на вирусной и невирусной основе, чтобы ввести нуклеиновые кислоты, кодирующие нуклеазы и донорные конструкции, в клетки (например, клетки млекопитающих) и целевые ткани. Системы доставки на основе невирусного вектора включают плазмиды ДНК, миникольца ДНК, голую нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в

комплексе со средством доставки, таким как липосома или полксамер. Системы доставки на основе вирусного вектора включают ДНК- и РНК-вирусы, геномы которых после доставки в клетку оказываются либо эписомными, либо встроенными. Обзор процедур генотерапии можно найти в 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 и др., в *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler и Böhm (ред.) (1995); и Yu и др. (1994) *Gene Therapy* 1:13-26.

[0203] Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатионов или липидов с нуклеиновой кислотой, липидные наночастицы (LNP), голую ДНК, голую РНК, кэпированную РНК, искусственные вирионы и повышенное агентом поглощение ДНК. Сонопорацию с применением, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar), также можно применять для доставки нуклеиновых кислот.

[0204] Дополнительные примеры систем доставки нуклеиновых кислот включают системы, предложенные Amax 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 реагенты для липофекции реализуются в промышленных масштабах (например, Трансфектам™ и Липофектин™). Катионные и нейтральные липиды, которые подходят для липофекции полинуклеотидов с эффективным распознаванием рецепторов, включают липиды, описанные у Felgner, публикации международных заявок на патент № WO 91/17424, WO 91/16024. В некоторых аспектах нуклеазы доставляют в виде мРНК, а трансген доставляют другими средствами, такими как вирусные векторы, миникольца ДНК, плазмидная ДНК, одноцепочечная ДНК, линейная ДНК, липосомы, наночастицы и тому подобные средства доставки.

[0205] Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, включая направленные липосомы, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо

известно специалисту в данной области (см., например, Crystal (1995) *Science* 270:404-410; Blaese и др. (1995) *Cancer Gene Ther.* 2:291-297; Behr и др. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:382-389; Remy и др. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:647-654; Gao и др. (1995) *Gene Therapy* 2:710-722; Ahmad и др. (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).

[0206] Дополнительные способы доставки включают применение упаковки нуклеиновых кислот для доставки в средствах доставки EnGeneIC (EDV). Данные EDV специфично доставляются в целевые ткани с применением биспецифичных антител, причем одно плечо антитела специфично к целевой ткани, а другое специфично к EDV. Антитело доставляет EDV на поверхность целевой клетки, а затем EDV переносится в клетку путем эндоцитоза. После попадания в клетку содержимое высвобождается (см. MacDiarmid и др. (2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643).

[0207] При применении систем на основе РНК- или ДНК-вирусов для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные системы CRISPR/Cas, используют преимущество хорошо разработанных процессов для нацеливания вируса на определенные клетки в организме и перемещение полезного груза вируса в ядро. Вирусные векторы можно вводить напрямую субъектам (*in vivo*), или их можно применять для обработки клеток *in vitro* и модифицированные клетки вводить субъектам (*ex vivo*). Обычные системы на основе вирусов для доставки систем CRISPR/Cas, включают, но не ограничены ретровирусным, лентивирусным, аденовирусным вектором, вектором на основе аденоассоциированного вируса, вируса коровьей оспы и вируса простого герпеса для переноса генов. Встраивание в геном хозяина возможно при способах переноса генов на основе ретровируса, лентивируса и аденоассоциированного вируса, что часто приводит к длительной экспрессии встроенного трансгена. Кроме того, высокие эффективности трансдукции наблюдали в множестве различных типов клеток и целевых тканей.

[0208] Тропизм ретровируса можно изменить путем внедрения чужеродных белков оболочки, расширяя потенциальную целевую популяцию клеток-мишеней. Лентивирусные векторы представляют собой ретровирусные векторы, которые способны трансдуцировать или инфицировать неделящиеся клетки, и обычно продуцируют высокие титры вируса. Выбор системы

ретровирусного переноса генов зависит от целевой ткани. Ретровирусные векторы состоят из цис-действующих длинных концевых повторов (LTR) с емкостью упаковки до 6 - 10 т.п.н. чужеродной последовательности. Минимальных цис-действующих LTR достаточно для репликации и упаковки векторов, которые затем применяют для встраивания терапевтического гена в целевую клетку, чтобы обеспечить постоянную экспрессию трансгенов. Широко применяемые ретровирусные векторы включают векторы на основе вируса лейкоза мыши (MuLV), вируса лейкоза гиббонов (GaLV), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и комбинаций перечисленных вирусов (см., например, Buchscher и др. (1992) *J. Virol.* 66:2731-2739; Johann и др. (1992) *J. Virol.* 66:1635-1640; Sommerfelt и др. (1990) *Viol.* 176:58-59; Wilson и др. (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller и др. (1991) *J. Virol.* 65:2220-2224; публикацию международной заявки на патент № WO 1994/026877).

15 **[0209]** В применениях, 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 не требуют деления клетки. С такими векторами получали высокий титр и высокие уровни экспрессии. Данный вектор можно

20 получить в больших количествах в относительно простой системе. Векторы на основе аденоассоциированного вируса («AAV») также применяют для трансдукции клеток целевыми нуклеиновыми кислотами, например, для получения нуклеиновых кислот и пептидов *in vitro* и для процедур генотерапии *in vivo* и *ex vivo* (см., например, West и др. (1987) *Virology* 160:38-47; патент США № 4797368; публикацию международной заявки на патент № 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 и др. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260; Tratschin и др. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Hermonat &

25 Muzyczka (1984) *PNAS* 81:6466-6470; и Samulski и др. (1989) *J. Virol.* 63:03822-3828. Можно применять любой серотип AAV, включая AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 и AAV8, AAV 8.2, AAV9 и AAV rh10 и псевдотипированный AAV, такой как AAV2/8, AAV2/5 и AAV2/6.

