

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190709** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.07.23

(51) Int. Cl. *C07K 14/74* (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.09.07

(54) **УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ДОНОРСКИЕ КЛЕТКИ**

(31) 62/728,529

(72) Изобретатель:

(32) 2018.09.07

Резаниа Алиреза, Хо Тони У., Рамос-Зейес Ребека (US)

(33) US

(86) PCT/IB2019/057555

(74) Представитель:

(87) WO 2020/049535 2020.03.12

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(57) В данном документе представлены генетически модифицированные клетки, которые совместимы со многими субъектами, например универсальные донорские клетки, и способы получения указанных генетически модифицированных клеток. Универсальные донорские клетки содержат по меньшей мере одну генетическую модификацию в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним, по меньшей мере одну генетическую модификацию, которая обеспечивает повышение экспрессии по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, и необязательно по меньшей мере одну генетическую модификацию, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания.

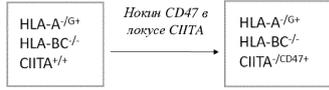
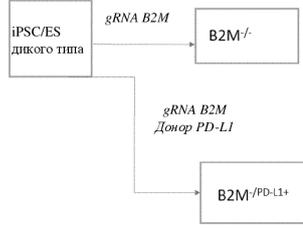
	Нейронные клетки	Клетки поджелудочной железы	Другие направления дифференцировки
Примеры мишеней	Нокаут B2M Слияние B2M/HLA-G с нокаутом	Нокаут B2M Нокаут СИТА Нокаут PD-L1 Нокаут CTLA4-Ig	Нокаут HLA-ABC Нокаут HLA-G Нокаут СИТА Нокаут CD47
Другие мишени/промоторы	Гены, которые необходимы для выживания клеток Переключатели на самоубийство: HSV-tk, iCaspase9 Промоторы: конститутивные промоторы, клеточноспецифические промоторы, эндогенные промоторы		

202190709

A1

A1

202190709



ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567385EA/025

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ДОНОРСКИЕ КЛЕТКИ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/728529, поданной 7 сентября 2018 года, раскрытие которой тем самым включено посредством ссылки в своем полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к области генного редактирования и в некоторых вариантах осуществления к генетическим модификациям в целях создания клеток, совместимых с множеством субъектов, например, универсальных донорских клеток.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Были предложены различные подходы для преодоления аллогенного отторжения трансплантированных или прививаемых клеток, включая HLA-типирование, блокирование сигнальных путей, которые запускают активацию Т-клеток с помощью антител, использование смеси иммуносупрессивных лекарственных средств и аутологичную клеточную терапию. Другая стратегия подавления отторжения трансплантата предусматривает минимизацию аллогенных различий между трансплантируемыми или прививаемыми клетками и реципиентом. Экспрессируемые на поверхности клетки лейкоцитарные антигены человека (HLA), молекулы, кодируемые генами, расположенными в главном комплексе гистосовместимости человека на хромосоме 6, являются основными медиаторами иммунного отторжения. Несовместимость одного гена HLA у донора и субъекта может вызвать устойчивый иммунный ответ (Fleischhauer K. et al. "Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44," N Engl J Med., 1990, 323:1818-1822). Гены HLA подразделяются на MHC класса I (MHC-I) и MHC класса II (MHC-II). Гены MHC-I (HLA-A, HLA-B и HLA-C) экспрессируются практически во всех типах клеток тканей, презентующих "не являющиеся своими" антигенпроцессированные пептиды CD8⁺ Т-клеткам, тем самым способствуя их активации до цитолитической CD8⁺ Т-клетки. Трансплантированные или привитые клетки, экспрессирующие "не являющиеся своими" молекулы MHC-I, будут вызывать устойчивый клеточный иммунный ответ, направленный на эти клетки и в конечном итоге приводящий к их гибели под действием активированных цитолитических CD8⁺ Т-клеток. Белки MHC-I тесно связаны с бета-2-микроглобулином (B2M) в эндоплазматическом ретикулуме, что важно для образования функциональных молекул MHC-I на поверхности клетки.

[0004] В отличие от повсеместной клеточной экспрессии генов MHC-I, экспрессия генов MHC-II ограничена антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки, макрофаги и В-клетки. Гены антигена HLA являются наиболее полиморфными генами, наблюдаемыми в геноме человека (Rubinstein P., "HLA matching for bone marrow

transplantation--how much is enough?" *N Engl J Med*, 2001, 345:1842-1844). Создание «универсальной донорской» клетки, совместимой с любым генотипом HLA, обеспечивает альтернативную стратегию, которая может устранить иммунное отторжение и связанные с этим экономические затраты на существующие методологии для ускользания от иммунного надзора.

[0005] Один из предыдущих подходов для создания такой линии универсальной(-ых) донорской(-их) клетки(клеток) заключался в функциональном нарушении экспрессии генов классов MHC-I и MHC-II. Этого можно достичь посредством генетического нарушения, например, обоих генетических аллелей, кодирующих легкую цепь MHC-I, B2M. Предполагают, что полученная в результате линия клеток с КО по B2M и ее производные будут демонстрировать значительную сниженную экспрессию поверхностного MHC-I и, таким образом, сниженную иммуногенность по отношению к аллогенным CD8+ Т-клеткам. Подход нацеливания эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), был использован для создания B2M-дефектных линий hESC путем делеции нескольких нуклеотидов в экзоне 2 гена B2M (Lu, P. et al., "Generating hypoinmunogenic human embryonic stem cells by the disruption of beta 2-microglobulin," *Stem Cell Rev.* 2013, 9:806-813). Хотя линии hESC, нацеленные на B2M, оказались с дефицитом поверхностного HLA-I, обнаружили, что они по-прежнему содержат мРНК, специфические для B2M и MHC-I. мРНК B2M и MHC-I экспрессировались на уровнях, эквивалентных уровням нецелевых hESC (как конститутивных, так и индуцированных IFN-g). Таким образом, существует опасение того, что эти линии hESC, TALEN-нацеленными B2M, могут экспрессировать остаточный MHC-I клеточной поверхности, которого было бы достаточно, чтобы вызвать иммунное отторжение, что наблюдали с клетками мышей B2M2/2, которые также экспрессируют мРНК B2M (Gross, R. and Rappuoli, R. "Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation," *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90:3913-3917). Хотя линии hESC с TALEN-нацеленными B2M, не исследовали на предмет событий нецелевого расщепления, возникновение неспецифического расщепления при использовании TALEN остается серьезной проблемой, которая может вызвать серьезное беспокойство по поводу безопасности их клинического применения (Grau, J. et al. "TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction," *Bioinformatics*, 2013, 29:2931-2932; Guilinger J.P. et al. "Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity," *Nat Methods* 2014, 11:429-435). Кроме того, в другом отчете сообщали о создании клеток IPS, которые ускользали от аллогенного распознавания за счет нокаута первого аллеля B2M и нокина гена HLA-E на втором аллеле B2M, что привело к поверхностной экспрессии димеров или тримеров HLA-E в отсутствие поверхностной экспрессии HLA-A, HLA-B или HLA-C (Gornalusse, G.G. et al., "HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells," *Nature Biotechnology*, 2017, 35, 765-773).

[0006] Потенциальным ограничением некоторых из упомянутых выше стратегий

является то, что клетки, негативные по МНС класса I, чувствительны к лизису естественными клетками-киллерами (NK), поскольку молекулы HLA служат основными ингибиторами лигандов для естественных клеток-киллеров (NK). Было показано, что клетки-хозяева NK устраняют трансплантированные или привитые B2M^{-/-} донорские клетки, и аналогичное явление происходит *in vitro* с негативными по МНС класса I лейкозными линиями человека (Bix, M. et al., "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice," *Nature*, 1991, 349, 329-331; Zacone, D. et al., "Human leukemia-derived cell lines and clones as models for mechanistic analysis of natural killer cell-mediated cytotoxicity," *Cancer Res.* 1987, 47, 2674-2682). Таким образом, существует потребность в улучшении предыдущих способов создания универсальных донорских клеток, которые могут ускользать от иммунного ответа, а также потребность в создании клеток, которые могут выживать после приживления трансплантата. В данном документе описывается, что выживаемость клеток после приживления трансплантата может быть опосредована множеством других сигнальных путей, независимых от аллогенного отторжения, например, гипоксией, активными формами кислорода, депривацией питательных веществ и окислительным стрессом. Также, в данном документе описывается, что генетическое введение факторов выживания (генов и/или белков) может помочь клеткам выжить после приживления трансплантата. Как описывается в данном документе, линия универсальных донорских клеток может сочетать в себе свойства, направленные как на аллогенное отторжение, так и на выживание после приживления трансплантата.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0007] В некоторых аспектах настоящего изобретения охвачены способы получения универсальных донорских клеток. Первый способ предусматривает осуществление генетического модифицирования клетки путем (i) введения делеции и/или вставки по меньшей мере одной пары оснований в геном клетки по сайту в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и (ii) введения в геном клетки вставки из по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте из (i), с получением тем самым универсальной донорской клетки. Второй способ предусматривает осуществление генетического модифицирования клетки путем (i) введения делеции и/или вставки по меньшей мере одной пары оснований в геном клетки по сайту в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и (ii) введения в геном клетки вставки из по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, в локус типа "safe harbor", с получением тем самым универсальной донорской клетки. В

некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка характеризуется повышенным ускользанием от иммунного надзора и/или повышенной выживаемостью клетки по сравнению с немодифицированной клеткой.

[0008] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ген, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II, или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, представляет собой ген МНС-I, выбранный из HLA-A, HLA-B или HLA-C, ген МНС-II, выбранный из HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ или HLA-DR, или ген, выбранный из B2M, NLRC5, СИТА, RFX5, RFXAP или RFXANK.

[0009] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полинуклеотид, который кодирует толерогенный фактор, представляет собой один или несколько полинуклеотидов, которые кодируют один или несколько из PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полинуклеотид, который кодирует толерогенный фактор, функционально связан с экзогенным промотором. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор является конститутивным, индуцируемым, временным, тканеспецифическим или клеточноспецифическим промотором, при этом экзогенный промотор необязательно представляет собой промотор CMV, EF1a, PGK, CAG или UBC.

[00010] В некоторых вариантах осуществления делецию и/или вставку из (i) осуществляют в пределах или рядом с B2M, и при этом вставка из (ii) представляет собой полинуклеотид, кодирующий PD-L1 или HLA-E.

[00011] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает введение по меньшей мере одной генетической модификации, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии по меньшей мере фактора выживания по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна генетическая модификация, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессию по меньшей мере фактора выживания, представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует MANF, что обеспечивает повышение экспрессии MANF по сравнению с немодифицированной клеткой; или делецию и/или вставку по меньшей мере одной пары оснований в пределах гена или рядом с ним, который кодирует ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK, что обеспечивает снижение или устранение экспрессии ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, который кодирует MANF, осуществляют в локус типа "safe harbor" или в ген, относящийся к МНС-I, МНС-II или регулятору транскрипции МНС-I или МНС-II.

[00012] В некоторых вариантах осуществления генетическое модифицирование клетки предусматривает доставку по меньшей мере одной РНК-направляемой эндонуклеазной системы в клетку. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна РНК-направляемая эндонуклеазная система представляет собой систему CRISPR, содержащую CRISPR-нуклеазу и направляющую РНК. В некоторых вариантах

осуществления CRISPR-нуклеаза представляет собой Cas9, Cpf1, их гомолог, их модифицированный вариант, их кодон-оптимизированный вариант или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления CRISPR-нуклеаза представляет собой Cas9 *S. pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления CRISPR-нуклеаза содержит N-концевой сигнал ядерной локализации (NLS) и/или C-концевой NLS. В некоторых вариантах осуществления CRISPR-нуклеаза и направляющая РНК присутствуют при соотношении по весу 1:1.

[00013] В некоторых вариантах осуществления делецию и/или вставку из (i) осуществляют в пределах локуса гена B2M или рядом с ним, и при этом вставка из (ii) представляет собой полинуклеотид, кодирующий PD-L1. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК, используемая для осуществления (i) и (ii), содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну из последовательностей под SEQ ID NO: 1-3 или SEQ ID NO: 35-44. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий PD-L1, фланкирован (a) нуклеотидной последовательностью, характеризующейся гомологией последовательности с участком, расположенным слева от сайта из (i), и (b) нуклеотидной последовательностью, характеризующейся гомологией последовательности с участком, расположенным справа от сайта из (i). В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего PD-L1, осуществляют в локус гена B2M в пределах 50 пар оснований сайта из (i). В некоторых вариантах осуществления (a) полинуклеотид состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 13, и (b) полинуклеотид состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий PD-L1, функционально связан с экзогенным промотором, при этом экзогенный промотор необязательно представляет собой промотор CAG.

[00014] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего, при этом клетка необязательно представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой стволовую клетку, при этом стволовая клетка необязательно представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (PSC), эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гематопозитическую стволовую клетку и клетку-предшественника (HSPC). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой дифференцированную клетку или соматическую клетку.

[00015] В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка способна дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки. В некоторых вариантах осуществления линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой энтодермальные предшественники поджелудочной железы, эндокринные предшественники поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники,

мышечные клетки-предшественники, бластные клетки или нервные клетки-предшественники. В некоторых вариантах осуществления полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы.

[00016] В других аспектах настоящего изобретения охвачена совокупность универсальных донорских клеток, полученных посредством любого из способов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления совокупность универсальных донорских клеток можно поддерживать в течение периода времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки претерпели дифференцировку.

[00017] В дополнительных аспектах настоящего изобретения представлена композиция клеток, которые содержат (i) по меньшей мере одну делецию в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или компоненты или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и (ii) по меньшей мере одну вставку полинуклеотида, который кодирует по меньшей мере один толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом генетической делеции из (i) или содержится в нем.

[00018] В дополнительных аспектах настоящего изобретения представлены способы введения любой из универсальных донорских клеток, раскрываемых в данном документе, нуждающимся в лечении субъектам. В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают получение или обеспечение получения совокупности универсальных донорских клеток, раскрываемых в данном документе, после дифференцировки в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки и введение субъекту линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток. В настоящем изобретении также представлен способ получения клеток для введения нуждающемуся в этом субъекту. Способ предусматривает (i) получение или обеспечение получения любой из универсальных донорских клеток, раскрываемых в данном документе, и (ii) поддержание универсальных донорских клеток в течение времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки дифференцировались в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки. В некоторых вариантах осуществления линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой энтодермальные предшественники поджелудочной железы, эндокринные предшественники поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки или нервные клетки-предшественники. В некоторых вариантах осуществления полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы,

эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека, у которого имеется заболевание, с подозрением на его наличие или у которого имеется риск возникновения заболевания, при этом заболевание может быть генетически наследуемым заболеванием.

[00019] Хотя настоящее изобретение допускает различные модификации и альтернативные формы, его конкретные варианты осуществления показаны в качестве примера в графических материалах и будут подробно описаны в данном документе. Однако следует учитывать, что представленные в данном документе графические материалы и подробное описание не предназначены для ограничения настоящего изобретения конкретными раскрытыми вариантами осуществления, а напротив, целью является охват всех модификаций, эквивалентов и альтернатив, подпадающих под суть и объем настоящего изобретения, определяемый прилагаемой формулой изобретения.

[00020] Другие особенности и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00021] На фиг. **1А - 1С** представлены специфические стратегии генного редактирования для ускользания от иммунного надзора. На фиг. **1А** представлена таблица, в которой описываются иллюстративные модификации для ускользания от иммунного надзора в определенных типах клеток. На фиг. **1В** представлены иллюстративные стратегии для модификации локуса В2М. На фиг. **1С** представлены иллюстративные стратегии для модификации локусов HLA-A, HLA-B/C и СРТА.

[00022] На фиг. **2** показана часть гена В2М (SEQ ID NO: 6) и местоположение gRNA (В2М-1, В2М-2 и В2М-3) для нацеливания на экзон 1. Также показаны местоположения праймеров для ПЦР (В2МF2 и В2МR2).

[00023] На фиг. **3А - 3С** показаны результаты скрининга gRNA В2М в линии iPSC клеток TC-1133. На фиг. **3А** представлен график, демонстрирующий частоты инсерционно-делеционных мутаций (вставок+делений) каждой gRNA В2М. gRNA В2М-1 обеспечивала частоту инсерционно-делеционной мутации $2,5\% \pm 1,1\%$ (n=2). gRNA В2М-2 обеспечивала частоту инсерционно-делеционной мутации $87,6\% \pm 14,1\%$ (n=2). gRNA В2М-3 обеспечивала частоту инсерционно-делеционной мутации $63,9\% \pm 0,9\%$ (n=2). На фиг. **3В** и **3С** представлены графики, демонстрирующие краткое описание распределения результатов инсерционно-делеционной мутации для gRNA В2М-2 (фиг. **3В**) и В2М-3 (фиг. **3С**).

[00024] На фиг. **4А - 4В** показаны результаты нокауты В2М (КО) в iPSC с использованием gRNA В2М-2. На фиг. **4А** представлен график, демонстрирующий краткое описание распределения результатов инсерционно-делеционной мутации для gRNA В2М-2 в iPSC. На фиг. **4В** представлены клоны, гомозиготные ("Номо") по нокауту

(КО) В2М и клоны, гетерозиготные ("Hets") по КО В2М.

[00025] На фиг. **5** показана оценка клонов В2М КО iPSC. Все три тестируемые клонa с КО по В2М демонстрировали сниженную экспрессию мРНК В2М по сравнению с диким типом или немодифицированной клеткой.

[00026] На фиг. **6A - 6D** показана экспрессия В2М и HLA-ABC в клонах В2М КО iPSC после 47-часовой обработки интерфероном-гамма. На фиг. **6A** представлена экспрессия в клетках дикого типа. На фиг. **6B** показана экспрессия в клоне В2М КО С4. На фиг. **6C** представлена экспрессия в клоне В2М КО С9. На фиг. **6D** показана экспрессия в клоне В2М КО С12.

[00027] На фиг. **7A - 7D** показана плюрипотентность клонов В2М КО iPSC посредством оценки уровней экспрессии SSEA-4 и TRA-1-60. На фиг. **7A** представлена экспрессия в клетках дикого типа. На фиг. **7B** показана экспрессия в клоне В2М КО С4. На фиг. **7C** представлена экспрессия в клоне В2М КО С9. На фиг. **7D** показана экспрессия в клоне В2М КО С12.

[00028] На фиг. **8** показан анализ TIDE разрезания gRNA В2М в клетках СуТ49. Тестировали gRNA В2М-1, -2 или -3.

[00029] На фиг. **9A - 9B** показана оценка посредством проточной цитометрии экспрессии В2М с IFN- γ и без IFN- γ в клетках СуТ49 WT (фиг. **9A**) и отредактированных клетках СуТ49 (фиг. **9B**).

[00030] На фиг. **10** показана плазмидная карта донорского вектора В2М-CAGGS-PD-L1 для HDR.

[00031] На фиг. **11** показаны результаты анализа посредством проточной цитометрии на плюрипотентность стволовых клеток В2М КО+PD-L1 KI СуТ49. Полученные клоны были на > 99% дважды положительными по OCT4 и SOX2, двум факторам транскрипции, жизненно важным для плюрипотентности. IgG использовали в качестве отрицательного контроля.

[00032] На фиг. **12A - 12B** показаны результаты анализа посредством проточной цитометрии СуТ49 WT (фиг. **12A**) и полученных из стволовых клеток клонов В2М КО/PD-L1 KI (фиг. **12B**). В клетках WT повышается экспрессия В2М в ответ на IFN γ . Клоны В2М КО/PD-L1 KI полностью экспрессируют PD-L1 и не экспрессируют В2М с обработкой IFN γ или без нее NT-1=без обработки. INTG-1=клетки, обработанные 50 нг/мл IFN γ в течение 48 часов.

[00033] На фиг. **13** показана плазмидная карта донорского вектора В2М-CAGGS-HLA-E для HDR.

[00034] На фиг. **14** показаны результаты анализа посредством проточной цитометрии на плюрипотентность стволовых клеток В2М КО/HLA-E KI СуТ49. Полученные клоны были на > 99% дважды положительными по OCT4 и SOX2, двум факторам транскрипции, жизненно важным для плюрипотентности. IgG использовали в качестве отрицательного контроля.