30

[0210] На сегодняшний день доступно по меньшей мере шесть подходов на основе вирусных векторов для переноса генов в клинических испытаниях, в которых используют подходы, которые включают комплементацию дефектных векторов генами, встроенными в хелперные линии клеток, с получением трансдуцирующего агента.

[0211] pLASN и MFG-S являются примерами ретровирусных векторов, которые использовали в клинических испытаниях (Dunbar и др. (1995) *Blood* 85:3048-305; Kohn и др. (1995) *Nat. Med.* 1:1017-102; Malech и др. (1997) *PNAS* 94:22 12133-12138). PA317/pLASN был первым терапевтическим вектором, применяемым в испытании генотерапии (Blaese и др. (1995) *Science* 270:475-480 (1995)). Эффективности трансдукции 50% или более наблюдали для упакованных векторов MFG-S (Ellem и др. (1997) *Immunol Immunother.* 44(1):10-20; Dranoff и др. (1997) *Hum. Gene Ther.* 1:111-2).

[0212] Рекомбинантные векторы на основе аденоассоциированного вируса (rAAV) являются перспективными альтернативными системами доставки генов на основе дефектного и непатогенного парвовируса - аденоассоциированного вируса 2 типа. Все векторы получают из плазмиды, в которой сохранились только инвертированные концевые повторы AAV из 145 пар оснований (п.о.), фланкирующие кассету экспрессии трансгена. Эффективный перенос генов и стабильная доставка трансгена благодаря встраиванию в геномы трансдуцированных клеток являются главными особенностями данной векторной системы (Wagner и др. (1998) *Lancet* 351:9117 1702-3; Kearns и др. (1996) *Gene Ther.* 9:748-55). Другие серотипы AAV, включая AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 и AAVrh10, и все их варианты также можно применять в соответствии с настоящим изобретением.

[0213] Лишенные способности реплицироваться рекомбинантные аденовирусные векторы (Ad) можно получить в высоком титре и легко инфицировать множество различных типов клеток. Большинство аденовирусных векторов сконструированы так, что трансген заменяет гены E1a, E1b и/или E3 Ad; впоследствии лишенный способности реплицироваться вектор размножают в клетках 293 человека, которые обеспечивают удаленную функцию гена *in trans*. Векторы Ad могут трансдуцировать множество типов тканей *in vivo*, включая неделящиеся дифференцированные клетки, такие как клетки, находящиеся в печени, почке и мышцах. Обычные векторы Ad обладают большой емкостью.

Пример применения вектора Ad в клиническом испытании включал терапию полинуклеотидом для противоопухолевой иммунизации путем внутримышечной инъекции (Sternan и др. (1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9). Дополнительные примеры применения аденовирусных векторов для переноса генов в клинических

5 испытаниях включают Rosenecker и др. (1996) *Infection* 24:1 5-10; Sternan и др. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9(7):1083-1089; Welsh и др. (1995) *Hum. Gene Ther.* 2:205-18; Alvarez и др. (1997) *Hum. Gene Ther.* 5:597-613; Topf и др. (1998) *Gene Ther.* 5:507-513; Sternan и др. (1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089.

[0214] Пакующие клетки применяют для получения вирусных частиц, которые способны инфицировать клетку-хозяина. Такие клетки включают клетки 293, которые упаковывают аденовирус, и клетки ψ 2 или клетки PA317, который упаковывают ретровирус. Вирусные векторы, применяемые в генотерапии, обычно получают в линии клеток-продуцентов, которые упаковывают нуклеиновую кислоту вектора в вирусную частицу. Векторы обычно содержат

15 минимум вирусных последовательностей, необходимых для упаковки и последующего встраивания в хозяина (в соответствующих случаях), другие вирусные последовательности замещены на кассету экспрессии, кодирующую белок, который необходимо экспрессировать. Отсутствующие функции вируса обеспечиваются *in trans* пакующей линией клеток. Например, векторы AAV, применяемые в генотерапии, обычно содержат только последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) из генома AAV, которые необходимы для упаковки и встраивания в геном хозяина. Вирусную ДНК пакует в линию клеток, которая содержит плазмиду-помощника, кодирующую другие гены AAV, то есть *rep* и *cap*, но в которой нет последовательностей ITR.

20 Указанную линию клеток также инфицируют аденовирусом в качестве помощника. Вирус-помощник вызывает репликацию вектора AAV и экспрессию генов AAV с плазмиды-помощника. Плазида-помощник не пакуется в значительных количествах вследствие отсутствия последовательностей ITR. Контаминацию аденовирусом можно уменьшить, например, путем термической

25 обработки, к которой аденовирус более чувствителен, чем AAV.

30

[0215] Во множестве генотерапевтических применений желательно, чтобы генотерапевтический вектор доставлялся с высокой степенью специфичности в конкретный тип ткани. Соответственно, вирусный вектор можно модифицировать таким образом, чтобы он был специфичен для данного

типа клеток, путем экспрессии лиганда в виде слитого белка с вирусным белком оболочки на наружной поверхности вируса. Лиганд выбирают, чтобы у него была аффинность к рецептору, который, как известно, присутствует на интересующем типе клеток. Например, Han и др. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751,

5 доложили, что вирус лейкоза мышей Молони можно модифицировать таким образом, чтобы он экспрессировал херегулин человека, слитый с gp70, и указанный рекомбинантный вирус инфицировал некоторые клетки рака молочной железы человека, экспрессирующие рецептор эпидермального фактора роста человека. Данный принцип можно распространить на другие пары вирус-

10 целевая клетка, в которых целевая клетка экспрессирует рецептор, и вирус экспрессирует слитый белок, содержащий лиганд к данному рецептору на поверхности клетки. Например, нитевидный фаг можно сконструировать, чтобы он отображал фрагменты антитела (например, FАВ или Fv), проявляющие аффинность специфичного связывания практически с любым выбранным

15 клеточным рецептором. Хотя описание выше относится, главным образом, к вирусным векторам, те же принципы можно применять по отношению к невирусным векторам. Такие векторы можно сконструировать, чтобы они содержали специфичные последовательности поглощения, которые способствуют поглощению специфичными клетками-мишенями.