[00035] На фиг. **15** показаны результаты анализа посредством проточной

цитометрии клеток СуТ49 WT и клона стволовых клеток В2М КО/HLA-E К1 СуТ49. В клетках WT повышается экспрессия HLA-A, B,C в ответ на IFN γ . Клон В2М КО/HLA-E К1 не экспрессирует HLA-A, B,C с обработкой IFN γ и без нее. IFN γ =50 нг/мл. Клетки обрабатывали IFN γ в течение 48 часов.

[00036] На фиг. **16** показаны результаты анализа посредством проточной цитометрии экспрессии HLA-E клоном стволовых клеток В2М КО/HLA-E К1 СуТ49. Неотредактированный клон использовали в качестве контроля для экспрессии HLA-E.

[00037] На фиг. **17** показаны результаты проточной цитометрии для FOXA2 и SOX17 на стадии 1 (дефинитивная энтодерма) клеток, дифференцированных из hESC дикого типа, PD-L1 К1/В2М КО или В2МКО.

[00038] На фиг. **18** показана количественная экспрессия в процентах FOXA2 и SOX17 на стадии 1 (дефинитивная энтодерма) клеток, дифференцированных из клеток дикого типа, PD-L1 К1/В2М КО или В2М КО.

[00039] На фиг. **19** показана количественная экспрессия в процентах CHGA, PDX1 и NKX6.1 на стадии 4 (PEC) клеток, дифференцированных из клеток дикого типа, В2М КО, PD-L1 К1/В2М КО (V1A) или HLA-E К1/В2М КО (V2A).

[00040] На фиг. **20** показаны гетерогенные популяции клеток на стадии 4 (PEC).

[00041] На фиг. **21A - 21B** показана экспрессия выбранного гена в зависимости от времени дифференцировки в клетках, дифференцированных из клеток дикого типа, PD-L1К1/В2МКО или В2МКО (фиг. **21A**), и в клетках, дифференцированных из клеток В2М КО/HLA-E К1 (V2A) (фиг. **21B**).

[00042] На фиг. **22A-22F** показана экспрессия В2М и PD-L1 на стадии PEC в клетках, дифференцированных из клеток дикого типа, PD-L1 К1/В2М КО или В2М КО. На фиг. **22A** показана экспрессия В2М в клетках дикого типа. На фиг. **22B** показана экспрессия В2М в клетках В2М КО. На фиг. **22C** показана экспрессия В2М в клетках PD-L1 К1/В2М КО. На фиг. **22D** показана экспрессия PD-L1 в клетках дикого типа. На фиг. **22E** показана экспрессия PD-L1 в клетках В2М КО. На фиг. **22F** показана экспрессия PD-L1 в клетках PD-L1 К1/В2М КО.

[00043] На фиг. **23A - 23F** показана экспрессия МНС класса I и класса II на стадии PEC в клетках, дифференцированных из клеток дикого типа, PD-L1 К1/В2М КО или В2М КО. На фиг. **23A** показана экспрессия МНС класса I в клетках дикого типа. На фиг. **23B** показана экспрессия МНС класса I в клетках В2М КО. На фиг. **23C** показана экспрессия МНС класса I в клетках PD-L1 К1/В2М КО. На фиг. **23D** показана экспрессия МНС класса II PD-L1 в клетках дикого типа. На фиг. **23E** показана экспрессия МНС класса II в клетках В2М КО. На фиг. **23F** показана экспрессия МНС класса II в клетках PD-L1 К1/В2М КО.

[00044] На фиг. **24A - 24D** показаны результаты анализа посредством проточной цитометрии по активации Т-клеток с использованием анализа пролиферации с помощью CFSE. Человеческие первичные CD3⁺ Т-клетки совместно инкубировали с PEC, полученным из WT, клонами В2М КО или В2М КО/PD-L1 К1 СуТ49. На фиг. **24A** показана активация в клетках дикого типа. На фиг. **24B** показана активация в клетках PD-

L1 KI/B2M KO. На фиг. 24C показана активация в клетках B2M KO. На фиг. 24D кратко описана активация T-клеток в различных клетках. Однофакторный ANOVA ($\alpha = 0,05$ с тестом множественных сравнений Даннета) с "CFSE-T отдельно", взятым в качестве контроля. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. n.s. = статистически незначимый.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Определения

[00045] *Делеция*. Используемый в данном документе термин "делеция", который может быть использован взаимозаменяемо с терминами "генетическая делеция" или "нокаут", как правило, относится к генетической модификации, при которой сайт или участок геномной ДНК удаляют посредством любого способа молекулярной биологии, например, посредством способов, описываемых в данном документе, например, путем доставки в сайт геномной ДНК эндонуклеазы и по меньшей мере одной gRNA. Может быть удалено любое количество нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере десяти, по меньшей мере пятнадцати, по меньшей мере двадцати или по меньшей мере 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление 10-50, 25-75, 50-100, 50-200 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление всего гена-мишени, например, гена B2M. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление части гена-мишени, например, всего или части промотора и/или кодирующей последовательности гена B2M. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление регулятора транскрипции, например промоторного участка, гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление всего или части кодирующего участка, в результате чего продукт, обычно экспрессируемый кодирующим участком, больше не экспрессируется, экспрессируется в усеченной форме или экспрессируется на пониженном уровне. В некоторых вариантах осуществления делеция приводит к снижению экспрессии гена по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00046] *Эндонуклеаза*. Используемый в данном документе термин "эндонуклеаза", как правило, относится к ферменту, который расщепляет фосфодиэфирные связи в полинуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза специфически расщепляет фосфодиэфирные связи в полинуклеотиде ДНК. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), хоминг-эндонуклеазу (HE), мегануклеазу, MegaTAL или CRISPR-ассоциированную эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой РНК-направляемую эндонуклеазу. В определенных аспектах РНК-направляемая эндонуклеаза представляет собой CRISPR-нуклеазу, например, CRISPR-эндонуклеазу Cas9 II типа или

CRISPR-эндонуклеазу Cpf1 V типа. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известную как Csn1 и Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, или Cpf1 или ее гомолог, рекомбинантный вариант ее встречающейся в природе молекулы, ее кодон-оптимизированный вариант или ее модифицированный вариант или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза может вводить один или несколько однонитевых разрывов (SSB) и/или один или несколько двухнитевых разрывов (DSB).

[00047] **Генетическая модификация.** Используемый в данном документе термин "генетическая модификация", как правило, относится к сайту геномной ДНК, который был генетически отредактирован или подвергнут манипуляциям с использованием любого молекулярно-биологического способа, например, способов, описываемых в данном документе, например, путем доставки в сайт геномной ДНК эндонуклеазы и по меньшей мере одной gRNA. Иллюстративные генетические модификации включают вставки, делеции, дупликации, инверсии и транслокации и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления генетической модификацией является делеция. В некоторых вариантах осуществления генетической модификацией является вставка. В других вариантах осуществления генетической модификацией является мутация типа "вставка-делеция" (или инсерционно-делеционная мутация), которая приводит к тому, что рамка считывания гена-мишени сдвигается, что дает измененный генный продукт или отсутствие генного продукта.

[00048] **Направляющая РНК (gRNA).** Используемый в данном документе термин "направляющая РНК" или "gRNA", как правило, относится к короткой рибонуклеиновой кислоте, которая может взаимодействовать, например связываться, с эндонуклеазой и связываться или гибридизироваться с геномным сайтом-мишенью или участком-мишенью. В некоторых вариантах осуществления gRNA представляет собой одномолекулярную направляющую РНК (sgRNA). В некоторых вариантах осуществления gRNA может содержать спейсерный участок удлинения. В некоторых вариантах осуществления gRNA может содержать участок удлинения tracrRNA. В некоторых вариантах осуществления gRNA является однонитевой. В некоторых вариантах осуществления gRNA содержит встречающиеся в природе нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления gRNA представляет собой химически модифицированную gRNA. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA представляет собой gRNA, которая содержит по меньшей мере один нуклеотид с химической модификацией, например 2'-О-метил-модификацией сахара. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA содержит модифицированный каркас нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA содержит 2'-О-метил-фосфотиоатный остаток. В

некоторых вариантах осуществления gRNA может быть предварительно составлена в комплекс с ДНК-эндонуклеазой.

[00049] **Вставка.** Используемый в данном документе термин "вставка", который может быть использован взаимозаменяемо с терминами "генетическая вставка" или "нокин", как правило, относится к генетической модификации, при которой полинуклеотид вводят или добавляют в сайт или участок геномной ДНК посредством любого молекулярно-биологического способа, например, посредством способов, описываемых в данном документе, например, путем доставки в сайт геномной ДНК эндонуклеазы и по меньшей мере одной gRNA. В некоторых вариантах осуществления вставку можно осуществлять в пределах сайта геномной ДНК или рядом с ним, который являлся сайтом для предыдущей генетической модификации, например, делеции или мутации типа "вставка-делеция". В некоторых вариантах осуществления вставку осуществляют по сайту геномной ДНК, которая частично перекрывается, полностью перекрывается или содержится в сайте предварительной генетической модификации, например, делеции или мутации типа "вставка-делеция". В некоторых вариантах осуществления вставку осуществляют в локус типа "safe harbor". В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает введение полинуклеотида, который кодирует представляющий интерес белок. В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает введение полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор. В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает введение полинуклеотида, который кодирует фактор выживания. В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает введение экзогенного промотора, например, конститутивного промотора, например, промотора СAG. В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает введение полинуклеотида, который кодирует некодирующий ген. Обычно полинуклеотид, подлежащий вставке, фланкирован последовательностями (например, плечами гомологии), характеризующимися значительной гомологией последовательностей с геномной ДНК в сайте вставки или рядом с ним.

[00050] **Главный комплекс гистосовместимости класса I (МНС-I).** Используемые в данном документе термины "главный комплекс гистосовместимости класса I" или "МНС-I", как правило, относятся к классу биологических молекул, которые расположены на клеточной поверхности всех ядродержащих клеток у позвоночных, в том числе млекопитающих, например людей; и функционируют с представлением пептидов не являющихся своими или чужеродных антигенов, например белков, из клетки (т. е. цитозоля) цитотоксическим Т-клеткам, например CD8+ Т-клеткам, для стимуляции иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула МНС-I представляет собой ген МНС-I или белок МНС-I. Образование комплекса белков МНС-I с белком бета-2-микроглобулином (В2М) необходимо для экспрессии на клеточной поверхности всех белков МНС-I. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) МНС-I по сравнению с немодифицированной клеткой предусматривает снижение (или уменьшение) экспрессии

гена МНС-I. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) МНС-I по сравнению с немодифицированной клеткой предусматривает снижение (или уменьшение) экспрессии на клеточной поверхности белка МНС-I. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула МНС-I представляет собой HLA-A (NCBI Gene ID No: 3105), HLA-B (NCBI Gene ID No: 3106), HLA-C (NCBI Gene ID No: 3107) или В2М (NCBI Gene ID No: 567).

[00051] *Главный комплекс гистосовместимости класса II (МНС-II).* Используемые в данном документе термины "главный комплекс гистосовместимости класса II" или "МНС-II", как правило, относятся к классу биологических молекул, которые обычно находятся на клеточной поверхности антигенпрезентирующих клеток у позвоночных, в том числе млекопитающих, например, людей, и они осуществляют свою функцию с представлением пептидов не являющихся своими или чужеродных антигенов, например, белков, вне клетки (внеклеточно) цитотоксическим Т-клеткам, например CD8+ Т-клеткам, для стимуляции иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующая клетка представляет собой дендритную клетку, макрофаг или В-клетку. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула МНС-II представляет собой ген МНС-II или белок МНС-II. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой предусматривает снижение (или уменьшение) экспрессии гена МНС-II. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой предусматривает снижение (или уменьшение) экспрессии на клеточной поверхности белка МНС-II. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула МНС-II представляет собой HLA-DPA (NCBI Gene ID No: 3113), HLA-DPB (NCBI Gene ID No: 3115), HLA-DMA (NCBI Gene ID No: 3108), HLA-DMB (NCBI Gene ID No: 3109), HLA-DOA (NCBI Gene ID No: 3111), HLA-DOB (NCBI Gene ID No: 3112), HLA-DQA (NCBI Gene ID No: 3117), HLA-DQB (NCBI Gene ID No: 3119), HLA-DRA (NCBI Gene ID No: 3122) или HLA-DRB (NCBI Gene ID No: 3123).

[00052] *Полинуклеотид.* Используемый в данном документе термин "полинуклеотид", который может быть использован взаимозаменяемо с термином "нуклеиновая кислота", как правило, относится к биологической молекуле, которая содержит два или более нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере два, по меньшей мере пять, по меньшей мере десять, по меньшей мере двадцать, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 500 или любое количество нуклеотидов. Полинуклеотид может представлять собой молекулу ДНК или РНК или гибридную молекулу ДНК/РНК. Полинуклеотид может быть одонитевым или двухнитевым. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является сайтом или участком геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой эндогенный ген, который содержится в геноме

немодифицированной клетки или универсальной донорской клетки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является экзогенным полинуклеотидом, который не интегрирован в геномную ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является экзогенным полинуклеотидом, который интегрирован в геномную ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой плазмиду или вектор на основе аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является кольцевой или линейной молекулой.

[00053] **Локус *muna* "safe harbor"**. Используемый в данном документе термин локус типа "safe harbor", как правило, относится к любым местоположению, сайту или участку геномной ДНК, которые в состоянии обеспечить генетическую вставку в указанные местоположение, сайт или участок без неблагоприятных воздействий на клетку. В некоторых вариантах осуществления локус типа "safe harbor" представляет собой внутригенный или экстрагенный участок. В некоторых вариантах осуществления локус типа "safe harbor" представляет собой участок геномной ДНК, которая, как правило, транскрипционно неактивна. В некоторых вариантах осуществления локус типа "safe harbor" представляет собой локус AAVS1 (PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF или TTR. В некоторых вариантах осуществления локус типа "safe harbor" описан у Sadelain, M. et al, "Safe harbours for the integration of new ДНК in the human genome," Nature Reviews Cancer, 2012, Vol 12, pages 51-58.

[00054] **Переключатель безопасности**. Используемый в данном документе термин "переключатель безопасности", как правило, относится к биологической молекуле, которая приводит клетку к апоптозу. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности представляет собой белок или ген. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности представляет собой суицидальный ген. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности, например тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-tk), приводит клетку к апоптозу за счет метаболизма пролекарства, например ганцикловира. В некоторых вариантах осуществления сверхэкспрессированное присутствие переключателя безопасности само по себе приводит клетку к апоптозу. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности представляет собой молекулу на основе p53, HSV-tk или индуцируемую каспазу-9.

[00055] **Субъект**. Используемый в данном документе термин "субъект" относится к млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления субъектом является отличный от человека примат или грызун. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется заболевание, с подозрением на его наличие или у него имеется риск возникновения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется один или несколько симптомов заболевания или нарушения.

[00056] **Фактор выживания**. Используемый в данном документе термин "фактор

выживания", как правило, относится к белку (например, экспрессируемому полинуклеотидом, описываемым в данном документе), который при увеличении или уменьшении в клетке позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, выживать после трансплантации или приживления у субъекта-хозяина при более высоких показателях выживаемости по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания представляет собой человеческий фактор выживания. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания является представителем критического сигнального пути, вовлеченного в выживаемость клетки. В некоторых вариантах осуществления критический сигнальный путь, вовлеченный в выживаемость клетки, влияет на гипоксию, активные формы кислорода, истощение питательных веществ и/или оксидативный стресс. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, например делеция или вставка, по меньшей мере одного фактора выживания обеспечивает выживание универсальной донорской клетки на протяжении более длительного периода времени, например, на протяжении периода времени, который в по меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 раз превышает такой период времени у немодифицированной клетки после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания представляет собой ZNF143 (NCBI Gene ID No: 7702), TXNIP (NCBI Gene ID No: 10628), FOXO1 (NCBI Gene ID No: 2308), JNK (NCBI Gene ID No: 5599) или MANF (NCBI Gene ID No: 7873). В некоторых вариантах осуществления фактор выживания вставляют в клетку, например универсальную донорскую клетку. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания удаляют из клетки, например универсальной донорской клетки. В некоторых вариантах осуществления вставка полинуклеотида, который кодирует MANF, позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, выживать после трансплантации субъекту-реципиенту или приживления трансплантата в субъекте-реципиенте при более высоких показателях выживаемости по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления делеция или мутация типа "вставка-делеция" в пределах гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK или рядом с ним позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, выживать после трансплантации субъекту-реципиенту или приживления трансплантата в субъекте-хозяине при более высоких показателях выживаемости по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00057] **Толерогенный фактор.** Используемый в данном документе термин "толорогенный фактор", как правило, относится к белку (например, экспрессируемому полинуклеотидом, описываемым в данном документе), который при увеличении или уменьшении в клетке позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения после трансплантации субъекту-реципиенту или приживления трансплантата у субъекта-реципиента при более высоких коэффициентах по сравнению с немодифицированной

клеткой. В некоторых вариантах осуществления толерогенный фактор представляет собой человеческий толерогенный фактор. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация по меньшей мере одного толерогенного фактора (например, вставка или делеция по меньшей мере одного толерогенного фактора) позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения с коэффициентами, которые в по меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 раз превышают такие коэффициенты у немодифицированной клетки после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления толерогенный фактор представляет собой HLA-E (NCBI Gene ID No: 3133), HLA-G (NCBI Gene ID No: 3135), CTLA-4 (NCBI Gene ID No: 1493), CD47 (NCBI Gene ID No: 961) или PD-L1 (NCBI Gene ID No: 29126). В некоторых вариантах осуществления толерогенный фактор вставляют в клетку, например универсальную донорскую клетку. В некоторых вариантах осуществления толерогенный фактор удаляют из клетки, например универсальной донорской клетки. В некоторых вариантах осуществления вставка полинуклеотида, который кодирует HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 и/или PD-L1, позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения после трансплантации субъекту-реципиенту или приживления трансплантата у субъекта-реципиента.

[00058] *Регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II.* Используемый в данном документе термин "регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II", как правило, относится к биологической молекуле, которая модулирует, например повышает или снижает, экспрессию человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I и/или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула представляет собой полинуклеотид, например ген или белок. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II будет повышать или снижать экспрессию на клеточной поверхности по меньшей мере одного белка МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II будет повышать или снижать экспрессию по меньшей мере одного гена МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции представляет собой СРТА (NCBI Gene ID No: 4261) или NLRC5 (NCBI Gene ID No: 84166). В некоторых вариантах осуществления делеция или уменьшение экспрессии СРТА или NLRC5 обеспечивает снижение экспрессии по меньшей мере одного гена МНС-I или МНС-II.

[00059] *Универсальная донорская клетка.* Используемый в данном документе термин "универсальная донорская клетка", как правило, относится к генетически модифицированной клетке, которая менее восприимчива к аллогенному отторжению в ходе клеточной трансплантации и/или демонстрирует повышенную выживаемость после трансплантации по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированная клетка, описываемая в данном документе,

является универсальной донорской клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка характеризуется повышенным ускользанием от иммунного надзора и/или повышенной выживаемостью клетки по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка характеризуется повышенной выживаемостью клетки по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка может быть стволовой клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка может представлять собой эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гематопозитическую стволовую клетку или клетку-предшественника (HSPC). В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка может быть дифференцированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка может быть соматической клеткой (например, клетками иммунной системы). В некоторых вариантах осуществления универсальную донорскую клетку вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления универсальную донорскую клетку вводят субъекту, у которого имеется заболевание, с подозрением на его наличие или у которого имеется риск возникновения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка способна дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки. В некоторых вариантах осуществления линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой энтодермальные предшественники поджелудочной железы, эндокринные предшественники поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки или нервные клетки-предшественники. В некоторых вариантах осуществления полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы.

[00060] **Немодифицированная клетка.** Используемый в данном документе термин "немодифицированная клетка" относится к клетке, которую не подвергали генетической модификации с вовлечением полинуклеотида или гена, который кодирует МНС-I, МНС-II, регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II, фактор выживания и/или толерогенный фактор. В некоторых вариантах осуществления немодифицированная клетка может быть стволовой клеткой. В некоторых вариантах осуществления немодифицированная клетка может представлять собой эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гематопозитическую стволовую клетку или клетку-предшественника (HSPC). В некоторых вариантах осуществления немодифицированная клетка может быть дифференцированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления

немодифицированная клетка может быть выбрана из соматических клеток (например, клеток иммунной системы, например, Т-клетка, например, CD8+ Т-клетка). Если универсальную донорскую клетку "сравнивают с немодифицированной клеткой", то универсальная донорская клетка и немодифицированная клетка принадлежат к одному и тому же типу клеток или имеют общую родительскую клеточную линию, например, универсальную донорскую iPSC сравнивают с немодифицированной iPSC.

[00061] ***В пределах гена или рядом с ним.*** Используемый в данном документе термин "в пределах гена или рядом с ним" относится к сайту или участку геномной ДНК, которые являются интронным или экстронным компонентом указанного гена или располагаются проксимально по отношению к указанному гену. В некоторых вариантах осуществления сайт геномной ДНК находится внутри гена, если он содержит по меньшей мере часть интрона или экзона указанного гена. В некоторых вариантах осуществления сайт геномной ДНК, расположенный рядом с геном, может находиться на 5'- или 3'-конце указанного гена (например, на 5'- или 3'-конце кодирующего участка указанного гена). В некоторых вариантах осуществления сайт геномной ДНК, расположенный рядом с геном, может быть промоторным участком или репрессорным участком, который модулирует экспрессию указанного гена. В некоторых вариантах осуществления сайт геномной ДНК, расположенный рядом с геном, может находиться на той же хромосоме, что и указанный ген. В некоторых вариантах осуществления сайт или участок геномной ДНК находится рядом с геном, если он находится в пределах 50 т. п., 40 т. п., 30 т. п., 20 т. п., 10 т. п., 5 т. п., 1 т. п. или ближе к 5'- или 3'-концу указанного гена (например, к 5'- или 3'-концу кодирующего участка указанного гена).

II. Способ редактирования генома

[00062] Редактирование генома в целом относится к процессу модификации нуклеотидной последовательности генома, предпочтительно точным или заранее определенным образом. В некоторых вариантах осуществления способы редактирования генома, описываемые в данном документе, например система CRISPR-эндонуклеаза, могут быть использованы для генетической модификации клетки, как описывается в данном документе, например, для создания универсальной донорской клетки. В некоторых вариантах осуществления способы редактирования генома, описываемые в данном документе, например система CRISPR-эндонуклеаза, могут быть использованы для генетической модификации клетки, как описывается в данном документе, например для введения по меньшей мере одной генетической модификации в пределах по меньшей мере одного гена или рядом с ним, которая снижает экспрессию одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и/или МНС-II или других компонентов комплекса МНС-I или МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой; для введения по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает экспрессию по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сравнению с немодифицированной клеткой; и/или для введения по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает или снижает экспрессию по

меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00063] Примеры способов редактирования генома, описанных в данном документе, включают способы применения сайт-направленных нуклеаз для разрезания дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в точных местоположениях-мишенях в геноме, создавая тем самым однонитевой или двухнитевой разрывы ДНК в конкретных местоположениях в геноме. Такие разрывы могут подвергаться репарации и регулярно подвергаются ей за счет естественных эндогенных клеточных процессов, таких как гомологичная репарация (HDR) и негомологичное соединение концов (NHEJ), как описано в Cox et al, "Therapeutic genome editing: prospects and challenges," Nature Medicine, 2015, 21(2), 121-31. Эти два основных процесса репарации ДНК состоят из семейства альтернативных путей. При NHEJ происходит непосредственное соединение концов ДНК, образовавшихся в результате двухнитевого разрыва, иногда с потерей или добавлением нуклеотидной последовательности, которая может нарушать или усиливать экспрессию гена. При HDR гомологичная последовательность или донорская последовательность используется в качестве матрицы для вставки определенной последовательности ДНК в точке разрыва. Гомологичная последовательность может быть эндогенной в геноме, например сестринской хроматидой. В качестве альтернативы донорской последовательностью может быть экзогенный полинуклеотид, такой как плазида, однонитевой олигонуклеотид, двухнитевой олигонуклеотид, дуплексный олигонуклеотид или вирус, который содержит участки (например, левое и правое плечи гомологии) высокой степени гомологии с расщепленным нуклеазой локусом, но который также может содержать дополнительную последовательность или изменения последовательности, включая делеции, которые могут быть встроены в расщепленный локус-мишень. Третий механизм репарации может представлять собой микрогомологичное соединение концов (MMEJ), также называемое "альтернативным NHEJ", при котором генетический результат аналогичен NHEJ в том смысле, что в сайте расщепления могут иметь место небольшие делеции и вставки. При MMEJ могут использоваться гомологичные последовательности из нескольких пар оснований, фланкирующих сайт разрыва ДНК, для достижения более благоприятного результата репарации с соединением концов ДНК, и в недавних отчетах дополнительно прояснен молекулярный механизм данного процесса; см., например, Cho and Greenberg, Nature, 2015, 518, 174-76; Kent et al, Nature Structural and Molecular Biology, 2015, 22(3):230-7; Mateos-Gomez et al, Nature, 2015, 518, 254-57; Ceccaldi et al, Nature, 2015, 528, 258-62. В некоторых случаях может быть возможным предсказывать вероятные результаты репарации с учетом анализа потенциальных микрогомологий в сайте разрыва ДНК.

[00064] Каждый из этих механизмов редактирования генома можно применять для создания требуемых генетических модификаций. Одной стадией в процессе редактирования генома может быть создание одного или двух разрывов ДНК, последних в виде двухнитевых разрывов или двух однонитевых разрывов, в локусе-мишени как можно

ближе к сайту предполагаемой мутации. Этого можно достигнуть посредством применения эндонуклеаз, как описано и проиллюстрировано в данном документе.

Система CRISPR-эндонуклеаза

[00065] Система CRISPR-эндонуклеаза представляет собой встречающийся в природе защитный механизм у прокариот, который был переориентирован в РНК-направляемую платформу для нацеливания на ДНК, используемую для редактирования гена. Системы CRISPR включают системы I, II, III, IV, V и VI типов. В некоторых аспектах система CRISPR представляет собой систему CRISPR/Cas9 II типа. В других аспектах система CRISPR представляет собой систему CRISPR/Cpf1 V типа. Системы CRISPR основаны на ДНК-эндонуклеазе, например Cas9, и двух некодирующих РНК - crRNA (crRNA) и транс-активирующей РНК (tracrRNA) - для нацеливания на расщепление ДНК.

[00066] CrRNA управляет распознаванием последовательности и специфичностью комплекса CRISPR-эндонуклеаза посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, как правило, с 20-нуклеотидной (нукл.) последовательностью в ДНК-мишени. Изменение последовательности из 20 нуклеотидов на 5'-конце в crRNA позволяет нацеливать комплекс CRISPR-эндонуклеаза на конкретные локусы. Комплекс CRISPR-эндонуклеаза связывает только последовательности ДНК, которые содержат последовательность, соответствующую первым 20 нуклеотидам одиночной направляющей РНК (sgRNA), если после целевой последовательности следует определенный короткий мотив ДНК (с последовательностью NGG), называемый мотивом, прилегающим к протоспейсеру (PAM).

[00067] TracrRNA гибридизируется с 3'-концом crRNA с образованием структуры РНК-дуплекса, которая связывается эндонуклеазой с образованием каталитически активного комплекса CRISPR-эндонуклеаза, который затем может расщеплять целевую ДНК.

[00068] Как только комплекс CRISPR-эндонуклеаза связывается с ДНК в целевом сайте, каждый из двух независимых нуклеазных доменов в эндонуклеазе расщепляет одну из нитей ДНК на три основания выше сайта PAM, оставляя двухнитевый разрыв (DSB), при этом обе нити ДНК заканчиваются парой оснований (тупым концом).

[00069] В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Cas9 получена из *Streptococcus pyogenes*, хотя могут быть использованы другие гомологи Cas9, например, Cas9 *S. aureus*, Cas9 *N. meningitidis*, CRISPR 1-Cas9 *S. thermophilus*, CRISPR 3-Cas9 *S. thermophilus* или Cas9 *T. denticola*. В других случаях CRISPR-эндонуклеаза представляет собой Cpf1, например, ND2006 Cpf1 *L. bacterium* или BV3L6 Cpf1 *Acidaminococcus* sp. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известную как Csn1 и Csx12) Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, или

Cpf1. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы варианты дикого типа. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы модифицированные варианты (например, ее гомолог, рекомбинантный вариант ее встречающейся в природе молекулы, ее кодон-оптимизированные или модифицированные варианты) указанных выше эндонуклеаз.

[00070] CRISPR-нуклеаза может быть связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации (NLS). По меньшей мере один NLS может располагаться на аминоконце или в пределах 50 аминокислот от аминоконца CRISPR-нуклеазы и/или по меньшей мере один NLS может располагаться на аминоконце или в пределах 50 аминокислот от карбоксиконца CRISPR-нуклеазы.

[00071] Иллюстративные полипептиды CRISPR/Cas включают полипептиды Cas9, описанные у Fonfara et al., "Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems," *Nucleic Acids Research*, 2014, 42: 2577-2590. С тех пор как были открыты гены Cas, система наименования генов CRISPR/Cas претерпела значительные изменения. В публикации Fonfara et al. также представлены последовательности PAM для полипептидов Cas9 от различных видов.

Нуклеазы с "цинковыми пальцами"

[00072] Нуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZFN) представляют собой модульные белки, состоящие из сконструированного ДНК-связывающего домена "цинковый палец", связанного с каталитическим доменом эндонуклеазы FokI типа II. Поскольку FokI функционирует только в форме димера, необходимо сконструировать пару ZFN для связывания с когнатными последовательностями "полусайтов"-мишеней на противоположных нитях ДНК с точным расстоянием между ними для обеспечения образования каталитически активного димера FokI. После димеризации домена FokI, который сам по себе не обладает специфичностью к последовательности, между полусайтами для ZFN образуется двухнитевой разрыв ДНК в качестве стадии инициирования редактирования генома.

[00073] ДНК-связывающий домен каждой ZFN обычно состоит из 3-6 "цинковых пальцев" широко распространенной архитектуры Cys2-His2, причем каждый "палец" в основном распознает триплет нуклеотидов на одной нити последовательности ДНК-мишени, хотя перекрестное взаимодействие с четвертым нуклеотидом на другой нити также может быть важным. Изменение аминокислот "пальца" в положениях, в которых устанавливаются ключевые контакты с ДНК, изменяет специфичность данного "пальца" к последовательности. Таким образом, белок с четырьмя "цинковыми пальцами" будет селективно распознавать последовательность-мишень длиной 12 п. о., где последовательность-мишень представляет собой совокупность предпочитаемых триплетов, представленных для каждого "пальца", хотя на предпочтение триплета могут в различной степени оказывать влияние соседние "пальцы". Важным аспектом ZFN является то, что их можно легко перенацелить практически на любой адресный участок генома, просто модифицируя отдельные "пальцы". В большинстве вариантов применения

ZFN используются белки с 4-6 "пальцами", соответственно распознающие 12-18 п. о. Таким образом, пара ZFN обычно распознает комбинированную последовательность-мишень длиной 24-36 п. о., не включающую типичный спейсер длиной 5-7 п. о. между полусайтами. Сайты связывания могут быть дополнительно разделены более крупными спейсерами, в том числе спейсерами длиной 15-17 п. о. Последовательность-мишень такой длины, вероятно, будет уникальной в геноме человека при предположении, что повторяющиеся последовательности или гомологи генов исключаются в процессе конструирования. Тем не менее, ДНК-белковые взаимодействия ZFN не являются абсолютными по своей специфичности, поэтому события нецелевого связывания и расщепления все же происходят, будь то в случае с гетеродимером двух ZFN или в случае с гомодимером одной или другой ZFN. Последняя возможность была эффективно устранена путем конструирования интерфейса димеризации домена FokI для создания вариантов "плюс" и "минус", также известных как облигатно-гетеродимеризующиеся варианты, которые могут димеризоваться только друг с другом, но не друг с другом. Принудительное образование облигатного гетеродимера предотвращает образование гомодимера. Это значительно повысило специфичность ZFN, а также любых других нуклеаз, которые имеют в своем составе эти варианты FokI.

[00074] В уровне техники было описано множество систем на основе ZFN, об их модификациях регулярно сообщается, и в многочисленных литературных источниках описываются правила и параметры, которые используются для руководства разработкой ZFN; см., например, Segal et al., Proc Natl Acad Sci, 1999 96(6):2758-63; Dreier B et al., J Mol Biol., 2000, 303(4):489-502; Liu Q et al., J Biol Chem., 2002, 277(6):3850-6; Dreier et al., J Biol Chem., 2005, 280(42):35588-97 и Dreier et al., J Biol Chem. 2001, 276(31):29466-78.

Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN)

[00075] TALEN представляют собой другой формат модульных нуклеаз, в которых, как и в случае с ZFN, сконструированный ДНК-связывающий домен связан с доменом нуклеазы FokI, и пара TALEN функционирует совместно для достижения нацеленного расщепления ДНК. Основное отличие от ZFN заключается в природе ДНК-связывающего домена и связанных с ней свойств распознавания последовательности ДНК-мишени. ДНК-связывающий домен TALEN происходит из белков TALE, которые первоначально были описаны у бактериального патогена растений *Xanthomonas sp.* TALE состоят из тандемных массивов из 33-35 аминокислотных повторов, при этом каждый повтор распознает одну пару оснований в последовательности ДНК-мишени, длина которой обычно составляет до 20 п. о., что дает общую длину последовательности-мишени до 40 п. о. Нуклеотидная специфичность каждого повтора определяется парой повторяющихся переменных остатков (RVD), которая включает только две аминокислоты в положениях 12 и 13. Основания гуанин, аденин, цитозин и тимин преимущественно распознаются четырьмя RVD: Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp и Asn-Gly соответственно. Это составляет намного более простой код распознавания, чем в случае "цинковых пальцев", и, таким образом, представляет преимущество перед последними для конструирования нуклеазы.

Тем не менее, как и в случае с ZFN, ДНК-белковые взаимодействия TALEN не являются абсолютными по своей специфичности, и в случае с TALEN также извлекались преимущества из использования облигатно-гетеродимеризующихся вариантов домена FokI для снижения нецелевой активности.

[00076] Были созданы дополнительные варианты домена FokI, у которых инактивирована их каталитическая функция. Если одна половина пары TALEN или ZFN содержит неактивный домен FokI, то в сайте-мишени будет происходить только одностороннее расщепление (никирование) ДНК, а не DSB. Результат сопоставим с применением "никазных" мутантных форм CRISPR/Cas9 или CRISPR/Cpf1, у которых один из расщепляющих доменов Cas9 был инактивирован. Односторонние разрывы ДНК можно использовать для контроля редактирования генома с помощью HDR, но с меньшей эффективностью, чем в случае DSB. Основное преимущество заключается в том, что нецелевые односторонние разрывы быстро и точно репарируются, в отличие от DSB, которые подвержены неправильной репарации, опосредованной NHEJ.

[00077] В уровне техники было описано множество систем на основе TALEN, и об их модификациях регулярно сообщается; см., например, Boch, *Science*, 2009, 326(5959):1509-12; Mak et al, *Science*, 2012, 335(6069):716-9 и Moscou et al, *Science*, 2009, 326(5959):1501. Применение TALEN на основе платформы "Golden Gate" или схемы клонирования было описано многими группами; см., например, Cermak et al., *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(12):e82; Li et al., *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(14):6315-25; Weber et al., *PLoS One.*, 2011, 6(2):e16765; Wang et al., *J Genet Genomics*, 2014, 41(6):339-47 и Cermak T et al., *Methods Mol Biol.*, 2015 1239:133-59.

Хоминг-эндонуклеазы

[00078] Хоминг-эндонуклеазы (HE) представляют собой специфичные в отношении последовательности эндонуклеазы, которые имеют длинные распознающие последовательности (14-44 пары оснований) и расщепляют ДНК с высокой специфичностью - часто в уникальных сайтах в геноме. Существует по меньшей мере шесть известных семейств HE, классифицируемых по их структуре, в том числе GIY-YIG, бокс His-Cis, H-N-H, PD-(D/E)xK и Vsr-подобные, которые происходят из обширного ряда хозяев, включающих эукариоты, простейшие, бактерии, археи, цианобактерии и фаг. Как и в случае с ZFN и TALEN, HE можно применять для создания DSB в локусе-мишени в качестве начальной стадии редактирования генома. Кроме того, некоторые естественные и сконструированные HE разрезают только одну нить ДНК, функционируя таким образом как сайт-специфические никазы. Большой размер последовательности-мишени для HE и специфичность, которой они обладают, сделали их привлекательными кандидатами для создания сайт-специфических DSB.

[00079] В уровне техники было описано множество систем на основе HE, и об их модификациях регулярно сообщается; см., например, обзоры Steentoft et al., *Glycobiology*, 2014, 24(8):663-80; Belfort and Bonocora, *Methods Mol Biol.*, 2014, 1123:1-26 и Hafez and Hausner, *Genome*, 2012, 55(8):553-69.

MegaTAL/Tev-mTALEN/MegaTev

[00080] В платформе MegaTAL и платформе Tev-mTALEN в качестве дополнительных примеров гибридных нуклеаз используют слияние ДНК-связывающих доменов TALE и каталитически активных HE, извлекая преимущества как из настраиваемого связывания ДНК, так и из специфичности TALE, а также специфичности расщепляющей последовательности HE; см., например, Boissel et al., *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42: 2591-2601; Kleinstiver et al., *G3*, 2014, 4:1155-65 и Boissel and Scharenberg, *Methods Mol. Biol.*, 2015, 1239: 171-96.

[00081] В дополнительном варианте архитектура MegaTev представляет собой слияние мегануклеазы (Mega) с нуклеазным доменом, полученным из хоминг-эндонуклеазы GIY-YIG I-TevI (Tev). Два активных сайта располагаются на расстоянии ~30 п. о. на ДНК-субстрате и образуют два DSB с несовместимыми липкими концами; см., например, Wolfs et al., *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42, 8816-29. Предполагается, что будут разрабатываться другие комбинации существующих подходов, основанных на использовании нуклеаз, и они будут полезны для осуществления направленных модификаций генома, описанных в данном документе.

dCas9-FokI или dCpf1-FokI и другие нуклеазы

[00082] Объединение структурных и функциональных свойств нуклеазных платформ, описанных выше, предлагает дополнительный подход к редактированию генома, который потенциально может преодолеть некоторые из присущих им недостатков. Например, в системе редактирования генома CRISPR обычно используется одна эндонуклеаза Cas9 для создания DSB. Специфичность нацеливания определяется нуклеотидной последовательностью в направляющей РНК длиной 20 или 24 нуклеотида, которая подвергается уотсон-криковскому спариванию оснований с ДНК-мишенью (а также 2 дополнительными основаниями в прилегающей последовательности PAM NAG или NGG в случае с Cas9 из *S. pyogenes*). Такая последовательность является достаточно длинной, чтобы быть уникальной в геноме человека, однако специфичность взаимодействия РНК/ДНК не является абсолютной, и иногда допускается значительная разнородность, особенно в 5'-половине последовательности-мишени, что эффективно снижает количество оснований, которые определяют специфичность. Одним из решений этой проблемы была полная инактивация каталитической функции Cas9 или Cpf1 с сохранением только РНК-направляемой функции связывания ДНК и вместе с тем слияние домена FokI с инактивированным Cas9; см., например, Tsai et al, *Nature Biotech*, 2014, 32: 569-76 и Guilinger et al, *Nature Biotech*, 2014, 32: 577-82. Поскольку FokI должен димеризоваться, чтобы стать каталитически активным, необходимы две направляющие РНК, чтобы связать два продукта слияния FokI в непосредственной близости друг к другу для образования димера и расщепления ДНК. Это фактически удваивает количество оснований в комбинированных сайтах-мишенях, тем самым увеличивая строгость нацеливания систем на основе CRISPR.

[00083] В качестве дополнительного примера при слиянии ДНК-связывающего

домена TALE с каталитически активной HE, такой как I-TevI, извлекаются преимущества как из настраиваемого связывания ДНК, так и из специфичности TALE, а также специфичности расщепляющей последовательности I-TevI, при этом ожидается, что нецелое расщепление можно дополнительно снизить.