20 **[0216]** Генотерапевтические векторы можно доставлять *in vivo* путем введения отдельному субъекту, обычно путем системного введения (например, внутривенной, интраперитонеальной, внутримышечной, подкожной, сублингвальной или интракраниальной инфузии), топического нанесения, как описано ниже, или посредством легочной ингаляции. В качестве альтернативы,

25 векторы можно доставлять в клетки *ex vivo*, такие как клетки, эксплантированные из отдельного пациента (например, лимфоциты, пунктаты костного мозга, биоптаты ткани), или гемопоэтические стволовые клетки из универсального донора, а затем имплантировать клетки обратно пациенту, обычно после селекции клеток, которые встроили вектор.

30 **[0217]** Векторы (например, ретровирусы, аденовирусы, липосомы и т.д.), содержащие нуклеазы и/или донорные конструкции, также можно вводить непосредственно в организм для трансдукции клеток *in vivo*. В качестве альтернативы, можно вводить голую ДНК. Введение можно осуществить любым из путей, обычно используемых для приведения молекулы в максимальный

контакт с клетками крови или ткани, включая, но не ограничиваясь перечисленными: инъекция, инфузия, топическое нанесение, ингаляция и электропорация. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и хорошо известны специалистам в данной области, и, хотя для введения конкретной композиции можно применять более чем один путь, конкретный путь часто приводит к более быстрой и более эффективной реакции, чем другой путь.

[0218] Векторы, подходящие для внедрения полинуклеотидов, описанных в данной заявке, включают неистраивающиеся лентивирусные векторы (IDLV). См., например, Ory и др. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11382-11388; Dull и др. (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zuffery и др. (1998) *J. Virol.* 72:9873-9880; Follenzi и др. (2000) *Nature Genetics* 25:217-222; патент США № 8,936,936.

[0219] Используемые фармацевтически приемлемые носители зависят отчасти от конкретной композиции, которую вводят, а также конкретного способа, используемого для введения композиции. Соответственно, доступно большое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций, описанных ниже (см., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ое изд., 1989).

[0220] Должно быть понятно, что кодирующие нуклеазу последовательности и донорные конструкции можно доставлять, используя одинаковые или различные системы. Например, донорный полинуклеотид может нести AAV, тогда как одну или более нуклеаз может нести мРНК. Более того, различные системы можно вводить одинаковыми или различными путями (путем внутримышечной инъекции, инъекции в хвостовую вену, другой внутривенной инъекции, интраперитонеального введения и/или внутримышечной инъекции). Множество векторов можно доставлять одновременно или в любом последовательном порядке.

[0221] Составы для введений как *ex vivo*, так и *in vivo* включают суспензии в жидкости или эмульгированные жидкости. Активные ингредиенты часто смешивают со вспомогательными веществами, которые фармацевтически приемлемы и совместимы с активным ингредиентом. Подходящие вспомогательные вещества включают, например, воду, солевой раствор, декстрозу, глицерин, этанол или тому подобные вещества и их комбинации. Кроме того, композиция может содержать незначительные количества таких

вспомогательных веществ, как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные вещества, стабилизирующие агенты или другие реагенты, которые повышают эффективность фармацевтической композиции.

5 Применения.

[0222] Способы и композиции, изложенные в данной заявке, предназначены для обеспечения способов лечения рака, воспалительных расстройств и других заболеваний, например, путем предоставления белков, которые модулируют способность к ответу Т-клеток. Клетку можно модифицировать *in vivo* или можно модифицировать *ex vivo*, а затем ввести субъекту. Таким образом, способы и композиции обеспечивают лечение и/или предотвращение расстройства.

[0223] Направленное встраивание трансгена (например, трансгена CAR, гена HLA, сконструированного или экзогенного гена TCR или ACTR) можно применять для коррекции aberrантного родственного CISH гена, встраивания гена дикого типа (например, терапевтических белков) или изменения экспрессии эндогенного гена. Например, трансген, кодирующий CAR, можно встроить в клетку с получением клетки, которая продуцирует функциональный белок CAR. Геномное редактирование также может включать исправление мутаций (например, точечных мутаций) в дефектном эндогенном гене, посредством чего восстанавливают экспрессию гена и лечат расстройство.

[0224] В некоторых вариантах реализации в ген CISH встраивают один или более CAR. Трансгены CAR известны в данной области и включают внеклеточный одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) со специфичностью к конкретному антигену, связанный с внутриклеточной сигнальной частью, содержащей костимулирующий домен и активирующий домен. Костимулирующий домен можно получить, например, из CD28, и активирующий домен можно получить, например, из CD3-дзета. Трансгены CAR могут содержать два, три, четыре или более костимулирующих доменов. ScFv CAR можно разработать таким образом, чтобы он был нацелен, например, на CD19, который представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый клетками В-клеточной линии, включая все нормальные В-клетки и В-клеточные злокачественные новообразования, включая, но не ограничиваясь НХЛ, ХЛЛ и не Т-клеточным ОЛЛ. См., например, патент США № 9,855,298. Дополнительно

или вместо трансгена(-ов) CAR в ген CISH можно встроить один или более из HLA, B2M и/или других иммуномодулирующих белков, включая, но не ограничиваясь слитыми белками B2M с HLA-G и/или HLA-E, описанными в заявке на патент США № 16/058307, поданной 8 августа 2018 г.

5 [0225] В качестве лишь одного из примеров, способы и композиции, описанные в данной заявке, можно применять для лечения и/или предотвращения рака, такого как В-клеточные лейкозы, и/или воспалительных заболеваний, таких как колит.

[0226] Следующие Примеры относятся к типичным вариантам
10 реализации настоящего изобретения, в которых нуклеаза включает нуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN). Должно быть понятно, что ее взяли исключительно в качестве примера, и что можно применять другие нуклеазы, например, TALEN, TtAgo и системы CRISPR/Cas, хоминг-эндонуклеазы (мегануклеазы) с
15 сконструированными связывающими ДНК доменами и/или слитые белки связывающих ДНК доменов встречающихся в природе сконструированных хоминг-эндонуклеаз (мегануклеаз) и гетерологичных расщепляющих доменов и/или слитые белки мегануклеаз и белков TALE. Например, дополнительные нуклеазы можно разработать таким образом, чтобы они связывались с
20 последовательностью, содержащей от 9 до 12 смежных нуклеотидов из последовательностей, описанных в данной заявке (например, см. Таблицу 2).

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Белки нуклеаз с цинковыми пальцами (ZFN), нацеленные на CISH.

25 [0227] Белки с цинковыми пальцами, нацеленные на CISH, были разработаны и встроены в мРНК, плазмиды, AAV- или аденовирусные векторы по существу как описано в Urnov и др. (2005) *Nature* 435(7042):646-651, Perez и др. (2008) *Nature Biotechnology* 26(7):808-816, и как описано в патенте США № 6,534,261. В Таблице 1 показаны распознающие спирали внутри связывающих
30 ДНК доменов типичных ZFP CISH и целевые сайты для данных ZFP (целевые сайты ДНК указаны прописными буквами; неконтактирующие нуклеотиды указаны строчными буквами). Нуклеотиды в целевом сайте, с которыми контактируют распознающие ZFP спирали, указаны прописными буквами; неконтактирующие нуклеотиды указаны строчными буквами. TALEN и/или

онРНК также разработаны для последовательностей *CISH*, представленных в Таблице 2 (например, целевой сайт, содержащий от 9 до 20 или более (включая 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более) нуклеотидов (смежных или несмежных) из целевых сайтов, показанных в Таблице 2), следуя способам, известным в данной области. См., например, патент США № 8,586,526 (применяя канонические или неканонические RVD для TALEN) и публикацию заявки на патент США № 2015/0056705.

Таблица 1. Разработанные распознающие спирали белков с цинковыми пальцами *CISH*.

SBS #	Линкер	Разработка					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	L0	RSDHLSQ (SEQ ID NO: 2)	QNATRTK (SEQ ID NO: 3)	RSDNLSE (SEQ ID NO: 4)	KRCNLRC (SEQ ID NO: 5)	DRSTRTK (SEQ ID NO: 6)	RRDNLHS (SEQ ID NO: 7)
59489	L0	GHTSLKR (SEQ ID NO: 8)	TSGHLSR (SEQ ID NO: 9)	RSDNLAR (SEQ ID NO: 10)	QNVSRPR (SEQ ID NO: 11)	TSGHLSR (SEQ ID NO: 9)	QSGHLSR (SEQ ID NO: 12)
59440	L0	RWQYLPT (SEQ ID NO: 13)	DRSALAR (SEQ ID NO: 14)	RSDNLAR (SEQ ID NO: 10)	DRSNLTR (SEQ ID NO: 15)	QSGNLAR (SEQ ID NO: 16)	ATCCLAH (SEQ ID NO: 17)
59441	L0	RSDDLTR (SEQ ID NO: 18)	QAATLSR (SEQ ID NO: 19)	RSDHLSA (SEQ ID NO: 20)	DRSDLSR (SEQ ID NO: 21)	RSDDLTR (SEQ ID NO: 18)	DRSHLAR (SEQ ID NO: 22)
59558	N6a	QSGDLTR (SEQ ID NO: 23)	QSGNLHV (SEQ ID NO: 24)	QSGHLAR (SEQ ID NO: 25)	NRYDLMT (SEQ ID NO: 26)	RSDSLLR (SEQ ID NO: 27)	CREYRGK (SEQ ID NO: 28)
59557	L0	QSSHLTR (SEQ ID NO: 29)	QSSDLTR (SEQ ID NO: 30)	QSGNLAR (SEQ ID NO: 16)	RLDILQQ (SEQ ID NO: 31)	RSDNLST (SEQ ID NO: 32)	DNSYLPR (SEQ ID NO: 33)
59581	N7a	DRSNLSR (SEQ ID NO: 34)	LRQDLKR (SEQ ID NO: 35)	RSDNLST (SEQ ID NO: 32)	DNSNRIN (SEQ ID NO: 36)	QSSDLR (SEQ ID NO: 37)	WKWNLRA (SEQ ID NO: 38)
59580	L0	RSDSLLR (SEQ ID NO: 27)	CREYRGK (SEQ ID NO: 28)	QSGHLAR (SEQ ID NO: 25)	QKGTIGE (SEQ ID NO: 39)	RSDNLST (SEQ ID NO: 32)	QSGHLSR (SEQ ID NO: 12)

Таблица 2. Целевые сайты белков с цинковыми пальцами

SBS #	Целевой сайт
59488	5' ggAAGGCCcCAGCAGGCAAGGgctgcat (SEQ ID NO: 40)
59489	5' gaGGAGGTgGCAGAGGGTACCCcagccc (SEQ ID NO: 41)
59440	5' ccAGCAAAGGACGAGGTCTAGaaggcag (SEQ ID NO: 42)
59441	5' gtGGAGCGGACTGGGACGCGccccctgt (SEQ ID NO: 43)
59558	5' gaTGCGTGgCCTGGACAAGCAgttgag (SEQ ID NO: 44)
59557	5' gaGTCCAGACGGAAGCTGGAgtcggcat (SEQ ID NO: 45)