РНК-направляемые эндонуклеазы

[00084] РНК-направляемые эндонуклеазные системы, используемые в данном документе, могут содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с иллюстративной эндонуклеазой дикого типа, например, Cas9 из *S. pyogenes*, последовательность ID No. 8 согласно US2014/0068797 или Sapranaukas et al., *Nucleic Acids Res*, 39(21): 9275-9282 (2011). Эндонуклеаза может характеризоваться по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот. Эндонуклеаза может характеризоваться не более чем 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот. Эндонуклеаза может характеризоваться по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот в нуклеазном домене HNH эндонуклеазы. Эндонуклеаза может характеризоваться не более чем 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот в нуклеазном домене HNH эндонуклеазы. Эндонуклеаза может характеризоваться по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот в нуклеазном домене RuvC эндонуклеазы. Эндонуклеаза может характеризоваться не более чем 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот в нуклеазном домене RuvC эндонуклеазы.

[00085] Эндонуклеаза может включать в себя модифицированную форму иллюстративной эндонуклеазы дикого типа. Модифицированная форма иллюстративной эндонуклеазы дикого типа может содержать мутацию, которая снижает активность расщепления нуклеиновой кислоты у эндонуклеазы. Модифицированная форма иллюстративной эндонуклеазы дикого типа может характеризоваться менее чем 90%, менее чем 80%, менее чем 70%, менее чем 60%, менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20%, менее чем 10%, менее чем 5% или менее чем 1% активностью расщепления нуклеиновой кислоты, характерной для иллюстративной эндонуклеазы дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше). У модифицированной формы

эндонуклеазы может отсутствовать значительная активностью расщепления нуклеиновой кислоты. Если эндонуклеаза представляет собой модифицированную форму, у которой отсутствует значительная активностью расщепления нуклеиновой кислоты, она называется в данном документе "ферментативно неактивной".

[00086] Предполагаемые мутации могут предусматривать замены, добавления и делеции или любую их комбинацию. Мутация превращает мутированную аминокислоту в аланин. Мутация превращает мутированную аминокислоту в другую аминокислоту (например, глицин, серин, треонин, цистеин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин, фенилаланин, тирозин, триптофан, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аспарагин, глутамин, гистидин, лизин или аргинин). Мутация превращает мутированную аминокислоту в неприродную аминокислоту (например, селенометионин). Мутация превращает мутированную аминокислоту в миметики аминокислот (например, фосфомиметики). Мутация может быть консервативной мутацией. Например, мутация превращает мутированную аминокислоту в аминокислоты, которые напоминают мутированные аминокислоты по размеру, форме, заряду, полярности, конформации и/или ротамерам (например, мутация цистеин/серин, мутация лизин/аспарагин, мутация гистидин/фенилаланин). Мутация может вызывать сдвиг рамки считывания и/или образование преждевременного стоп-кодона. Мутация может вызывать изменения в регуляторных участках генов или локусов, которые влияют на экспрессию одного или нескольких генов.

Направляющие РНК

[00087] В настоящем изобретении представлены направляющие РНК (gRNA), которые могут направлять активности ассоциированной эндонуклеазы на специфический целевой сайт в полинуклеотиде. Направляющая РНК может содержать по меньшей мере спейсерную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, и последовательность повтора CRISPR. В системах CRISPR типа II gRNA также содержит вторую РНК, называемую последовательностью tracrRNA. В направляющей РНК (gRNA) CRISPR типа II последовательность повтора CRISPR и последовательность tracrRNA гибридизируются друг с другом с образованием дуплекса. В системах CRISPR типа V gRNA содержит crRNA, которая образует дуплекс. В некоторых вариантах осуществления gRNA может связывать эндонуклеазу, вследствие чего gRNA и эндонуклеаза образуют комплекс. GRNA может обеспечивать целевую специфичность по отношению к комплексу благодаря его ассоциации с эндонуклеазой. Таким образом, нуклеиновая кислота, нацеливающая на геном, может направлять активность эндонуклеазы.

[00088] Иллюстративные направляющие РНК включают спейсерные последовательности, которые включают 15-200 нуклеотидов, при этом gRNA нацеливает на местоположение генома на основе сборки генома человека GRCh38. Специалисту в данной области техники понятно, что каждая gRNA может быть сконструирована таким образом, чтобы она содержала спейсерную последовательность, которая комплементарна

ее геномным сайту-мишени или участку-мишени. См. Jinek et al, Science, 2012, 337, 816-821 и Deltcheva et al, Nature, 2011, 471, 602-607.

[00089] gRNA может быть двухмолекулярной направляющей РНК. gRNA может быть одномолекулярной направляющей РНК.

[00090] Двухмолекулярная направляющая РНК может содержать две нити РНК. Первая нить содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность и минимальную последовательность повтора CRISPR. Вторая нить может содержать минимальную последовательность tracrRNA (комплементарную минимальной последовательности повтора CRISPR), 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA.

[00091] Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (sgRNA), может содержать в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность, минимальную последовательность повтора CRISPR, линкерную последовательность направляющей нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, минимальную последовательность tracrRNA, 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, может содержать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительные функциональные свойства (например, стабильность). Линкерная последовательность направляющей нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, может связывать минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность tracrRNA с образованием шпилечной структуры. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, может содержать одну или несколько шпилек.

[00092] В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность из 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность из менее чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность из более чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность варьирующей длины с 17-30 нуклеотидами на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную удлиняющую последовательность длиной, составляющей более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, или 200 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную удлиняющую последовательность длиной, составляющей менее 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, или 100 нуклеотидов.

[00093] В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную удлиняющую последовательность, которая содержит другой фрагмент (например, последовательность, контролирующую стабильность, последовательность, связывающую

эндорибонуклеазу, рибозим). Фрагмент может уменьшать или увеличивать стабильность нуклеиновой кислоты, нацеливающейся на нуклеиновую кислоту. Фрагмент может представлять собой сегмент терминатора транскрипции (т. е. последовательность терминации транскрипции). Фрагмент может функционировать в эукариотической клетке. Фрагмент может функционировать в прокариотической клетке. Фрагмент функционирует как в эукариотических, так и в прокариотических клетках. Неограничивающие примеры подходящих фрагментов включают: 5'-кэп (например, 7-метилгуанилатный кэп (m7G)), последовательность рибопереключател (например, для обеспечения регуляции стабильности и/или регуляции доступности для белков и белковых комплексов), последовательность, которая образует dsRNA-дуплекс (т. е. шпильку), последовательность, которая нацеливает РНК в место субклеточной локализации (например, ядро, митохондрии, хлоропласты и т. п.), модификацию или последовательность, которая обеспечивает отслеживание (например, прямое конъюгирование с флуоресцентной молекулой, конъюгирование с фрагментом, который облегчает флуоресцентную детекцию, последовательность, которая обеспечивает флуоресцентную детекцию и т. д.), и/или модификацию или последовательность, которая предоставляет сайт связывания для белков (например, белков, которые воздействуют на ДНК, в том числе активаторов транскрипции, репрессоров транскрипции, ДНК-метилтрансфераз, ДНК-деметилаз, гистонацетилтрансфераз, гистондеацетилаз и т. п.).

[00094] В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью в целевом полинуклеотиде. Спейсер gRNA может взаимодействовать с целевым полинуклеотидом, специфичным в отношении последовательности образом посредством гибридизации (т. е. спаривания оснований). Нуклеотидная последовательность спейсера может варьироваться в зависимости от последовательности целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес.

[00095] В системе CRISPR-эндонуклеаза спейсерная последовательность может быть предназначена для гибридизации с целевым полинуклеотидом, который расположен в 5'-направлении от PAM эндонуклеазы, используемой в системе. Спейсер может полностью соответствовать целевой последовательности или может иметь несоответствия. Для каждой эндонуклеазы, например нуклеазы Cas9, имеется конкретная последовательность PAM, которую она распознает в целевой ДНК. Например, Cas9 из *S. pyogenes* распознает в целевой нуклеиновой кислоте PAM, который содержит последовательность 5'-NRG-3', где R представляет собой A либо G, где N представляет собой любой нуклеотид, и при этом N находится непосредственно рядом с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени, на которую нацеливается спейсерная последовательность, в 3'-направлении от нее.

[00096] Целевая полинуклеотидная последовательность может содержать 20 нуклеотидов. Целевой полинуклеотид может содержать менее 20 нуклеотидов. Целевой полинуклеотид может содержать более 20 нуклеотидов. Целевой полинуклеотид может

содержать по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше нуклеотидов. Целевой полинуклеотид может содержать не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше нуклеотидов. Целевая полинуклеотидная последовательность может содержать 20 оснований непосредственно рядом с первым нуклеотидом РАМ в 5'-направлении.

[00097] Спейсерная последовательность, которая гибридизируется с целевым полинуклеотидом, может иметь длину, составляющую по меньшей мере приблизительно 6 нуклеотидов (нт). Спейсерная последовательность может содержать по меньшей мере приблизительно 6 нт, по меньшей мере приблизительно 10 нт, по меньшей мере приблизительно 15 нт, по меньшей мере приблизительно 18 нт, по меньшей мере приблизительно 19 нт, по меньшей мере приблизительно 20 нт, по меньшей мере приблизительно 25 нт, по меньшей мере приблизительно 30 нт, по меньшей мере приблизительно 35 нт или по меньшей мере приблизительно 40 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 45 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 19 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 45 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 19 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 45 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 60 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 45 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 50 нт или от приблизительно 20 нт до приблизительно 60 нт. В некоторых примерах спейсерная последовательность может содержать 20 нуклеотидов. В некоторых примерах спейсер может содержать 19 нуклеотидов. В некоторых примерах спейсер может содержать 18 нуклеотидов. В некоторых примерах спейсер может содержать 22 нуклеотида.

[00098] В некоторых примерах процент комплементарности между спейсерной последовательностью и нуклеиновой кислотой-мишенью составляет по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере

приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100%. В некоторых примерах процент комплементарности между спейсерной последовательностью и нуклеиновой кислотой-мишенью составляет не более приблизительно 30%, не более приблизительно 40%, не более приблизительно 50%, не более приблизительно 60%, не более приблизительно 65%, не более приблизительно 70%, не более приблизительно 75%, не более приблизительно 80%, не более приблизительно 85%, не более приблизительно 90%, не более приблизительно 95%, не более приблизительно 97%, не более приблизительно 98%, не более приблизительно 99% или 100%. В некоторых примерах процент комплементарности между спейсерной последовательностью и нуклеиновой кислотой-мишенью составляет 100% на протяжении шести смежных нуклеотидов, наиболее близких к 5'-концу последовательности-мишени комплементарной нити нуклеиновой кислоты-мишени. Процент комплементарности между спейсерной последовательностью и нуклеиновой кислотой-мишенью может составлять по меньшей мере 60% на протяжении приблизительно 20 смежных нуклеотидов. Длина спейсерной последовательности и нуклеиновой кислоты-мишени может отличаться на 1-6 нуклеотидов, которые можно рассматривать как выпетливание или выпетливания.

[00099] Последовательность *tracrRNA* может содержать нуклеотиды, которые гибридизируются с минимальной последовательностью повтора CRISPR в клетке. Минимальная последовательность *tracrRNA* и минимальная последовательность повтора CRISPR могут образовывать дуплекс, т. е. двухнитевую структуру со спаренными основаниями. Минимальная последовательность *tracrRNA* и минимальный повтор CRISPR совместно связываются с РНК-направляемой эндонуклеазой. По меньшей мере часть минимальной последовательности *tracrRNA* может гибридизоваться с минимальной последовательностью повтора CRISPR. Минимальная последовательность *tracrRNA* может быть на по меньшей мере приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или 100% комплементарной минимальной последовательности повтора CRISPR.

[000100] Минимальная последовательность *tracrRNA* может иметь длину от приблизительно 7 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов. Например, длина минимальной последовательности *tracrRNA* может составлять от приблизительно 7 нуклеотидов (нт) до приблизительно 50 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 15 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно

40 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно 15 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 100 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 30 нт или от приблизительно 15 нт до приблизительно 25 нт. Минимальная последовательность *tracrRNA* может иметь длину примерно 9 нуклеотидов. Минимальная последовательность *tracrRNA* может иметь длину примерно 12 нуклеотидов. Минимальная *tracrRNA* может состоять из нуклеотидов 23-48 *tracrRNA*, как описано у Jinek et al выше.

[000101] Минимальная последовательность *tracrRNA* может быть на по меньшей мере приблизительно 60% идентична референтной минимальной последовательности *tracrRNA* (например, дикого типа, *tracrRNA* из *S. pyogenes*) на протяжении отрезка из по меньшей мере 6, 7 или 8 смежных нуклеотидов. Например, минимальная последовательность *tracrRNA* может быть на по меньшей мере приблизительно 65% идентична, приблизительно 70% идентична, приблизительно 75% идентична, приблизительно 80% идентична, приблизительно 85% идентична, приблизительно 90% идентична, приблизительно 95% идентична, приблизительно 98% идентична, приблизительно 99% идентична или 100% идентична референтной минимальной последовательности *tracrRNA* на протяжении отрезка из по меньшей мере 6, 7 или 8 смежных нуклеотидов.

[000102] Дуплекс между минимальной ПНК CRISPR и минимальной *tracrRNA* может содержать двойную спираль. Дуплекс между минимальной ПНК CRISPR и минимальной *tracrRNA* может содержать по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или больше нуклеотидов. Дуплекс между минимальной ПНК CRISPR и минимальной *tracrRNA* может содержать не более приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или больше нуклеотидов.

[000103] Дуплекс может содержать ошибочное спаривание (т. е. две нити дуплекса не являются комплементарными на 100%). Дуплекс может содержать по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 ошибочных спариваний. Дуплекс может содержать не более приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 ошибочных спариваний. Дуплекс может содержать не более 2 ошибочных спаривания.

[000104] В некоторых вариантах осуществления *tracrRNA* может представлять собой 3'-*tracrRNA*. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность *tracrRNA* может содержать последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или 100% идентичностью последовательности с референтной последовательностью *tracrRNA* (например, *tracrRNA* из *S. pyogenes*).

[000105] В некоторых вариантах осуществления gRNA может содержать последовательность удлинения tracrRNA. Последовательность удлинения tracrRNA может иметь длину от приблизительно 1 нуклеотида до приблизительно 400 нуклеотидов. Последовательность удлинения tracrRNA может иметь длину, составляющую более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, или 200 нуклеотидов. Последовательность удлинения tracrRNA может иметь длину от приблизительно 20 до приблизительно 5000 или больше нуклеотидов. Последовательность удлинения tracrRNA может иметь длину, составляющую менее 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, или 100 нуклеотидов. Последовательность удлинения tracrRNA может содержать менее 10 нуклеотидов в длину. Последовательность удлинения tracrRNA может иметь длину 10-30 нуклеотидов. Последовательность удлинения tracrRNA может иметь длину 30-70 нуклеотидов.

[000106] Последовательность удлинения tracrRNA может содержать функциональный фрагмент (например, последовательность, контролирующую стабильность, рибозим, последовательность, связывающую эндорибонуклеазу). Функциональный фрагмент может содержать сегмент терминатора транскрипции (т. е. последовательность терминации транскрипции). Функциональный фрагмент может иметь общую длину, составляющую от приблизительно 10 нуклеотидов (нт) до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 10 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 30 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 40 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 50 нт до приблизительно 60 нт, от приблизительно 60 нт до приблизительно 70 нт, от приблизительно 70 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 80 нт до приблизительно 90 нт или от приблизительно 90 нт до приблизительно 100 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 30 нт или от приблизительно 15 нт до приблизительно 25 нт.

[000107] В некоторых вариантах осуществления sgRNA может содержать линкерную последовательность длиной от приблизительно 3 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов. У Jinek et al. выше, например, использовали простую 4-нуклеотидную "тетрапетлю" (-GAAA-) (Jinek et al, Science, 2012, 337(6096):816-821). Иллюстративный линкер имеет длину, составляющую от приблизительно 3 нуклеотидов (нт) до приблизительно 90 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 70 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 60 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 10 нт. Например, линкер может иметь длину, составляющую от приблизительно 3 нт до приблизительно 5 нт, от приблизительно 5 нт до приблизительно 10 нт, от приблизительно

10 нт до приблизительно 15 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 25 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 30 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 35 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 40 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 50 нт до приблизительно 60 нт, от приблизительно 60 нт до приблизительно 70 нт, от приблизительно 70 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 80 нт до приблизительно 90 нт или от приблизительно 90 нт до приблизительно 100 нт. Линкер направляющей нуклеиновой кислоты, состоящей из одной нуклеиновой кислоты, может содержать от 4 до 40 нуклеотидов. Линкер может содержать по меньшей мере приблизительно 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, или 7000 или больше нуклеотидов. Линкер может содержать не более приблизительно 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, или 7000 или больше нуклеотидов.

[000108] Линкеры могут содержать любую из совокупности последовательностей, хотя в некоторых примерах линкер не будет содержать последовательностей, которые имеют обширные участки гомологии с другими частями направляющей РНК, что может вызывать внутримолекулярное связывание, которое может создавать помехи для других функциональных участков направляющей нуклеиновой кислоты. У Jinek et al. выше использовали простую 4-нуклеотидную последовательность -GAAA- (Jinek et al, Science, 2012, 337(6096):816-821), но также можно использовать множество других последовательностей, в том числе более длинные последовательности.

[000109] Линкерная последовательность может содержать функциональный фрагмент. Например, линкерная последовательность может содержать один или несколько характерных элементов, в том числе аптамер, рибозим, шпильку, взаимодействующую с белком, сайт связывания белка, массив CRISPR, интрон или экзон. Линкерная последовательность может содержать по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 или больше функциональных фрагментов. В некоторых примерах линкерная последовательность может содержать не более приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 или больше функциональных фрагментов.

[000110] В некоторых вариантах осуществления sgRNA не содержит урацил, например на 3'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит один или несколько остатков урацила, например на 3'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков урацила (U) на 3'-конце последовательности sgRNA.

[000111] SgRNA может быть химически модифицированной. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA представляет собой gRNA, которая содержит по меньшей мере один нуклеотид с химической модификацией, например 2'-О-метил-модификацией сахара. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA содержит модифицированный каркас нуклеиновой

кислоты. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA содержит 2'-О-метил-фосфоротиоатный остаток. В некоторых вариантах осуществления химические модификации усиливают стабильность, снижают вероятность или степень врожденного иммунного ответа и/или усиливают другие признаки, что описано в уровне техники.

[000112] В некоторых вариантах осуществления модифицированная gRNA может содержать модифицированные каркасы, например, фосфоротиоатные, фосфотриэфирные, морфолиновые, метилфосфонатные связи, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные связи между сахарными фрагментами или короткоцепочечные гетероатомные или гетероциклические связи между сахарными фрагментами.

[000113] Морфолиновые соединения описаны в Braasch and David Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14): 4503-4510; Genesis, 2001, Volume 30, Issue 3; Heasman, *Dev. Biol.*, 2002, 243: 209-214; Nasevicius et al., *Nat. Genet.*, 2000, 26:216-220; Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97: 9591-9596 и патенте США № 5034506, выданном 23 июля 1991 г.

[000114] Миметики олигонуклеотидов, представляющие собой циклогексенильные нуклеиновые кислоты, описаны в Wang et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 8595-8602.

[000115] В некоторых вариантах осуществления модифицированная gRNA может содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов, например, один из следующих в 2'-положении: OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nNH₂ или O(CH₂)_nCH₃, где n равняется от 1 до приблизительно 10; низшего C1-C10алкила, алкоксиалкокси, замещенного низшего алкила, алкарила или аралкила; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S- или N-алкила; O-, S- или N-алкенила; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; гетероциклоалкила; гетероциклоалкарила; аминокламино; полиалкиламино; замещенного силила; группы, расщепляющей РНК; репортерной группы; интеркалятора; 2'-О-(2-метоксиэтила); 2'-метокси (2'-О-СН₃); 2'-пропокси (2'-ОСН₂ СН₂СН₃) и 2'-фтор (2'-F). Аналогичные модификации можно также производить в других положениях gRNA, в частности в 3'-положении сахарного фрагмента в 3'-концевом нуклеотиде и в 5'-положении в 5'-концевом нуклеотиде. В некоторых примерах как сахарный фрагмент, так и межнуклеозидная связь, т. е. каркас, в нуклеотидных звеньях могут быть заменены новыми группами.