59581	5' atAGTGCTgCACAAGGCTGACcacaatcc (SEQ ID NO: 46)
59580	5' ccGGAAAGgCCAGGATGCGTGgcctgga (SEQ ID NO: 47)

[0228] Все попарные комбинации ZFN исследовали на расщепляющую активность. Активированные Т-клетки электропорировали мРНК, кодирующими нацеленные на *CISH* ZFN, в диапазоне концентраций мРНК (от 0,5 мкг до 6 мкг на 3Е6 Т-клеток в 100 мкл реакции трансфекции). Т-клетки размножали в течение 3 - 4 дней после трансфекции, геномную ДНК собирали и эффективность редактирования *CISH* оценивали с помощью глубокого секвенирования. Обнаружили, что все пары были активны, как показано в Таблице 3 (где показан процент расщепления для указанной пары при указанной дозировке, например, 89% расщепления гена *CISH* добились, используя пару 59488/59489, применяя 6 мкг мРНК).

Таблица 3. Опосредованное нуклеазами расщепление.

	Пары ZFN		6 мкг	2 мкг	0,5 мкг
Экзон 2	59488	59489	89	84	60
	59440	59441	84	82	59
Экзон 3	59558	59557	84	80	55
	59581	59580	82	83	72

[0229] Должно быть понятно, что данные разработки могут содержать любой линкер между любыми элементами пальцев и/или между ZFP и расщепляющим доменом, включая, но не ограничиваясь каноническими или неканоническими линкерами (между пальцами) и/или линкерами между ZFP и расщепляющим доменом, как описано в патенте США № 9,394,531. См. также патент США № 8,772,453 и публикацию заявки на патент США № 2015/0064789.

[0230] Более того, любая из нуклеаз (ZFN, систем CRISPR/Cas и TALEN) может содержать сконструированные расщепляющие домены, например, гетеродимеры, описанные в патенте США № 8,623,618 (например, сконструированные расщепляющие домены ELD и KKR), и/или расщепляющие домены с одной или более мутациями в положениях 416, 422, 447, 448, и/или 525, как описано в публикации заявки на патент США № 2018/0087072. ZFN также могут содержать одну или более мутаций в остатках остова ZFP, как описано в

публикации заявки на патент США № 2018/0087072. Данных мутантов использовали в сочетании с типичными связывающими ДНК доменами, описанными в данной заявке.

5 **Пример 2. Нацеленное на *CISH* встраивание донора.**

[0231] Направленное встраивание в локус *CISH* также осуществляли, используя донора AAV GFP. Сначала конструировали донора AAV GFP, чтобы он кодировал кассету экспрессии GFP, которая фланкирована плечами гомологии с 5'- и 3'-стороны от сайта расщепления *CISH*. Когда клетки обрабатывают нацеленным на *CISH* ZFN и вводят вместе с донором AAV, фланкирующие плечи гомологии необходимы, чтобы опосредовать направленное встраивание кассеты экспрессии GFP в сайт расщепления *CISH* посредством пути направляемой гомологией репарации. В данном эксперименте активированные Т-клетки электропорировали мРНК *CISH* и вводили вместе с донором AAV GFP.

10 Эффективность направленного встраивания оценивали через 7 дней с помощью анализа FACS % GFP-положительных клеток.

[0232] На Фигурах 2 и 3 показано, что анализ FACS экспрессии GFP показал, что добились по меньшей мере 70% эффективности встраивания донора (GFP) в клетки, получившие обе нацеленные на *CISH* нуклеазы, описанные в

20 данной заявке, и донора.

Пример 3. Повышенная активация иммуностимуляции после встраивания донора в *CISH* по сравнению с безопасным локусом *AAVS1*.

[0233] Направленное встраивание в локус *CISH* или *AAVS1* также осуществляли, используя донора AAV GFP. Сначала конструировали донора AAV GFP, чтобы он кодировал кассету экспрессии GFP, которая фланкирована плечами гомологии с 5'- и 3'-стороны от сайта расщепления *CISH* или *AAVS1*. Когда клетки обрабатывают нацеленными на *CISH* или *AAVS1* ZFN (*CISH*-специфичные ZFN: SB59440/SB59441 (показанные в Таблице 1 выше); *AAVS1*-специфичные ZFN (включая ZFP, обозначенные SB30054 и SB30035, как описано

25 в патенте США № 9,957,526) и вводят вместе с соответствующим донором AAV, фланкирующие плечи гомологии необходимы, чтобы опосредовать направленное встраивание кассеты экспрессии GFP в сайт расщепления *CISH* или *AAVS1* посредством пути направляемой гомологией репарации. В данном

30

эксперименте активированные Т-клетки электропорировали мРНК ZFN *CISH* или *AAVSI* и вводили вместе с соответствующим донором AAV GFP. Эффективность модификации генома оценивали через 7 дней с помощью анализа Miseq.

5 [0234] На Фигуре 5 показано, что добились высоких уровней эффективности модификации генома в клетках, получивших нацеленные на *CISH* или *AAVSI* нуклеазы, описанные в данной заявке, и донора AAV GFP. На Фигуре 6 продемонстрировано, что направленное встраивание донора GFP в *CISH* повышает иммуностимулирующую функцию эффекторных Т-клеток после опосредованной TCR активации, предположительно вследствие нокаута
10 экспрессии *CISH* - представителя семейства супрессоров передачи сигналов цитокинов (SOCS).

Пример 4. Способы *ex vivo*.

15 [0235] Генетически модифицированные клетки (например, Т-клетки или гемопоэтические стволовые клетки), описанные в данной заявке, содержащие трансген, встроенный в ген *CISH* (например, CAR и/или другой терапевтический трансген), вводили пациентам с раком или воспалительным расстройством. Введение (однократное или многократное введение доз) клеток осуществляли любым способом, известным в области терапии клетками. Состояние
20 заболевания или расстройства (или его симптомов) улучшается после введения.