[000116] Направляющие РНК могут также содержать, дополнительно или альтернативно, модификации или замещения нуклеиновых оснований (часто называемых в данной области техники просто "основаниями"). Используемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают аденин (A), гуанин (G), тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают нуклеиновые основания, которые в природных нуклеиновых кислотах встречаются не часто или лишь временно, например, гипоксантин, 6-метиладенин, 5-Ме-пиримидины, в частности, 5-метилцитозин (также называемый 5-метил-2'-дезоксцитозин и часто называемый в данной области техники 5-Ме-С), 5-гидроксиметилцитозин (НМС), гликозил-НМС и гентобиозил-НМС, а также

синтетические нуклеиновые основания, например, 2-аминоаденин, 2-(метиламино)аденин, 2-(имидазолилалкил)аденин, 2-(аминоалкиламино)аденин или другие гетерозамещенные алкиладенины, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 5-бромурацил, 5-гидроксиметилурацил, 8-азагуанин, 7-дезагуанин, N⁶-(6-аминогексил)аденин и 2,6-диаминопурин. Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp75-77, 1980; Gebeyehu et al., Nucl. Acids Res. 1997, 15:4513. Также может быть включено "универсальное" основание, известное из уровня техники, например инозин. Было показано, что замещения на 5-Me-C увеличивают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., в Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и представляют собой аспекты замещений оснований.

[000117] Модифицированные нуклеиновые основания могут включать другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метильные и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропильные и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезагуанин и 7-дезааденин, а также 3-дезагуанин и 3-дезааденин.

Комплексы нуклеиновой кислоты, нацеливающейся на геном, и эндонуклеазы

[000118] GRNA взаимодействует с эндонуклеазой (например, РНК-направляемой нуклеазой, такой как Cas9) с образованием таким образом комплекса. GRNA направляет эндонуклеазу на целевой полинуклеотид.

[000119] Каждую из эндонуклеазы и gRNA можно вводить по отдельности в клетку или субъекту. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза может быть предварительно составлена в комплексе с одной или несколькими направляющими РНК или с одной или несколькими crRNA вместе с tracrRNA. Такой материал в виде предварительно образованного комплекса затем можно вводить в клетку или субъекту. Такой материал в виде предварительно образованного комплекса известен как рибонуклеопротеиновая частица (RNP). Эндонуклеаза в RNP может представлять собой, например, эндонуклеазу Cas9 или эндонуклеазу Cpf1. Эндонуклеаза может быть фланкирована на N-конце, C-конце или и на N-конце, и на C-конце одним или несколькими сигналами ядерной локализации (NLS). Например, эндонуклеаза Cas9 может быть фланкирована двумя NLS, одним NLS, расположенным на N-конце, и вторым NLS, расположенным на C-конце. NLS может быть любым NLS, известным из уровня техники, таким как NLS SV40. Соотношение по весу нацеливающейся на геном нуклеиновой кислоты к эндонуклеазе в RNP может составлять 1:1. Например, соотношение по весу sgRNA и эндонуклеазе Cas9 в RNP может составлять 1:1.

Компоненты системы, кодирующей нуклеиновые кислоты

[000120] В настоящем изобретении представлена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеиновую кислоту, нацеливающуюся на геном, по настоящему изобретению, эндонуклеазу по настоящему изобретению и/или любую нуклеиновую кислоту или белковую молекулу, необходимую для реализации аспектов способов по настоящему изобретению. Кодирующие нуклеиновые кислоты могут представлять собой РНК, ДНК или их комбинацию.

[000121] Нуклеиновая кислота, кодирующая нуклеиновую кислоту, нацеливающуюся на геном, по настоящему изобретению, эндонуклеазу по настоящему изобретению и/или любую нуклеиновую кислоту или белковую молекулу, необходимую для реализации аспектов способов по настоящему изобретению, может предусматривать вектор (например, рекомбинантный вектор экспрессии).

[000122] Термин "вектор" означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один из типов векторов представляет собой "плазмиду", которая означает кольцевую двухнитевую петлю ДНК, с которой можно лигировать дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты. Другим типом вектора является вирусный вектор, при этом дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты можно лигировать с вирусным геномом. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы для экспрессии у млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы для экспрессии у млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом клетки-хозяина.

[000123] В некоторых примерах векторы могут быть способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются в данном документе как "рекомбинантные векторы экспрессии" или, проще говоря, "векторы экспрессии", которые выполняют эквивалентные функции.

[000124] Термин "функционально связанный" означает, что нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, связана с регуляторной(-ыми) последовательностью(-ями) таким образом, при котором обеспечивается экспрессия нуклеотидной последовательности. Термин "регуляторная последовательность" предполагается как включающий, например, промоторы, энхансеры и другие элементы, контролирующие экспрессию (например, сигналы полиаденилирования). Такие регуляторные последовательности хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 1990, 185, Academic Press, San Diego, CA. Регуляторные последовательности включают последовательности, которые управляют конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и последовательности, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности только в определенных

клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Специалистам в данной области техники будет понятно, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-мишени, требуемый уровень экспрессии и т. п.

[000125] Рассматриваемые векторы экспрессии включают без ограничения вирусные векторы на основе вируса осповакцины, вируса полиомиелита, аденовируса, аденоассоциированного вируса, SV40, вируса простого герпеса, вируса иммунодефицита человека, ретровируса (например, векторы на основе вируса лейкоза мышей, вируса некроза селезенки и векторы, полученные из ретровирусов, таких как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус лейкоза птиц, лентивирус, вирус иммунодефицита человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус рака молочной железы), а также другие рекомбинантные векторы. Другие векторы, рассматриваемые для эукариотических клеток-мишеней, включают без ограничения векторы pXT1, pSG5, pSVK3, pBPV, pMSG и pSVLSV40 (Pharmacia). Другие векторы можно применять при условии совместимости с клеткой-хозяином.

[000126] В некоторых примерах вектор может содержать один или несколько элементов, контролирующих транскрипцию и/или трансляцию. В зависимости от используемой системы хозяин/вектор любой из ряда подходящих элементов, контролирующих транскрипцию и трансляцию, в том числе конститутивные и индуцируемые промоторы, энхансерные элементы транскрипции, терминаторы транскрипции и т. д., можно использовать в векторе экспрессии. Вектор может представлять собой самоинактивирующийся вектор, который инактивирует вирусные последовательности или компоненты аппарата CRISPR либо другие элементы.

[000127] Неограничивающие примеры подходящих эукариотических промоторов (т. е. промоторов, функционирующих в эукариотической клетке) включают промоторы немедленно-ранних генов цитомегаловируса (CMV), гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV), ранних и поздних генов SV40, длинных концевых повторов (LTR) ретровируса, промотор гена человеческого фактора элонгации-1 (EF1), промотор куриного бета-актина (CBA), промотор убиквитина С (UBC), гибридную конструкцию, содержащую энхансер цитомегаловируса, слитый с промотором гена куриного бета-актина (CAG), гибридную конструкцию, содержащую энхансер цитомегаловируса, слитый с промотором, первым экзоном и первым интроном гена куриного бета-актина (CAG или CAGGS), промотор вируса стволовых клеток мыши (MSCV), промотор локуса гена фосфоглицераткиназы-1 (PGK) и промотор мышинового металлотионеина-I.

[000128] Промотор может представлять собой индуцируемый промотор (например, промотор генов, кодирующих белки теплового шока, промотор, регулируемый тетрациклином, промотор, регулируемый стероидами, промотор, регулируемый ионами металлов, промотор, регулируемый рецептором эстрогенов, и т. д.). Промотор может быть конститутивным промотором (например, промотором CMV, промотором UBC, промотором CAG). В некоторых случаях промотор может представлять собой промотор,

функция которого ограничена в пространстве и/или ограничена во времени (например, тканеспецифический промотор, промотор, клеточноспецифический промотор и т. д.).

[000129] Введение комплексов, полипептидов и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению в клетки может происходить посредством инфицирования вирусами или бактериофагами, трансфекции, конъюгации, слияния протопластов, липофекции, электропорации, нуклеофекции, осаждения фосфатом кальция, трансфекции, опосредованной полиэтиленимином (PEI), трансфекции, опосредованной DEAE-декстраном, трансфекции, опосредованной липосомами, технологии биобаллистической пушки, осаждения фосфатом кальция, прямой микроинъекции, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной наночастицами, и т. п.

III. Стратегии ускользания от иммунного ответа и повышенной выживаемости

[000130] В данном документе описаны стратегии, позволяющие генетически модифицированным клеткам, т. е. универсальным донорским клеткам, ускользать от иммунного ответа и/или увеличивать свою выживаемость или жизнеспособность после приживления трансплантата у субъекта. В некоторых вариантах осуществления эти стратегии позволяют универсальным донорским клеткам ускользать от иммунного ответа и/или выживать с более высокими показателями успеха, чем у немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления для генетически модифицированных клеток предусмотрено введение по меньшей мере одной генетической модификации в пределах по меньшей мере одного гена или рядом с ним, которая снижает экспрессию одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой; по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает экспрессию по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сравнению с немодифицированной клеткой; и/или по меньшей мере одной генетической модификации, которая изменяет экспрессию по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления для генетически модифицированных клеток предусмотрено введение по меньшей мере одной генетической модификации в пределах по меньшей мере одного гена или рядом с ним, которая снижает экспрессию одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой; по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает экспрессию по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сравнению с немодифицированной клеткой; и по меньшей мере одной генетической модификации, которая изменяет экспрессию по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой. В других вариантах осуществления для генетически модифицированных клеток предусмотрена по меньшей мере одна делеция или мутация типа "вставка-делеция" в пределах по меньшей мере одного гена, которая изменяет экспрессию одного или нескольких человеческих

лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой, или рядом с ним; и по меньшей мере одна вставка полинуклеотида, который кодирует по меньшей мере один толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции гена, которая изменяет экспрессию одного или нескольких HLA МНС-I и МНС-II. В следующих вариантах осуществления генетически модифицированные клетки содержат по меньшей мере одну генетическую модификацию, которая обеспечивает изменение экспрессии по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000131] Гены, которые кодируют главный комплекс гистосовместимости (МНС), располагаются на человеческой хромосоме бр21. Полученные в результате белки, кодируемые генами МНС, представляют собой группу поверхностных белков, которые необходимы для донорской совместимости при трансплантации клеток. Гены МНС делятся на МНС класса I (МНС-I) и МНС класса II (МНС-II). Гены МНС-I (HLA-A, HLA-B и HLA-C) экспрессируются практически во всех типах клеток тканей, презентующих "не являющиеся своими" антигенпроцессированные пептиды CD8+ Т-клеткам, тем самым способствуя их активации до цитолитической CD8+ Т-клетки. Трансплантированные или привитые клетки, экспрессирующие "не являющиеся своими" молекулы МНС-I, будут вызывать устойчивый клеточный иммунный ответ, направленный на эти клетки и в конечном итоге приводящий к их гибели под действием активированных цитолитических CD8+ Т-клеток. Белки МНС-I тесно связаны с бета-2-микроглобулином (В2М) в эндоплазматическом ретикулуме, что важно для образования функциональных молекул МНС-I на поверхности клетки. Кроме того, существуют три неклассифицированные молекулы МНС-Ib (HLA-E, HLA-F и HLA-G), которые обладают иммунорегуляторными функциями. Биологическая молекула МНС-II включает HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR. Благодаря своей основной функции в иммунном ответе биологические молекулы МНС-I и МНС-II способствуют иммунному отторжению после приживления клеточного трансплантата не принадлежащих реципиенту клеток, например, приживления клеточного трансплантата для целей регенеративной медицины.

[000132] Молекулы МНС-I на клеточной поверхности состоят из кодируемых МНС тяжелых цепей (HLA-A, HLA-B или HLA-C) и инвариантной субъединицы бета-2-микроглобулина (В2М). Таким образом, снижение концентрации В2М в клетке обеспечивает эффективный способ снижения экспрессии молекул МНС-I на клеточной поверхности.

[000133] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геномную модификацию одного или нескольких генов МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геномную модификацию одной или нескольких полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию МНС-I и/или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления генетическую модификацию по настоящему изобретению осуществляют с использованием любого способа генного

редактирования, включающего без ограничения способы, описываемые в данном документе.

[000134] В некоторых вариантах осуществления снижения экспрессии одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой достигают посредством нацеливания, например для генетической делеции и/или вставки по меньшей мере одной пары оснований, непосредственно на ген МНС-I и/или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления снижения экспрессии одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой достигают посредством нацеливания, например для генетической делеции, на ген СИТА. В некоторых вариантах осуществления снижения экспрессии одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой достигают путем нацеливания, например для генетической делеции, по меньшей мере на один регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II представляет собой ген NLRC5 или СИТА. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II представляет собой ген RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C, IRF-1 и/или TAP1.

[000135] В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части гена HLA-A, HLA-B и/или HLA-C. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части промоторного участка гена HLA-A, HLA-B и/или HLA-C. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части гена, кодирующего регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части промоторного участка гена, кодирующего регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II.

[000136] В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован со снижением экспрессии бета-2-микроглобулина (В2М). В2М представляет собой непалиморфный ген, который кодирует общую белковую субъединицу, необходимую для поверхностной экспрессии всех тяжелых цепей полиморфного МНС класса I. Белки МНС-I тесно связаны с В2М в эндоплазматическом ретикулуме, что важно для образования функциональных молекул HLA-I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене В2М, содержащем последовательность 5' GCTACTCTCTCTTTCTGGCC 3' (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене В2М, содержащем последовательность 5' GGCCGAGATGTCTCGCTCCG 3' (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене В2М, включающем в себя последовательность 5' CGCGAGCACAGCTAAGGCCA 3' (SEQ ID NO: 3). В альтернативных вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене В2М, содержащем любую из следующих последовательностей: 5'-

TATAAGTGGAGGCGTCGCGC-3' (SEQ ID NO: 35), 5'-GAGTAGCGCGAGCACAGCTA-3' (SEQ ID NO: 36), 5'-ACTGGACGCGTCGCGCTGGC-3' (SEQ ID NO: 37), 5'-AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG-3' (SEQ ID NO: 38), 5'-GGCCACGGAGCGAGACATCT-3' (SEQ ID NO: 39), 5'-GCCCCGAATGCTGTCAGCTTC-3' (SEQ ID NO: 40), 5'-CTCGCGCTACTCTCTTTTC-3' (SEQ ID NO: 41), 5'-TCCTGAAGCTGACAGCATTC-3' (SEQ ID NO: 42), 5'-TTCCTGAAGCTGACAGCATT-3' (SEQ ID NO: 43), или 5'-ACTCTCTCTTTCTGGCCTGG-3' (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления gRNA содержит полинуклеотидную последовательность любого из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, или SEQ ID NO: 44. Комплекс gRNA/CRISPR-нуклеаза нацеливается на целевой сайт и расщепляет его в локусе B2M. Репарация двухнитевого разрыва посредством NHEJ может приводить к делеции по меньшей мере одного нуклеотида и/или к вставке по меньшей мере одного нуклеотида с нарушением или устранением тем самым экспрессии B2M. В качестве альтернативы на locus B2M могут быть нацелены по меньшей мере две системы CRISPR, каждая из которых содержит разную gRNA, поэтому расщепление по двум сайтам в локусе B2M приводит к делеции последовательности между двумя разрезами, с устранением тем самым экспрессии B2M.

[000137] В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован со снижением экспрессии трансаактиватора класса II (СИТА). СИТА является представителем семейства LR или белков с нуклеотидсвязывающим доменом (NBD) и повтором, богатым лейцином (LRR), и регулирует транскрипцию МНС-II, связываясь с энхансомой МНС. Экспрессия СИТА индуцируется в В-клетках и дендритных клетках в зависимости от стадии развития и индуцируется IFN- γ в большинстве типов клеток.

[000138] В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован со снижением экспрессии семейства NLR, содержащего домен CARD белка 5 (NLRC5). NLRC5 является важным регулятором МНС-I-опосредованных иммунных ответов, и подобно СИТА NLRC5 в высокой степени индуцируется посредством IFN- γ , а также может перемещаться в ядро. NLRC5 активирует промоторы генов МНС-I и индуцирует транскрипцию МНС-I, а также родственных генов, вовлеченных в презентацию антигена МНС-I.

[000139] В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы могут быть вставлены или повторно вставлены в генетически модифицированные клетки для создания иммунологически привилегированных универсальных донорских клеток. В некоторых вариантах осуществления универсальные донорские клетки, раскрываемые в данном документе, были дополнительно модифицированы для экспрессии одного или нескольких толерогенных факторов. Иллюстративные толерогенные факторы включают без ограничения один или несколько из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CD47, СИ-ингибитора и IL-35. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, например, вставка, по меньшей мере одного полинуклеотида, кодирующего

по меньшей мере один толерогенный фактор, позволяет универсальной донорской клетке подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения с показателями, в по меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 раз превышающими такие показатели у немодифицированной клетки после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления вставка полинуклеотида, который кодирует HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 и/или PD-L1, позволяет универсальной донорской клетке, подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения после трансплантации или приживления трансплантата у субъекта-хозяина.

[000140] Полинуклеотид, кодирующий толерогенный фактор, как правило, содержит левое и правое плечи гомологии, которые фланкируют последовательность, кодирующую толерогенный фактор. Плечи гомологии характеризуются значительной степенью гомологии последовательностей с геномной ДНК по целевому сайту вставки или рядом с ним. Например, левое плечо гомологии может быть нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от или выше сайта-мишени или сайта разреза, а правое плечо гомологии может быть нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от или ниже сайта-мишени или сайта разреза. Проксимальный конец каждого плеча гомологии может быть гомологичным последовательности геномной ДНК, прилегающей к сайту разреза. В качестве альтернативы проксимальный конец каждого плеча гомологии может быть гомологичным последовательности геномной ДНК, расположенной на расстоянии до приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60 или 70 нуклеотидных оснований от сайта разреза. Таким образом, полинуклеотид, кодирующий толерогенный фактор, может быть вставлен в локус-мишень гена в пределах приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60 или 70 пар оснований от сайта разреза, а дополнительная геномная ДНК, граничащая с сайтом разреза (и не имеющая гомологии с плечом гомологии), может быть удалена. Длина плечей гомологии может варьироваться от приблизительно 50 нуклеотидов до нескольких тысяч нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина плечей гомологии может варьироваться от приблизительно 500 нуклеотидов до приблизительно 1000 нуклеотидов. Значительная гомология последовательностей между плечами гомологии и геномной ДНК может составлять по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99%.

[000141] В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии используют с направляющими В2М (например, gRNA, содержащими нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1-3 или 35-44). В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии сконструированы для использования с любой направляющей В2М, которая может устранять сайт инициации гена В2М. В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии В2М могут содержать или состоять по сути из

полинуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 13 или 19 или из полинуклеотидной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 13 или 19. В некоторых вариантах осуществления левое плечо гомологии B2M может содержать или состоять по сути из SEQ ID NO: 13 или из полинуклеотидной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления правое плечо гомологии B2M может содержать или состоять по сути из SEQ ID NO: 19 или из полинуклеотидной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 19.

[000142] По меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один толерогенный фактор, может быть функционально связан с экзогенным промотором. Экзогенный промотор может быть конститутивным, индуцируемым, временным, тканеспецифическим или клеточноспецифическим промотором. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1 α , PGK, CAG или UBC.

[000143] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один толерогенный фактор, вставляют в локус типа "safe harbor", например локус AAVS 1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один толерогенный фактор, вставляют по сайту или в участок геномной ДНК, который частично перекрывается, полностью перекрывается или содержится в (т. е. находится в пределах гена или рядом с ним) гене MHC-I, гене MHC-II или регуляторе транскрипции MHC-I или MHC-II.

[000144] В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего PD-L1, осуществляют по сайту в пределах локуса гена B2M или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего PD-L1, осуществляют по сайту в пределах локуса гена B2M или рядом с ним одновременно с делецией всего или части гена или промотора B2M или после нее. Полинуклеотид, кодирующий PD-L1, функционально связан с экзогенным промотором. Экзогенный промотор может быть промотором CMV.