[0236] Все патенты, заявки на патент и публикации заявок на патент, упомянутые в данной заявке, настоящим полностью включены посредством ссылки.

25 [0237] Хотя настоящее описание было предложено с некоторыми подробностями в качестве иллюстрации и примера с целью ясности понимания, специалистам в данной области должно быть понятно, что можно применять на практике различные изменения и модификации, не отклоняясь от сущности и объема изобретения. Соответственно, предшествующее описание и примеры не
30 должны истолковываться как ограничивающие настоящее изобретение.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически модифицированная клетка, содержащая геномную модификацию в экзоне 2 или экзоне 3 эндогенного гена *CISH*.
5
2. Генетически модифицированная клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанная геномная модификация выбрана из группы, состоящей из вставок и/или делеций.
- 10 3. Генетически модифицированная клетка по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что в ген *CISH* встроены один или более трансгенов.
4. Генетически модифицированная клетка по п. 3, отличающаяся тем, что указанный трансген кодирует химерный антигенный рецептор (CAR),
15 иммуномодулирующий фактор, сконструированный или экзогенный Т-клеточный рецептор (TCR).
5. Генетически модифицированная клетка по п. 4, отличающаяся тем, что указанный сконструированный TCR представляет собой связанные с антителом
20 Т-клеточные рецепторы (ACTR).
6. Генетически модифицированная клетка по любому из пп. 1 - 5, отличающаяся тем, что ген *CISH* модифицирован после расщепления нуклеазой.
- 25 7. Генетически модифицированная клетка по п. 6, отличающаяся тем, что указанная нуклеаза выбрана из группы, состоящей из нуклеазы с цинковыми пальцами, TALEN и/или системы нуклеаз CRISPR/Cas.
8. Генетически модифицированная клетка по п. 6 или п. 7, отличающаяся
30 тем, что указанная нуклеаза содержит связывающий ДНК домен, который связывается с целевым сайтом, представленным в Таблице 2.
9. Генетически модифицированная клетка по п. 7 или п. 8, отличающаяся тем, что указанная нуклеаза с цинковыми пальцами содержит белок с цинковыми

пальцами, содержащий 4, 5 или 6 доменов с цинковыми пальцами, содержащих распознающую спираль, и дополнительно при этом указанный белок с цинковыми пальцами содержит участки распознающей спирали из белков, обозначенных SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 или SBS#59580.

10. Генетически модифицированная клетка по любому из пп. 1 - 9 или клетка, происходящая из нее, отличающаяся тем, что указанная клетка выбрана из группы, состоящей из гемопозитической стволовой клетки, эффекторной Т-клетки и регуляторной Т-клетки.

11. Белок с цинковыми пальцами, содержащий 6 доменов с цинковыми пальцами, каждый из которых содержит участок распознающей спирали, при этом указанный белок с цинковыми пальцами содержит участки распознающей спирали из белков, обозначенных SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 или SBS#59580.

12. Слитый белок, содержащий белок с цинковыми пальцами по п. 11 и расщепляющий домен дикого типа или сконструированный расщепляющий домен или расщепляющий полудомен дикого типа или сконструированный расщепляющий полудомен.

13. Полинуклеотид, кодирующий один или более белков по п. 11 или п. 12.

14. Выделенная клетка, содержащая один или более белков по п. 11 или п. 12 и/или один или более полинуклеотидов по п. 13.

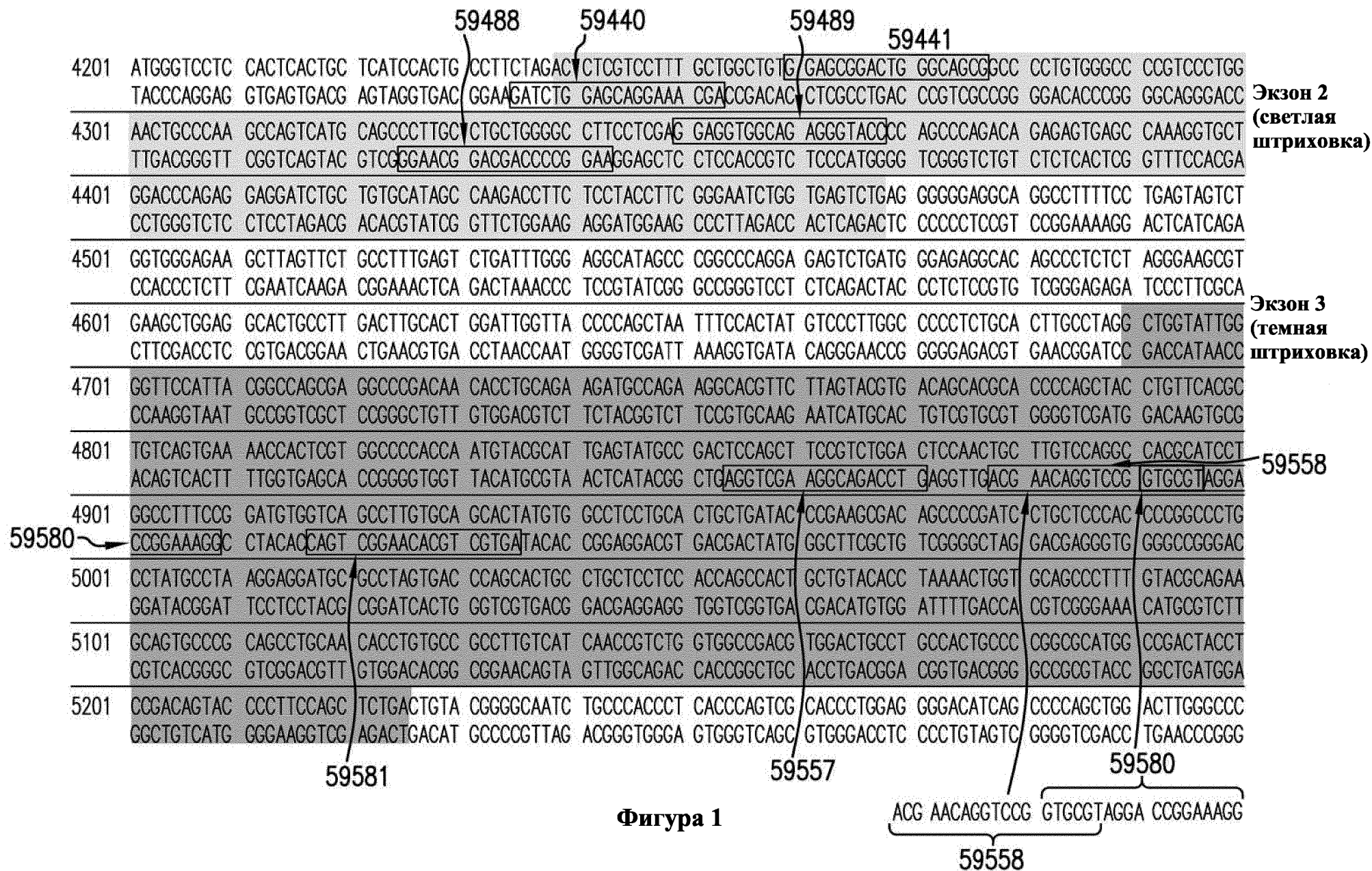
15. Выделенная клетка по п. 14 или клетка, происходящая из нее, отличающаяся тем, что указанная клетка выбрана из группы, состоящей из эффекторной Т-клетки, регуляторной Т-клетки и гемопозитической стволовой клетки.

16. Набор, содержащий один или более белков по п. 11 или п. 12, один или более полинуклеотидов по п. 13 и/или одну или более выделенных клеток по п. 14 или п. 15.

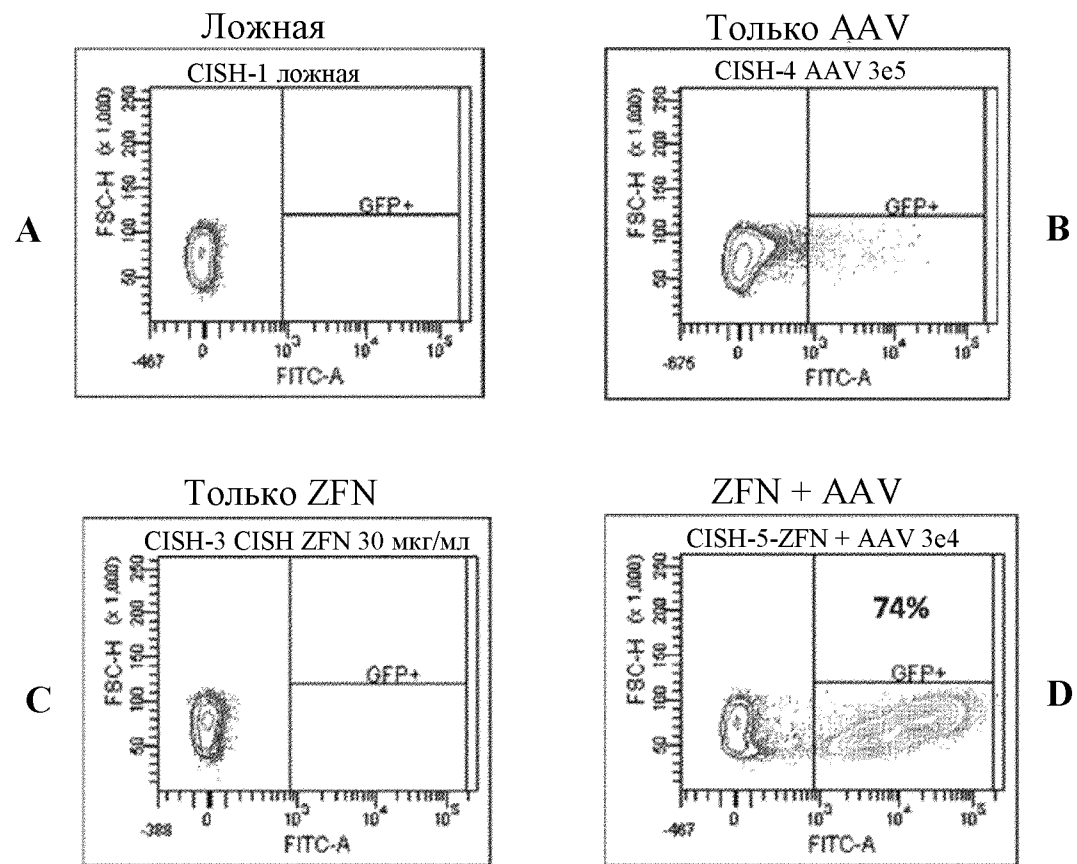
5 17. Способ получения генетически модифицированной клетки согласно любому из пп. 1 - 15, при этом указанный способ включает введение в клетку одного или более полинуклеотидов, кодирующих одну или более нуклеаз, содержащих связывающий ДНК домен, который связывается с целевым сайтом в экзоне 2 или экзоне 3 гена *CISH*, причем указанная нуклеаза связывается с геном
10 *CISH* и расщепляет его, тем самым обеспечивая генетическую модификацию указанной клетки.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанная генетически модифицированная клетка содержит трансген, который встроен в ген *CISH* и
15 экспрессируется в указанной клетке.