[000145] В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего HLA-E, осуществляют по сайту в пределах локуса гена B2M или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего HLA-E, осуществляют по сайту в пределах локуса гена B2M или рядом с ним одновременно с делецией всего или части гена или промотора B2M или после нее. Полинуклеотид, кодирующий HLA-E, функционально связан с экзогенным промотором. Экзогенный промотор может быть промотором CMV.

[000146] В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида,

кодирующего HLA-G, осуществляют по сайту в пределах локуса гена HLA-A, HLA-B или HLA-C или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего HLA-G, осуществляют по сайту в пределах локуса гена HLA-A, HLA-B или HLA-C или рядом с ним одновременно с делецией гена или промотора HLA-A, HLA-B или HLA-C или после нее.

[000147] В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего CD47, осуществляют по сайту в пределах локуса гена СПТА или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего CD47, осуществляют по сайту в пределах локуса гена СПТА или рядом с ним одновременно с делецией гена или промотора СПТА или после нее.

[000148] В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего HLA-G, осуществляют по сайту в пределах локуса гена HLA-A, HLA-B или HLA-C или рядом с ним одновременно со вставкой полинуклеотида, кодирующего CD47, по сайту в пределах гена локуса СПТА или рядом с ним.

[000149] В некоторых вариантах осуществления клетка характеризуется повышенной или пониженной экспрессией одного или нескольких факторов выживания. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит вставку из одной или нескольких полинуклеотидных последовательностей, которые кодируют фактор выживания. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит делецию одного или нескольких факторов выживания. В некоторых вариантах осуществления генетическую модификацию по настоящему изобретению осуществляют с использованием любого способа генного редактирования, включающего без ограничения способы, описываемые в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка характеризуется повышенной или пониженной экспрессией по меньшей мере одного фактора выживания по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания является представителем или важным путем, вовлеченным в выживаемость клетки, например, гипоксией, активными формами кислорода, депривацией питательных веществ и/или окислительным стрессом. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация по меньшей мере одного фактора выживания обеспечивает выживание универсальной донорской клетки на протяжении более длительного периода времени, например, на протяжении в по меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 раз более длительного периода времени, чем у немодифицированной клетки после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания представляет собой ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK или MANF.

[000150] В некоторых вариантах осуществления вставка в клетку полинуклеотида, который кодирует MANF, позволяет универсальной донорской клетке выживать после трансплантации или приживления трансплантата в субъекте-хозяине при более высоких показателях выживаемости по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых

вариантах осуществления полинуклеотид, который кодирует MANF, вставляют в локус типа "safe harbor". В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, который кодирует MANF, вставляют в ген, относящийся к МНС-I, МНС-II или регулятору транскрипции МНС-I или МНС-II.

[000151] В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 и/или JNK. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части промоторного участка гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 и/или JNK.

[000152] В некоторых вариантах осуществления более одного фактора выживания генетически модифицированы в клетке.

[000153] В определенных вариантах осуществления клетки, характеризующиеся отсутствием экспрессии МНС-II и умеренной экспрессией МНС-I, являются генетически модифицированными с отсутствием поверхностной экспрессии МНС-I или МНС-II. В другом варианте осуществления клетки с отсутствием поверхностной экспрессии МНС-I/II дополнительно редактируют с наличием экспрессии PD-L1, например, вставки полинуклеотида, кодирующего PD-L1. В еще одном варианте осуществления клетки с отсутствием поверхностной экспрессии МНС-I/II дополнительно редактируют с наличием экспрессии PD-L1, например, вставки полинуклеотида, кодирующего PD-L1, а также являются генетически модифицированными с повышением или снижением экспрессии по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000154] В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно характеризуются повышенной или пониженной экспрессией, например за счет генетической модификации, одного или нескольких дополнительных генов, которые не обязательно участвуют либо в ускользании от иммунного надзора, либо в выживании клеток после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно характеризуются повышенной или пониженной экспрессией одного или нескольких белков-переключателей безопасности по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетки характеризуются повышенной экспрессией одного или нескольких дополнительных генов, которые кодируют белок-переключатель безопасности. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности также представляет собой суицидальный ген. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности представляет собой тимидинкиназу вируса простого герпеса-1 (HSV-tk) или индуцируемую каспазу-9. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, который кодирует по меньшей мере один переключатель безопасности, вставляют в геном, например в локус типа "safe harbor". В некоторых других вариантах осуществления один или несколько дополнительных генов, которые генетически модифицированы, кодируют один или несколько белков-переключателей безопасности; нацеливающих средств; рецепторов; сигнальных молекул; факторов транскрипции; фармацевтически активных белков или пептидов; кандидатов-мишеней для

лекарственных средств; и белков, способствующих приживлению трансплантата, направленной миграции, хомингу, жизнеспособности, самообновлению, устойчивости и/или выживанию, интегрированных с конструкцией.

[000155] В одном аспекте настоящего изобретения представлен способ получения универсальных донорских клеток со сконструированным геномом, при этом универсальная донорская клетка содержит по меньшей мере одну целевую геномную модификацию в одном или нескольких выбранных сайтах в геноме, при этом способ предусматривает осуществление генетического конструирования типа клетки, как описано в данном документе, путем введения в указанные клетки одной или нескольких конструкций, обеспечивающих целевую модификацию в выбранном сайте; введение в указанные клетки одного или нескольких двухнитевых разрывов в выбранных сайтах с использованием одной или нескольких эндонуклеаз, способных распознавать выбранный сайт; и культивирование редактируемых клеток для обеспечения эндогенной репарации ДНК с созданием целевых вставок или делеций в выбранных сайтах; с получением тем самым универсальных донорских клеток с модифицированным геномом. Универсальные донорские клетки, полученные посредством данного способа, будут содержать по меньшей мере одну функциональную целевую геномную модификацию, и при этом клетки с модифицированным геномом, если они являются стволовыми клетками, в дальнейшем способны дифференцироваться в клетки-предшественники или полностью дифференцированные клетки.

[000156] В некоторых других вариантах осуществления универсальные донорские клетки со сконструированным геномом характеризуются введенной или повышенной экспрессией по меньшей мере одного из HLA-E, HLA-G, CD47 или D-L1. В некоторых вариантах осуществления универсальные донорские клетки со сконструированным геномом являются дефектными по HLA класса I и/или класса II. В некотором варианте осуществления универсальные донорские клетки со сконструированным геномом содержат нулевой B2M или B2M с низкой активностью. В некоторых вариантах осуществления универсальные донорские клетки со сконструированным геномом содержат интегрированный или неинтегрированный экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или несколько белков HLA-E, HLA-G и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления указанная введенная экспрессия является повышенной экспрессией либо неэкспрессируемых, либо слабо экспрессируемых генов, содержащихся в указанных клетках. В некоторых вариантах осуществления неинтегрированные экзогенные полинуклеотиды вводят с использованием вируса Сендай, AAV, эписомы или плазмиды. В некотором варианте осуществления универсальные донорские клетки являются нулевыми по B2M с введенной экспрессией одного или нескольких из HLA-E, HLA-G, PD-L1 и повышенной или пониженной экспрессией по меньшей мере одного белка-переключателя безопасности. В другом варианте осуществления универсальные донорские клетки являются нулевыми по HLA-A, HLA-B и HLA-C с введенной экспрессией одного или нескольких из HLA-E, HLA-G, PD-L1 и по меньшей мере одного

белка-переключателя безопасности. В некотором варианте осуществления универсальные донорские клетки являются нулевыми по В2М с введенной экспрессией одного или нескольких из HLA-E, HLA-G, PD-L1 и повышенной или пониженной экспрессией по меньшей мере одного фактора выживания, например MANF. Предполагается, что способы получения любых из описываемых в данном документе генетически модифицированных клеток будут выполняться с использованием по меньшей мере любого из описываемых в данном документе способов генного редактирования.

IV. Типы клеток

[000157] Клетки, описываемые в данном документе, например универсальные донорские клетки (и соответствующие немодифицированные клетки), могут принадлежать к любому существующему классу клеточного типа. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть клеткой млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть стволовой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть плюрипотентной стволовой клеткой (PSC). В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может представлять собой эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гематопозитическую стволовую клетку или клетку-предшественника (HSPC). В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть дифференцированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть соматической клеткой, например клеткой иммунной системы или сократительной клеткой, например клеткой скелетных мышц.

[000158] Клетки, например универсальные донорские стволовые клетки, описываемые в данном документе, могут быть дифференцированы в соответствующие клеточные типы для оценки экспрессии HLA, а также для оценки иммуногенности линий универсальных стволовых клеток. В целом дифференцировка включает поддержание клеток, представляющих интерес, на протяжении периода времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки дифференцировались в дифференцированные клетки, представляющие интерес. Например, универсальные стволовые клеток, раскрытые в данном документе, могут быть дифференцированы в мезенхимальные клетки-предшественники (MPC), гипои иммуногенные кардиомиоциты, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки, эндотелиальные клетки (EC), макрофаги, гепатоциты,

бета-клетки (например, бета-клетки поджелудочной железы), энтодермальные предшественники поджелудочной железы, эндокринные предшественники поджелудочной железы или нервные клетки-предшественники (NPC).

[000159] Стволовые клетки способны как пролиферировать, так и давать начало дополнительным клеткам-предшественникам, которые, в свою очередь, обладают способностью создавать большое количество материнских клеток, которые, в свою очередь, могут давать начало дифференцированным или дифференцируемым дочерним клеткам. Дочерние клетки сами по себе можно индуцировать к пролиферации и образованию потомства, которое впоследствии дифференцируется в один или несколько типов зрелых клеток, при этом также сохраняется одна или несколько клеток с родительским потенциалом дифференцировки. В таком случае термин "стволовая клетка" относится к клетке, при определенных обстоятельствах обладающей способностью или потенциалом дифференцироваться в более специализированный или дифференцированный фенотип, и при определенных обстоятельствах также сохраняющую способность к пролиферации без существенной дифференцировки. В одном аспекте термин "клетка-предшественник" или "стволовая клетка" относится к генерализованной материнской клетке, потомки (потомство) которой специализируются, зачастую в разных направлениях, за счет дифференцировки, например, за счет приобретения полностью индивидуальных признаков, как это происходит при прогрессирующей дифференциации эмбриональных клеток и тканей. Клеточная дифференцировка представляет собой сложный процесс, как правило, происходящий на протяжении множества клеточных делений. Дифференцированная клетка может происходить от мультипотентной клетки, которая сама происходит от мультипотентной клетки и т. д. Хотя каждая из этих мультипотентных клеток может считаться стволовой клеткой, диапазон типов клеток, которым может давать начало каждая из них, может значительно отличаться. Некоторые дифференцированные клетки также способны давать начало клеткам с большим потенциалом дифференцировки. Такая способность может быть естественной или может быть индуцирована искусственно путем обработки различными факторами. Во многих биологических ситуациях стволовые клетки также могут быть "мультипотентными", поскольку они могут давать потомство, относящееся более чем к одному отдельному типу клеток, но это не является необходимым условием для определения клетки как "стволовой".

[000160] "Дифференцированная клетка" представляет собой клетку, которая продвинулась дальше по пути дифференцировки, чем клетка, с которой ее сравнивают. Таким образом, стволовые клетки могут дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники (такие как клетка-предшественник миоцитов), которые, в свою очередь, могут дифференцироваться в другие типы клеток-предшественников, находящиеся дальше на пути дифференцировки (такие как предшественник миоцитов), а затем в полностью дифференцированную клетку, такую как миоцит, который выполняет собственную роль в определенном типе ткани и может сохранять или не сохранять

способность к дальнейшей пролиферации.

Эмбриональные стволовые клетки

[000161] Клетки, описываемые в данном документе, могут быть эмбриональными стволовыми клетками (ESC). ESC происходят из бластоцитов эмбрионов млекопитающих, способны дифференцироваться в любой тип клеток и быстро размножаться. Также полагают, что ESC характеризуются нормальным кариотипом, поддерживающим высокую теломеразную активность и демонстрирующим исключительный длительный пролиферативный потенциал, что делает эти клетки отличными кандидатами для применения в качестве универсальных донорских клеток.

Стволовые клетки взрослого организма

[000162] Клетки, описываемые в данном документе, могут быть стволовыми клетками взрослого организма (ASC). ASC являются недифференцированными клетками, которые могут быть найдены у млекопитающих, например людей. ASC определяют по их способности к самообновлению, например, проходить через несколько циклов репликации клеток, сохраняя при этом свое недифференцированное состояние, и по способности дифференцироваться в несколько различных типов клеток, например в глиальные клетки. Взрослые стволовые клетки представляют собой широкий класс стволовых клеток, который может охватывать гематопозитические стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, стволовые клетки кишечника, мезенхимальные стволовые клетки, эндотелиальные стволовые клетки, нервные стволовые клетки, обонятельные стволовые клетки взрослого организма, стволовые клетки нервного гребня и клетки яичек.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки

[000163] Клетки, описываемые в данном документе, могут быть индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPSC). Клетки iPSC могут быть получены непосредственно из взрослой человеческой клетки путем введения генов, которые кодируют критические факторы транскрипции, вовлеченные в плюрипотентность, например, Oct4, Sox2, cMyc и Klf4. Клетки iPSC могут быть получены от того же субъекта, которому следует вводить последующие клетки-предшественники. То есть соматическая клетка может быть получена от субъекта, перепрограммирована в индуцированную плюрипотентную стволовую клетку, а затем повторно дифференцирована в клетку-предшественника для введения субъекту (например, аутологичные клетки). Однако в случае аутологичных клеток сохраняется риск иммунного ответа и плохой жизнеспособности после приживления трансплантата.

Человеческие гематопозитические стволовые клетки и клетки-предшественники

[000164] Клетки, описываемые в данном документе, могут быть человеческими гематопозитическими стволовыми клетками и клетками-предшественниками (hHSPC). Эти стволовые клетки дают начало всем типам клеток крови, включая эритроидные (эритроциты или красные кровяные клетки (RBC)), миелоидные (моноциты и макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, мегакарициты/тромбоциты и дендритные клетки) и лимфоидные (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки). Клетки крови продуцируются путем

пролиферации и дифференцировки очень небольшой популяции плюрипотентных гематопозитических стволовых клеток (HSC), которые также обладают способностью восстанавливать себя путем самообновления. В ходе дифференцировки потомство HSC проходит различные промежуточные стадии созревания с образованием полифункциональных и коммитированных по линиям клеток-предшественников до достижения зрелости. Костный мозг (BM) является основным участком кроветворения у людей, и в нормальных условиях в периферической крови (PB) можно обнаружить лишь небольшое количество гематопозитических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC). Лечение цитокинами, некоторыми миелосупрессивными лекарственными средствами, используемыми в лечении рака, и соединениями, которые нарушают взаимодействие между гематопозитическими и стромальными клетками BM, может быстро мобилизовать большое количество стволовых клеток и предшественников в кровотоки.

Дифференцировка клеток в другие типы клеток

[000165] Другая стадия способов по настоящему изобретению может предусматривать дифференцировку клеток в дифференцированные клетки. Стадия дифференцировки может осуществляться любым способом, известным в данной области техники. Например, дифференцировку человеческих iPSC в дефинитивную энтодерму осуществляют путем использования различных средств обработки, в том числе активина и добавки B27 (Life Technologies). Далее дефинитивную энтодерму дифференцируют в гепатоциты, при этом обработка предусматривает применение FGF4, HGF, BMP2, BMP4, онкостатина M, дексаметазона и т. д. (Duan et al, Stem Cells, 2010;28:674-686; Ma et al, Stem Cells Translational Medicine, 2013;2:409-419). В другом варианте осуществления стадия дифференцировки может быть выполнена согласно Sawitza et al, Sci Rep. 2015; 5: 13320. Дифференцированная клетка может быть любой соматической клеткой млекопитающего, например человека. В некоторых вариантах осуществления соматическая клетка может представлять собой эндокринную секреторную эпителиальную клетку (например, клетки, секретирующие гормон щитовидной железы клетки коры надпочечников), экзокринную секреторную эпителиальную клетку (например, слизистую клетку слюнной железы, клетку предстательной железы), секретирующую гормон клетку (например, клетку передней доли гипофиза, островковую клетку поджелудочной железы), кератинизирующую эпителиальную клетку (например, эпидермальный кератиноцит), клетку влажного стратифицированного барьерного эпителия, передающую сигнал клетку (например, фоторецептор), автономные нейронные клетки, поддерживающую клетку органа чувств и периферического нейрона (например, шванновскую клетку), нейрон центральной нервной системы, глиальную клетку (например, астроцит, олигодендроцит), клетку хрусталика, адипоцит, клетку почки, обеспечивающую барьерную функцию клетку (например, протоковую клетку), клетку внеклеточного матрикса, сократительную клетку (например, клетку скелетной мускулатуры, клетку сердечной мускулатуры, клетку гладкой мускулатуры), клетку крови (например, эритроцит), клетку иммунной системы (например, мегакариоцит,

микроглиальную клетку, нейтрофил, тучную клетку, Т-клетку, В-клетку, натуральную клетку-киллера), герминативную клетку (например, сперматиду), питающую клетку или интерстициальную клетку.

V. Составы и введения

Состав и доставка для генного редактирования

[000166] Направляющие РНК, полинуклеотиды, например, полинуклеотиды, которые кодируют толерогенный фактор, или полинуклеотиды, которые кодируют эндонуклеазу, и эндонуклеазы, описываемые в данном документе, могут быть составлены и доставлены в клетки любым известным в данной области техники способом.

[000167] Направляющие РНК и/или полинуклеотиды могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, такими как носители, растворители, стабилизаторы, адъюванты, разбавители и т. д., в зависимости от конкретного способа введения и лекарственной формы. Композиции на основе направляющих РНК и/или полинуклеотидов могут быть составлены так, чтобы в них достигалось физиологически совместимое значение рН, которое варьируется в диапазоне от рН приблизительно 3 до рН приблизительно 11, от рН приблизительно 3 до рН приблизительно 7, что зависит от состава и пути введения. В некоторых случаях рН можно доводить до диапазона значений от приблизительно рН 5,0 до приблизительно рН 8. В некоторых случаях композиции могут содержать терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного соединения, описанного в данном документе, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Композиции необязательно могут содержать комбинацию соединений, описанных в данном документе, или могут содержать второй активный ингредиент, применимые в лечении или предупреждении роста бактерий (например, без ограничения антибактериальные или антимикробные средства), или могут содержать комбинации реагентов по настоящему изобретению.

[000168] Подходящие вспомогательные вещества включают, например, молекулы-носители, которые включают крупные медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимеры из аминокислот, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы. Другие типичные вспомогательные вещества могут включать антиоксиданты (например, без ограничения аскорбиновую кислоту), хелатообразующие средства (например, без ограничения EDTA), углеводы (например, без ограничения декстрин, гидроксилалкилцеллюлозу и гидроксилалкилметилцеллюлозу), стеариновую кислоту, жидкости (например, без ограничения масла, воду, солевой раствор, глицерин и этанол), смачивающие или эмульгирующие средства, рН-буферные вещества и т. п.

[000169] Полинуклеотиды направляющей РНК (РНК или ДНК) и/или полинуклеотид(полинуклеотиды) последовательности, кодирующей эндонуклеазу (РНК или ДНК), могут быть доставлены с помощью вирусных или невирусных средств для доставки, известных в данной области техники. Альтернативно полипептид(ы),

представляющий(ие) собой эндонуклеазу, может(могут) быть доставлен(ы) с использованием вирусных или невирусных средств для доставки, известных в данной области техники, таких как электропорация или липидные наночастицы. В дополнительных альтернативных аспектах эндонуклеаза ДНК может быть доставлена в виде одного или нескольких полипептидов по отдельности либо в виде предварительно образованного комплекса с одной или несколькими направляющими РНК или одной или несколькими *crRNA* вместе с *tracrRNA*.

[000170] Полинуклеотиды могут быть доставлены с помощью невирусных средств для доставки, в том числе без ограничения наночастиц, липосом, рибонуклеопротеинов, положительно заряженных пептидов, конъюгатов малая молекула-РНК, химерных соединений аптамер-РНК и комплексов РНК-слитый белок. Некоторые типичные невирусные средства для доставки описаны в Peer and Lieberman, *Gene Therapy*, 2011, 18: 1127-1133 (в котором внимание сосредоточено на невирусных средствах для доставки *siRNA*, которые также применимы для доставки других полинуклеотидов).

[000171] Для полинуклеотидов по настоящему изобретению состав может быть выбран из любого из указанных, например, в международной заявке PCT/US2012/069610.

[000172] Полинуклеотиды, такие как направляющая РНК, *sgRNA* и мРНК, кодирующая эндонуклеазу, могут быть доставлены в клетку или субъекту посредством липидных наночастиц (LNP).

[000173] LNP означает любую частицу, имеющую диаметр менее 1000 нм, 500 нм, 250 нм, 200 нм, 150 нм, 100 нм, 75 нм, 50 нм или 25 нм. Альтернативно размер наночастицы может варьироваться в диапазоне 1-1000 нм, 1-500 нм, 1-250 нм, 25-200 нм, 25-100 нм, 35-75 нм или 25-60 нм.

[000174] LNP могут быть получены из катионных, анионных или нейтральных липидов. Нейтральные липиды, такие как фузогенный фосфолипид DOPE или компонент мембран холестерин, могут быть включены в LNP в качестве "липидов-помощников" для повышения трансфекционной активности и стабильности наночастиц. Ограничения катионных липидов включают низкую эффективность по причине недостаточной стабильности и быстрого выведения, а также формирования воспалительных или противовоспалительных ответов.

[000175] LNP также могут состоять из гидрофобных липидов, гидрофильных липидов или как гидрофобных, так и гидрофильных липидов.

[000176] Любой липид или комбинацию липидов, которые известны в данной области техники, можно использовать для получения LNP. Примерами липидов, используемых для получения LNP, являются: DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерин, DOTAP-холестерин, GAP-DMORIE-DPyPE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоль (PEG). Примерами катионных липидов являются: 98N12-5, C12-200, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 и 7C1. Примерами нейтральных липидов являются: DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. Примерами PEG-модифицированных липидов являются: PEG-DMG, PEG-CerC14 и PEG-CerC20.

[000177] Липиды можно объединять в любом количестве молярных соотношений для получения LNP. Кроме того, полинуклеотид(ы) можно объединять с липидом(-ами) в широком диапазоне молярных соотношений для получения LNP.

[000178] Для доставки можно применять рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Методики получения частиц гAAV, в рамках которых клетке предоставляются геном AAV, подлежащий упаковке, содержащий полинуклеотид, подлежащий доставке, гены *gag* и *cap*, а также функциональные элементы вируса-помощника, являются стандартными в данной области техники. Для получения гAAV, как правило, необходимо, чтобы в одной клетке (обозначенной в данном документе как упаковывающая клетка) присутствовали следующие компоненты: геном гAAV, гены *gag* и *cap* AAV отдельно от генома гAAV (т. е. не в его составе) и функциональные элементы вируса-помощника. Гены *gag* и *cap* AAV могут быть получены из любого серотипа AAV, из которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут быть получены из серотипа AAV, отличного от серотипа, из которого получены ITR генома гAAV, в том числе без ограничения серотипов AAV, описываемых в данном документе. Получение псевдотипированного гAAV описано, например, в публикации международной патентной заявки № WO 01/83692.

Составление и введение клеток, например универсальных донорских клеток

[000179] Генетически модифицированные клетки, например универсальные донорские клетки, описываемые в данном документе, могут быть составлены и введены субъекту любым способом, известным в данной области техники.

[000180] Термины "введение", "внедрение", "имплантация", "приживление трансплантата" и "трансплантация" используются взаимозаменяемо применительно к размещению клеток, например, клеток-предшественников в организме субъекта посредством способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в требуемом участке. Клетки, например, клетки-предшественники или их дифференцированное потомство можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в требуемое местоположение в организме субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от такого короткого, как от нескольких часов, например двадцати четырех часов, до нескольких дней, до такого длинного, как несколько лет или даже вся продолжительность жизни субъекта, т. е. при долговременном приживлении трансплантата.

[000181] Генетически модифицированная клетка, например, универсальная донорская клетка, описываемая в данном документе, может быть жизнеспособной после введения субъекту в течение более длительного периода, чем немодифицированная клетка.

[000182] В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая клетки, описанные в данном документе, может быть введена подходящим путем, который может

включать внутривенное введение, например, в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления внутривенное введение может быть выполнено внутримышечным, внутривенным, интрацеребральным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным или интратекальным путями. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть в твердой, водной форме или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления водная или жидкая форма может быть распылена или лиофилизована. В некоторых вариантах осуществления распыленная или лиофилизованная форма может быть восстановлена водным или жидким раствором.

[000183] Клеточная композиция также может быть эмульгирована или представлена в виде липосомной композиции при условии, что процедура эмульгирования не оказывает неблагоприятного влияния на жизнеспособность клеток. Клетки и любой другой активный ингредиент могут быть смешаны со вспомогательными веществами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом, в количествах, подходящих для применения в терапевтических способах, описанных в данном документе.

[000184] Дополнительные средства, включенные в клеточную композицию, могут включать фармацевтически приемлемые соли ее компонентов. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образуемые при участии свободных аминогрупп полипептида), которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или с такими органическими кислотами, как уксусная, винная, миндальная и т. п. Соли, образуемые при участии свободных карбоксильных групп, также можно получать из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т. п.

[000185] Физиологически переносимые носители хорошо известны в данной области техники. Типичными жидкими носителями являются стерильные водные растворы, которые не содержат материалов в дополнение к активным ингредиентам и воде или содержат буфер, такой как фосфат натрия с физиологическим значением pH, физиологический раствор или и то и другое, как, например, фосфатно-буферный солевой раствор. Кроме того, водные носители могут содержать более одной буферной соли, а также соли, такие как хлориды натрия и калия, декстрозу, полиэтиленгликоль и другие растворенные вещества. Жидкие композиции могут также содержать жидкие фазы в дополнение к воде и вместо воды. Типичными такими дополнительными жидкими фазами являются глицерин, растительные масла, такие как хлопковое масло, и эмульсия типа "масло в воде". Количество активного соединения, используемого в клеточных композициях, которое является эффективным в лечении конкретного нарушения или состояния, может зависеть от природы нарушения или состояния и может быть определено с помощью стандартных клинических методик.

[000186] В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая клетки, может быть введена субъекту, например субъекту-человеку, у которого имеется заболевание, с подозрением на его наличие или у которого имеется риск возникновения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть введена субъекту, у которого отсутствует заболевание, отсутствует подозрение на его наличие или у которого отсутствует риск возникновения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления субъектом является здоровый человек. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, например субъекта-человека, имеется, подозревается наличие или имеется риск возникновения генетически наследуемого заболевания. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеются симптомы или имеется риск развития симптомов, свойственных заболеванию.

VI. Конкретные композиции и способы по настоящему изобретению

[000187] Соответственно, настоящее изобретение, в частности, относится к следующим неограничивающим композициям и способам.

[000188] В первой композиции, композиции 1 по настоящему изобретению, представлена композиция, содержащая клетки, которые характеризуются (i) по меньшей мере одной генетической модификацией в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или другие компоненты или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; (ii) по меньшей мере одной генетической модификацией, которая обеспечивает повышение экспрессии по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сравнению с немодифицированной клеткой; и (iii) по меньшей мере одной генетической модификацией, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000189] В другой композиции, композиции 2 по настоящему изобретению, представлена композиция, содержащая клетки, которые характеризуются (i) по меньшей мере одной делецией и/или вставкой по меньшей мере одной пары оснований в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или другие компоненты или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и (ii) по меньшей мере одной вставкой полинуклеотида, который кодирует по меньшей мере один толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом генетической делеции из (i) или содержится в нем.

[000190] В другой композиции, композиции 3 по настоящему изобретению, представлена композиция, содержащая клетки, которые характеризуются по меньшей мере одной генетической модификацией, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000191] В другой композиции, композиции 4 по настоящему изобретению,

представлена композиция в соответствии с композицией 1, где генетическая модификация (i) представляет собой делецию.

[000192] В другой композиции, композиции 5 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 1, где генетическая модификация (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, в локусе типа "safe harbor" или по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте генетической модификации из (i).

[000193] В другой композиции, композиции 6 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 1, где генетическая модификация из (i) представляет собой делецию гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или другие компоненты или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II; и генетическая модификация из (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует по меньшей мере один толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте генетической модификации из (i).

[000194] В другой композиции, композиции 7 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1, 2 или 4-6, где по меньшей мере один ген, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или другие компоненты или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, представляет собой один или несколько из гена МНС-I (например, HLA-A, HLA-B и HLA-C), гена МНС-II (например, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR) или гена, который кодирует регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II или другой компонент комплекса МНС-I (например, B2M, NLRC5 и СРТА).

[000195] В другой композиции, композиции 8 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1, 2 или 4-6, где по меньшей мере один ген, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или другие компоненты или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, представляет собой один или несколько из HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M или СРТА.

[000196] В другой композиции, композиции 9 по настоящему изобретению представлена композиция в соответствии с композицией 1 или 2, где (i) представляет собой делецию в пределах одного или нескольких из HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M или СРТА или рядом с ними.

[000197] В другой композиции, композиции 10 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 9, где (i) представляет собой делецию в пределах или рядом с HLA-A, делецию в пределах или рядом с HLA-B, делецию в пределах или рядом с HLA-C или делецию в пределах или рядом с B2M.

[000198] В другой композиции, композиции 11 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 9, где (i) представляет собой

делецию в пределах или рядом с HLA-A, делецию в пределах или рядом с HLA-B, делецию в пределах или рядом с HLA-C или делецию в пределах или рядом с СИТА.

[000199] В другой композиции, композиции 12 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1, 2 или 4-11, где по меньшей мере один полинуклеотид, который кодирует толерогенный фактор, представляет собой один или несколько полинуклеотидов, которые кодируют один или несколько из HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 или PD-L1.

[000200] В другой композиции, композиции 13 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 12, где (i) представляет собой делецию в пределах или рядом с B2M, и (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, кодирующего PD-L1, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции из (i).

[000201] В другой композиции, композиции 14 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 12, где (i) представляет собой делецию в пределах или рядом с HLA-A, делецию в пределах или рядом с HLA-B или делецию в пределах или рядом с HLA-C, и (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует HLA-G, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции из (i) (например, делеции HLA-A).

[000202] В другой композиции, композиции 15 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 12, где (i) представляет собой делецию в пределах или рядом с HLA-A, делецию в пределах или рядом с HLA-B, делецию в пределах или рядом с HLA-C или делецию в пределах или рядом с СИТА, и (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует HLA-G, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции в пределах или рядом с HLA-A, и вставку полинуклеотида, который кодирует CD47, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции в пределах или рядом с СИТА.

[000203] В другой композиции, композиции 16 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1 или 3-15, где по меньшей мере один ген, который кодирует фактор выживания, представляет собой один или несколько генов, которые кодируют один или несколько из ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK или MANF.

[000204] В другой композиции, композиции 17 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1 или 3-16, где генетическая модификация, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой, представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует MANF, например в локусе типа "safe harbor".

[000205] В другой композиции, композиции 18 по настоящему изобретению,

представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1 или 3-16, где генетическая модификация, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой, представляет собой делецию в пределах гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK или рядом с ним, которая обеспечивает снижение или устранение экспрессии гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000206] В другой композиции, композиции 19 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1-18, где клетки дополнительно содержат экзогенный полинуклеотид, который не интегрирован в геномную ДНК клеток.

[000207] В другой композиции, композиции 20 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 19, где экзогенный полинуклеотид кодирует HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, MANF и/или PD-L1.

[000208] В другой композиции, композиции 21 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1-20, где клетки дополнительно характеризуются повышенной или пониженной экспрессией одного или нескольких переключателей безопасности по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000209] В другой композиции, композиции 22 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 21, где переключатель безопасности представляет собой тимидинкиназу вируса простого герпеса-1 (HSV-tk) или индуцируемую каспазу-9.

[000210] В другой композиции, композиции 23 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 21 или 22, где повышенная экспрессия одного или нескольких переключателей безопасности является результатом генетической вставки полинуклеотида, который кодирует белок-переключатель безопасности, например в локус типа "safe harbor".

[000211] В другой композиции, композиции 24 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 5, 17 или 23, где локус типа "safe harbor" выбран из группы, состоящей из AAVS1 (PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF и TTR.

[000212] В другой композиции, композиции 25 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1-24, где клетки дополнительно содержат дополнительную генетическую модификацию, которая обеспечивает снижение экспрессии любого дополнительного гена.

[000213] В другой композиции, композиции 26 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1-25, где генетическую модификацию, генетическую делецию или генетическую вставку осуществляют путем доставки в клетки эндонуклеазы и направляющей РНК (gRNA).

[000214] В другой композиции, композиции 27 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 26, где эндонуклеаза

представляет собой Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известную как Csn1 и Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, или Cpf1 эндонуклеазу; ее гомолог, рекомбинантный вариант ее встречающейся в природе молекулы, ее кодон-оптимизированные или ее модифицированные варианты и их комбинации.

[000215] В другой композиции, композиции 28 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 27, где эндонуклеаза представляет собой Cas9, необязательно Cas9 из *S. pyogenes*, или ее вариант, содержащий N-концевой NLS SV40 и C-концевой NLS SV40.

[000216] В другой композиции, композиции 29 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 26, где соотношение по весу указанной gRNA и указанной эндонуклеазы составляет 1:1.

[000217] В другой композиции, композиции 30 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 2, 5, 6, 12-15, 17, 19, 20 или 23 где полинуклеотид содержит экзогенный промотор.

[000218] В другой композиции, композиции 31 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 30, где экзогенный промотор представляет собой CMV, EFla, PGK, CAG, UBC или другой конститутивный, индуцируемый, временной, тканеспецифический или клеточноспецифический промотор.

[000219] В другой композиции, композиции 32 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 31, где экзогенный промотор представляет собой промотор CAG.

[000220] В другой композиции, композиции 33 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1-32, где клетки представляют собой стволовые клетки (например человеческие стволовые клетки).

[000221] В другой композиции, композиции 34 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1-33, где клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки (ESC), стволовые клетки взрослого организма (ASC), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) или гематопозитические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPC).

[000222] В другой композиции, композиции 35 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1-32, где клетки представляют собой дифференцированные клетки.

[000223] В другой композиции, композиции 36 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с любой из композиций 1-32 или 35, где клетки представляют собой соматические клетки.

[000224] В первом способе, способе 1 по настоящему изобретению, представлен способ получения модифицированных клеток, при этом способ предусматривает: (i)

введение по меньшей мере одной генетической модификации в пределах по меньшей мере одного гена или рядом с ним, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или другие компоненты или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II; (ii) введение по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает экспрессию по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, в клетках; и (iii) введение по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает или снижает экспрессию по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, в универсальных донорских клетках.

[000225] В первом способе, способе 2 по настоящему изобретению, представлен способ получения универсальных донорских клеток, при этом способ предусматривает: (i) введение по меньшей мере одной делеции по меньшей мере одного участка геномной ДНК в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или другие компоненты или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и (ii) введение по меньшей мере одной вставки по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции из (i).

[000226] В другом способе, способе 3 по настоящему изобретению, представлен способ получения универсальных донорских клеток, при этом способ предусматривает введение по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает или снижает экспрессию по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания.

[000227] В другом способе, способе 4 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 1, где генетическая модификация (i) представляет собой делецию.

[000228] В другом способе, способе 5 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 1, где генетическая модификация (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, в локус типа "safe harbor" или по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте генетической модификации из (i).

[000229] В другом способе, способе 6 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 1, где генетическая модификация из (i) представляет собой делецию гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или другие компоненты или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II; и генетическая модификация из (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует по меньшей мере один толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте генетической модификации из (i).

[000230] В другом способе, способе 7 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1, 2 или 4-6, где по меньшей мере один ген,

который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II, или другие компоненты, или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, представляет собой один или несколько из гена МНС-I (например, HLA-A, HLA-B и HLA-C), гена МНС-II (например, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR) или гена, который кодирует регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II (например, B2M, NLRC5 и СИТА).

[000231] В другом способе, способе 8 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1, 2 или 4-6, где по меньшей мере один ген, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II, или другие компоненты, или регуляторы транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, представляет собой один или несколько из HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M или СИТА.

[000232] В другом способе, способе 9 по настоящему изобретению представлен способ в соответствии со способом 1 или 2, где (i) представляет собой делецию в пределах одного или нескольких из HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M или СИТА или рядом с ними.

[000233] В другом способе, способе 10 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 9, где (i) представляет собой делецию в пределах или рядом с HLA-A, делецию в пределах или рядом с HLA-B, делецию в пределах или рядом с HLA-C или делецию в пределах или рядом с B2M.

[000234] В другом способе, способе 11 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 9, где (i) представляет собой делецию в пределах или рядом с HLA-A, делецию в пределах или рядом с HLA-B, делецию в пределах или рядом с HLA-C и делецию в пределах или рядом с СИТА.

[000235] В другом способе, способе 12 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1, 2 или 4-11, где по меньшей мере один полинуклеотид, который кодирует толерогенный фактор, представляет собой один или несколько полинуклеотидов, которые кодируют один или несколько из HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 или PD-L1.

[000236] В другом способе, способе 13 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 12, где (i) представляет собой делецию в пределах или рядом с B2M, и (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, кодирующего PD-L1, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции из (i).

[000237] В другом способе, способе 14 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 12, где (i) представляет собой делецию в пределах или рядом с HLA-A, делецию в пределах или рядом с HLA-B или делецию в пределах или рядом с HLA-C, и (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует HLA-G, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции из (i) (например, делеции HLA-A).

[000238] В другом способе, способе 15 по настоящему изобретению, представлен

способе в соответствии со способом 12, где (i) представляет собой делецию в пределах или рядом с HLA-A, делецию в пределах или рядом с HLA-B, делецию в пределах или рядом с HLA-C и делецию в пределах или рядом с СИТА, и (ii) представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует HLA-G, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции в пределах или рядом с HLA-A, и вставку полинуклеотида, который кодирует CD47, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции в пределах или рядом с СИТА.

[000239] В другом способе, способе 16 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1 или 3-15, где по меньшей мере один ген, который кодирует фактор выживания, представляет собой один или несколько генов, которые кодируют один или несколько из ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK или MANF.

[000240] В другом способе, способе 17 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1 или 3-16, где генетическая модификация, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии гена, который кодирует фактор выживания, представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует MANF, например в локус типа "safe harbor".

[000241] В другом способе, способе 18 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1 или 3-16, где генетическая модификация, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии гена, который кодирует фактор выживания, представляет собой делецию в пределах гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK или рядом с ним, которая обеспечивает снижение или устранение экспрессии гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000242] В другом способе, способе 19 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1-18, где клетки представляют собой стволовые клетки (например человеческие стволовые клетки).

[000243] В другом способе, способе 20 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1-19, где клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки (ESC), стволовые клетки взрослого организма (ASC), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) или гематопозитические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPC).

[000244] В другом способе, способе 21 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1-18, где клетки представляют собой дифференцированные клетки.

[000245] В другом способе, способе 22 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1-18 или 21, где клетки представляют собой соматические клетки.

[000246] В другом способе, способе 23 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1-22, где способ дополнительно предусматривает введение экзогенного полинуклеотида в клетки, который не

интегрируется в геномную ДНК клеток.

[000247] В другом способе, способе 24 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 23, где экзогенный полинуклеотид кодирует HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, MANF и/или PD-L1.

[000248] В другом способе, способе 25 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1-24, где способ дополнительно предусматривает повышение экспрессии одного или нескольких переключателей безопасности по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000249] В другом способе, способе 26 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 25, где переключатель безопасности представляет собой тимидинкиназу вируса простого герпеса-1 (HSV-tk) или индуцируемую каспазу-9.

[000250] В другом способе, способе 27 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 25 или 26, где повышение экспрессии одного или нескольких переключателей безопасности является результатом генетической вставки полинуклеотида, который кодирует переключатель безопасности, например в локус типа "safe harbor".

[000251] В другом способе, способе 28 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 5, 17 или 27, где локус типа "safe harbor" выбран из группы, состоящей из AAVS1 (PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF и TTR.

[000252] В другом способе, способе 29 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1-28, где способ дополнительно предусматривает введение дополнительной генетической модификации, которая обеспечивает снижение экспрессии любого дополнительного гена.