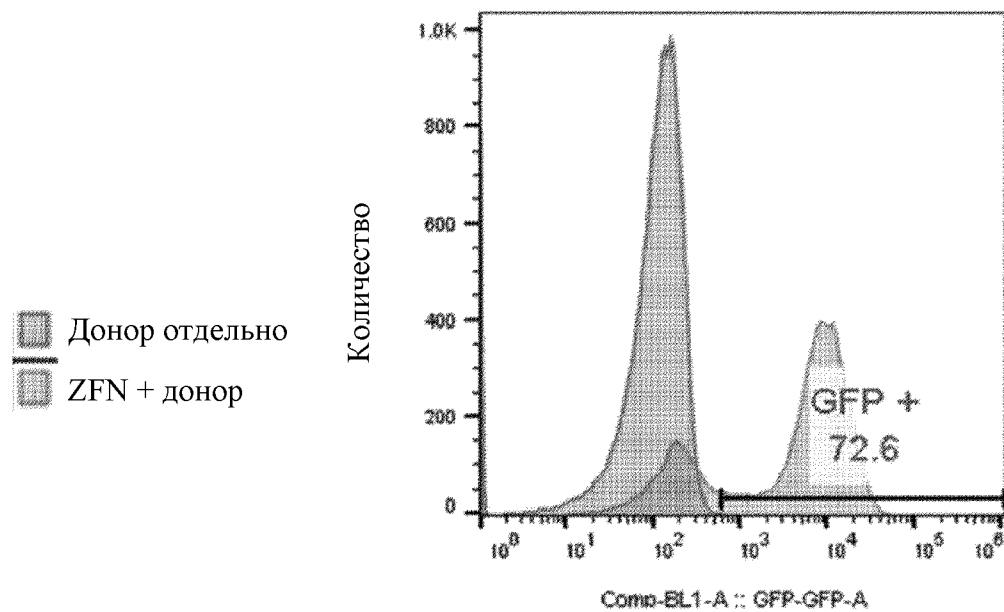
19. Способ обеспечения белка нуждающемуся в этом субъекту, указанный способ включает введение генетически модифицированной клетки согласно любому из пп. 3 - 15, причем указанная клетка экспрессирует указанный трансген
20 в организме указанного субъекта.



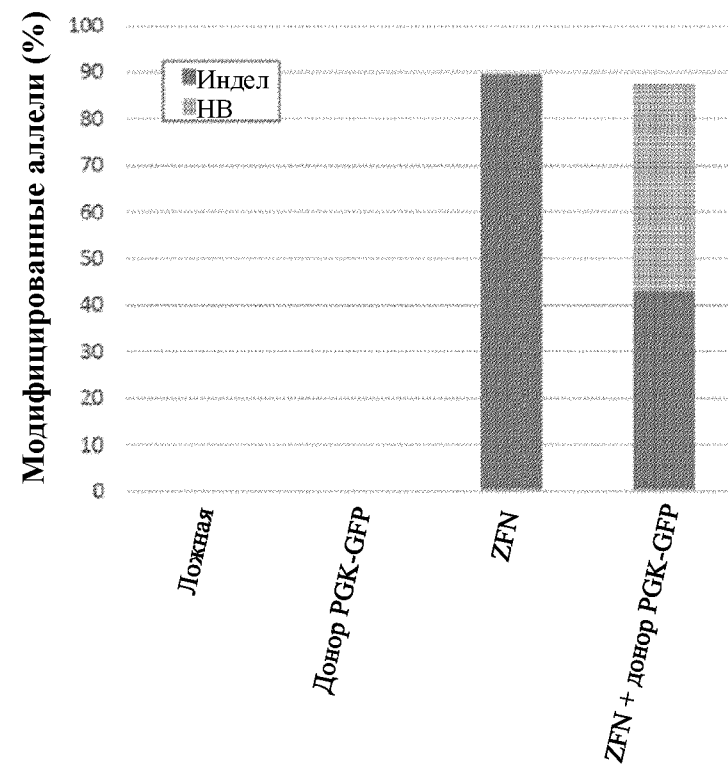
Фигура 2



Фигура 3
hPGK-GFP

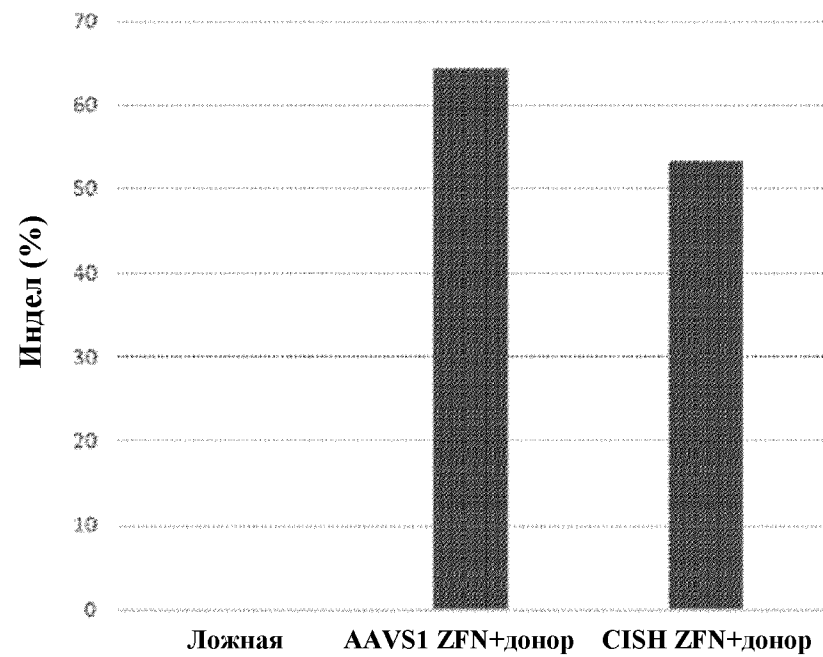


Фигура 4



Фигура 5

Сравнение CISH и AAVS1 ZFN, эффекторные Т-клетки человека



Фигура 6

Сравнение CISH и AAVS1 ZFN, эффекторные Т-клетки человека