[000253] В другом способе, способе 30 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 1-29, где генетическую модификацию, делецию или вставку осуществляют путем доставки в клетки эндонуклеазы и по меньшей мере одной направляющей РНК (gRNA).

[000254] В другом способе, способе 31 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 30, где эндонуклеаза представляет собой Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известную как Csn1 и Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, или Cpf1 эндонуклеазу; ее гомолог, рекомбинантный вариант ее встречающейся в природе молекулы, ее кодон-оптимизированные или ее модифицированные варианты и их комбинации.

[000255] В другом способе, способе 32 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 31, где эндонуклеаза представляет собой Cas9, необязательно Cas9 из *S. pyogenes*, или ее вариант, содержащий N-концевой NLS SV40 и C-концевой NLS SV40.

[000256] В другом способе, способе 33 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 30, где соотношение по весу указанной gRNA и указанной эндонуклеазы составляет 1:1.

[000257] В другом способе, способе 34 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 2, 5, 6, 12-15, 17, 23, 25 или 27, где полинуклеотид содержит экзогенный промотор.

[000258] В другом способе, способе 35 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 34, где экзогенный промотор представляет собой CMV, EF1a, PGK, CAG, UBC или другой конститутивный, индуцируемый, временной, тканеспецифический или клеточноспецифический промотор.

[000259] В другом способе, способе 36 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 35, где экзогенный промотор представляет собой промотор CAG.

[000260] В другом способе, способе 37 по настоящему изобретению, представлен способ, предусматривающий введение субъекту композиции клеток в соответствии с любой из композиций 1-36 или композиции, содержащей совокупность клеток, полученных посредством любого из способов 1-36.

[000261] В другом способе, способе 38 по настоящему изобретению, представлен способ, предусматривающий (i) получение композиции клеток в соответствии с любой из композиций 1-34; (ii) осуществление дифференцировки клеток в линиеспецифические клетки или полностью дифференцированные клетки; и (iii) введение линиеспецифических клеток или полностью дифференцированных клеток субъекту, нуждающемуся в этом.

[000262] В другом способе, способе 39 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 37 или 38, где субъект представляет собой человека, у которого имеется заболевание, с подозрением на его наличие или у которого имеется риск возникновения заболевания.

[000263] В другом способе, способе 40 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 39, где заболевание является генетически наследуемым заболеванием.

[000264] В другом способе, способе 41 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 39 или 40, где клетки дополнительно содержат генетическую модификацию, которая обеспечивает снижение экспрессии гена или белка, который ассоциируется с заболеванием.

[000265] В другом способе, способе 42 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 39-41, где генетическая модификация способна обеспечивать лечение заболевания или симптомов заболевания.

[000266] В другом способе, способе 43 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 37-42, где клетки получают из источника, отличного от субъекта.

[000267] В другом способе, способе 44 по настоящему изобретению представлен

способ получения универсальной донорской клетки, при этом способ предусматривает осуществление генетического модифицирования клетки путем (i) введения делеции и/или вставки по меньшей мере одной пары оснований в геном клетки по сайту в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и (ii) введения в геном клетки вставки из по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте из (i), с получением тем самым универсальной донорской клетки.

[000268] В другом способе, способе 45 по настоящему изобретению, представлен способ получения универсальной донорской клетки, при этом способ предусматривает осуществление генетического модифицирования клетки путем (i) введения делеции и/или вставки по меньшей мере одной пары оснований в геном клетки по сайту в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и (ii) введения в геном клетки вставки из по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, в локус типа "safe harbor", с получением тем самым универсальной донорской клетки.

[000269] В другом способе, способе 46 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-45, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенным ускользанием от иммунного надзора и/или повышенной выживаемостью клетки по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000270] В другом способе, способе 47 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-46, где по меньшей мере один ген, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, представляет собой ген МНС-I, выбранный из HLA-A, HLA-B или HLA-C, ген МНС-II, выбранный из HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ или HLA-DR, или ген, выбранный из B2M, NLRC5, СИТА, RFX5, RFXAP или RFXANK.

[000271] В другом способе, способе 48 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-47, где по меньшей мере один полинуклеотид, который кодирует толерогенный фактор, представляет собой один или несколько полинуклеотидов, которые кодируют один или несколько из PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47.

[000272] В другом способе, способе 49 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-48, где по меньшей мере один полинуклеотид, который кодирует толерогенный фактор, функционально связан с экзогенным промотором.

[000273] В другом способе, способе 50 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 49, где экзогенный промотор является конститутивным, индуцируемым, временным, тканеспецифическим или клеточноспецифическим промотором, при этом конститутивный промотор является промотором CMV, EF1 α , PGK, CAG или UBC.

[000274] В другом способе, способе 51 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-50, где делецию и/или вставку из (i) осуществляют в пределах или рядом с B2M, и при этом вставка из (ii) представляет собой полинуклеотид, кодирующий PD-L1 или HLA-E.

[000275] В другом способе, способе 52 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-51, где способ дополнительно предусматривает введение по меньшей мере одной генетической модификации, которая обеспечивает усиление или снижение экспрессии по меньшей мере фактора выживания по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000276] В другом способе, способе 53 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 52, где по меньшей мере одна генетическая модификация, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии по меньшей мере фактора выживания, представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует MANF, что обеспечивает повышение экспрессии MANF по сравнению с немодифицированной клеткой; или делецию и/или вставку по меньшей мере одной пары оснований в пределах гена или рядом с ним, который кодирует ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK, что обеспечивает снижение или устранение экспрессии ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK по сравнению с немодифицированной клеткой.

[000277] В другом способе, способе 54 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 53, где вставку полинуклеотида, который кодирует MANF, осуществляют в локус типа "safe harbor" или в ген, относящийся к MHC-I, MHC-II или регулятору транскрипции MHC-I или MHC-II.

[000278] В другом способе, способе 55 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-54, где генетическое модифицирование предусматривает доставку по меньшей мере одной РНК-направляемой эндонуклеазной системы в клетку.

[000279] В другом способе, способе 56 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 55, где по меньшей мере одна система РНК-направляемая эндонуклеазная система представляет собой систему CRISPR, содержащую CRISPR-нуклеазу и направляющую РНК.

[000280] В другом способе, способе 57 настоящего изобретения представлен способ, представленный как способ 56, где CRISPR-нуклеаза представляет собой Cas9, Cpf1, их гомолог, их модифицированный вариант, их кодон-оптимизированный вариант или любую их комбинацию.

[000281] В другом способе, способе 58 по настоящему изобретению, представлен

способ в соответствии со способом 56 или 57, где CRISPR-нуклеаза представляет собой Cas9 из *S. pyogenes*.

[000282] В другом способе, способе 59 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 56-58, где CRISPR-нуклеаза содержит N-концевой сигнал ядерной локализации (NLS) и/или C-концевой NLS.

[000283] В другом способе, способе 60 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 56-59, где CRISPR-нуклеаза и направляющая РНК присутствуют при соотношении по весу 1:1.

[000284] В другом способе, способе 61 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44 или 46-60, где делецию и/или вставку из (i) осуществляют в пределах локуса гена B2M или рядом с ним, и при этом вставка из (ii) представляет собой полинуклеотид, кодирующий PD-L1.

[000285] В другом способе, способе 62 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 61, где направляющая РНК, используемая для осуществления (i) и (ii), содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну из последовательностей под SEQ ID NO: 1-3 или 35-44.

[000286] В другом способе, способе 63 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 61 или 62, где полинуклеотид, кодирующий PD-L1, фланкирован (a) нуклеотидной последовательностью, характеризующейся гомологией последовательности с участком, расположенным слева от сайта из (i), и (b) нуклеотидной последовательностью, характеризующейся гомологией последовательности с участком, расположенным справа от сайта из (i).

[000287] В другом способе, способе 64 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 63, где вставку полинуклеотида, кодирующего PD-L1, осуществляют в локус гена B2M в пределах 50 пар оснований сайта из (i).

[000288] В другом способе, способе 65 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 63 или 64, где (a) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 13, и (b) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 19.

[000289] В другом способе, способе 66 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 61-65, где полинуклеотид, кодирующий PD-L1, функционально связан с экзогенным промотором, где экзогенный промотор необязательно представляет собой промотор CAG.

[000290] В другом способе, способе 67 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-66, где клетка представляет собой клетку млекопитающего, где клетка необязательно представляет собой клетку человека.

[000291] В другом способе, способе 68 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-67, где клетка представляет собой стволовую клетку.

[000292] В другом способе, способе 69 по настоящему изобретению, представлен

способ в соответствии с любым из способов 44-68, где клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (PSC), эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гематопоезическую стволовую клетку и клетку-предшественника (HSPC).

[000293] В другом способе, способе 70 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-69, где клетка представляет собой дифференцированную клетку или соматическую клетку.

[000294] В другом способе, способе 71 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 44-69, где универсальные донорская клетка способна дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

[000295] В другом способе, способе 72 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 71, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой энтодермальные предшественники поджелудочной железы, эндокринные предшественники поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки или нервные клетки-предшественники.

[000296] В другом способе, способе 73 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 71, где полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы.

[000297] В другой композиции, композиции 37 по настоящему изобретению, представлена композиция, содержащая совокупность универсальных донорских клеток, полученных посредством способа в соответствии с любым из способов 44-73.

[000298] В другой композиции, композиции 38 по настоящему изобретению, представлена композиция в соответствии с композицией 37, где совокупность универсальных донорских клеток может поддерживаться в течение времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки подверглись дифференцировке.

[000299] В другой композиции, композиции 39 по настоящему изобретению, представлена композиция клеток, которые характеризуются (i) по меньшей мере одной делецией в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или компоненты или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и (ii) по меньшей мере одной вставкой полинуклеотида, который кодирует по меньшей мере один толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом генетической делеции из (i) или содержится в нем.

[000300] В другом способе, способе 74 по настоящему изобретению, представлен способ, предусматривающий введение субъекту совокупности универсальных донорских

клеток в соответствии с композицией 37 или 38.

[000301] В другом способе, способе 75 по настоящему изобретению, представлен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает (i) получение или обеспечение получения совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 37 или 38 после дифференцировки в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки и (ii) введение линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток субъекту.

[000302] В другом способе, способе 76 по настоящему изобретению, представлен способ получения клеток для введения субъекту, нуждающемуся в этом, при этом способ предусматривает (i) получение или обеспечение получения универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 37 или 38 и (ii) поддержание универсальных донорских клеток в течение времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки дифференцировались в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

[000303] В другом способе, способе 77 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 75 или 76, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой энтодермальные предшественники поджелудочной железы, эндокринные предшественники поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки или нервные клетки-предшественники.

[000304] В другом способе, способе 78 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 75 или 76, где полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы.

[000305] В другом способе, способе 79 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 74-78, где субъект представляет собой человека, у которого имеется заболевание, с подозрением на его наличие или у которого имеется риск возникновения заболевания.

[000306] В другом способе, способе 80 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 79, где заболевание является генетически наследуемым заболеванием.

[000307] В другом способе, способе 81 по настоящему изобретению, представлен способ получения универсальной донорской клетки, при этом способ предусматривает доставку в плюрипотентную стволовую клетку (PSC) (a) РНК-направляемой нуклеазы; (b) направляющей РНК (gRNA), нацеливающей на сайт-мишень в локусе гена бета-2-микроглобулина (B2M); и (c) вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, при этом нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, гомологичную

участку, расположенному слева от сайта-мишени в локусе гена B2M, (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую толерогенный фактор, и (iii) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному справа от сайта-мишени в локусе гена B2M, где локус гена B2M расщепляется по сайту-мишени и нуклеиновая кислота вставляется в локус гена B2M в пределах 50 пар оснований сайта-мишени, с получением тем самым универсальной донорской клетки, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенным ускользанием от иммунного надзора и/или повышенной выживаемостью клетки по сравнению с PSC, которая содержит нуклеиновую кислоту, вставленную в локус гена B2M.

[000308] В другом способе, способе 82 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 81, где gRNA содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

[000309] В другом способе, способе 83 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 81 или 82, где (i) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 13, и (iii) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 19.

[000310] В другом способе, способе 84 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 81-83, где толерогенный фактор представляет собой лиганд программируемой смерти 1 (PD-L1) или человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E).

[000311] В другом способе, способе 85 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 81 или 84, где нуклеотидная последовательность, кодирующая толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором.

[000312] В другом способе, способе 86 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 85, где экзогенный промотор является конститутивным, клеточноспецифическим, тканеспецифическим или временным.

[000313] В другом способе, способе 87 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 85 или 86, где экзогенный промотор представляет собой промотор CAG.

[000314] В другом способе, способе 88 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 81-87, где вектор представляет собой плазмидный вектор.

[000315] В другом способе, способе 89 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 88, где плазмидный вектор содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

[000316] В другом способе, способе 90 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 81-89, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9.

[000317] В другом способе, способе 91 по настоящему изобретению, представлен

способ в соответствии со способом 90, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации (NLS).

[000318] В другом способе, способе 92 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 90 или 91, где нуклеаза Cas9 представляет собой Cas9 из *S. pyogenes*.

[000319] В другом способе, способе 93 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 81-92, где PSC представляет собой эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гематопозитическую стволовую клетку и клетку-предшественника (HSPC).

[000320] В другом способе, способе 94 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 81-93, где PSC представляет собой человеческую PSC.

[000321] В другом способе, способе 95 по настоящему изобретению, представлен способ получения универсальной донорской клетки, при этом способ предусматривает доставку в плюрипотентную стволовую клетку (PSC) (а) РНК-направляемой нуклеазы; (b) направляющей РНК (gRNA), нацеливающей на сайт-мишень в локусе гена бета-2-микроглобулина (B2M), где gRNA содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 2; и (c) вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, при этом нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному слева от сайта-мишени локуса гена B2M, которая состоит по сути из SEQ ID NO: 13, (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую толерогенный фактор, и (iii) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному справа от сайта-мишени локуса гена B2M, которая состоит по сути из SEQ ID NO: 19, где локус гена B2M расщепляется по сайту-мишени и нуклеиновая кислота вставляется в локус гена B2M в пределах 50 пар оснований сайта-мишени, с получением тем самым универсальной донорской клетки, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенным ускользанием от иммунного надзора и/или повышенной выживаемостью клетки по сравнению с PSC, которая не содержит нуклеиновую кислоту, вставленную в локус гена B2M.

[000322] В другом способе, способе 96 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 95, где толерогенный фактор представляет собой лиганд программируемой смерти 1 (PD-L1) или человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E).

[000323] В другом способе, способе 97 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 95 или 96, где нуклеотидная последовательность, кодирующая толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором.

[000324] В другом способе, способе 98 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 97, где экзогенный промотор является конститутивным, клеточноспецифическим, тканеспецифическим или временным.

[000325] В другом способе, способе 99 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 97 или 98, где экзогенный промотор представляет собой промотор CAG.

[000326] В другом способе, способе 100 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 95-99, где вектор представляет собой плазмидный вектор.

[000327] В другом способе, способе 101 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 100, где плазмидный вектор содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

[000328] В другом способе, способе 102 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 95-101, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9.

[000329] В другом способе, способе 103 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 102, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации (NLS).

[000330] В другом способе, способе 104 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии со способом 102 или 103, где нуклеаза Cas9 представляет собой Cas9 из *S. pyogenes*.

[000331] В другом способе, способе 105 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 95-104, где PSC представляет собой эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гематопозитическую стволовую клетку и клетку-предшественника (HSPC).

[000332] В другом способе, способе 106 по настоящему изобретению, представлен способ в соответствии с любым из способов 95-105, где PSC представляет собой человеческую PSC.

VII. Примеры

[000333] В приведенных ниже примерах описываются создание и характеристика универсальных донорских клеток согласно настоящему изобретению. В таблице 1 приводятся толерогенные факторы, а в таблице 2 приводятся факторы выживания, которые могут быть генетически модифицированными в указанных клетках. На фиг. 1A-1C представлены различные стратегии геномного редактирования, которые могут быть использованы для уклонения от иммунного надзора.

Таблица 1. Толерогенные факторы, которые могут быть генетически модифицированными

Фактор	Нокаут (KO)	Нокин (KI)
HLA-E		+
HLA-G		+
CTLA-4		+

CD47		+
PD-L1		+
B2M	-	
HLA-ABC	-	
СИТА	-	

Таблица 2. Факторы выживания, которые могут быть генетически модифицированными

Фактор	Нокаут (КО)	Нокин (КИ)
ZNF143	-	
TXNIP	-	
FOXO	-	
JNK	-	
MANF		+

Пример 1. Создание нокаутных по B2M iPSC

[000334] **Отбор направляющей РНК (gRNA) для B2M.** Чтобы идентифицировать большой спектр gRNA, способных редактировать целевой участок ДНК B2M, проводили скрининг *in vitro* транскрибированной (IVT) gRNA. Нацеливающиеся на B2M gRNA конструировали с нацеливанием на экзон 1 гена B2M. Геномную последовательность B2M предоставляли для анализа с применением программного обеспечения для конструирования gRNA. Полученный перечень gRNA сужали до перечня из приблизительно 200 gRNA на основе уникальности последовательности (проводили скрининг только gRNA без идеального совпадения где-либо еще в геноме) и минимальных предсказанных нецелевых эффектов. Этот набор gRNA транскрибировали *in vitro* и трансфицировали с применением MessengerMax в клетки HEK293T, которые конститутивно экспрессируют Cas9. Клетки собирали через 48 часов после трансфекции, выделяли геномную ДНК и оценивали эффективность разрезания с помощью анализа TIDE. Для последующего анализа отбирали направляющие РНК с высокой степенью инсерционно-делеционных мутаций и низкими прогнозируемыми нецелевыми эффектами. В таблице 3 представлены последовательности-мишени выбранных gRNA B2M.

Таблица 3. Выбранные последовательности-мишени для gRNA B2M

Название	Последовательность-мишень (5'-3')	SEQ ID NO:	PAM
gRNA B2M-1 (экзон 1_T12)	GCTACTCTCTTTCTGGCC	1	TGG
gRNA B2M-2 (экзон 1_T2)	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	2	TGG
gRNA B2M-3	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	3	CGG

(ЭКЗОН 1_T8)			
ЭКЗОН 1_T1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	35	TGG
ЭКЗОН 1_T3	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	36	AGG
ЭКЗОН 1_T4	ACTGGACGCGTCGCGCTGGC	37	GGG
ЭКЗОН 1_T5	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	38	CGG
ЭКЗОН 1_T6	GGCCACGGAGCGAGACATCT	39	CGG
ЭКЗОН 1_T7	GCCCGAATGCTGTCAGCTTC	40	AGG
ЭКЗОН 1_T9	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	41	TGG
ЭКЗОН 1_T10	TCCTGAAGCTGACAGCATTC	42	GGG
ЭКЗОН 1_T11	TCCTGAAGCTGACAGCATT	43	CGG
ЭКЗОН 1_T13	ACTCTCTCTTTCTGGCCTGG	44	AGG

[000335] **Скрининг gRNA B2M в iPSC.** Использовали три gRNA (B2M-1, B2M-2 и B2M-3) для редактирования iPSC. Локализация последовательности-мишени каждой из этих gRNA показана на диаграмме на фиг. 2. Клетки iPSC (линия клеток TC-1133, RUDCR, штат Нью Джерси, США) нуклеофицировали с использованием нуклеофектора Lonza 4D и набора первичных клеток P3 (Lonza, № по каталогу V4XP-3024) со смесью RNP Cas9 (Aldevron, № по каталогу 9212-5MG) и gRNA (Synthego) при молярном соотношении 3:1 (gRNA:Cas9) с конечными концентрациями 125 пмоль Cas9 и 375 пмоль gRNA. Клеток диссоциировали с использованием Accutase (Stempro, № по каталогу A1110501), затем повторно суспендировали в среде DMEM/F12 (Gibco, № по каталогу 11320033), подсчитывали с использованием Cellometer (Nexcelon) и центрифугировали. Клетки повторно суспендировали в буфере P3 с добавкой 1 (соотношение 4,5:1) при концентрации 2×10^3 клеток/мкл. Всего 2×10^5 клеток объединяли с комплексом RNP, переносили в кювету для нуклеофекции (набор Lonza) и нуклеофицировали с использованием программы CA-137. В каждой кювете на 250 мкл использовали среду StemFlex (Gibco, № по каталогу A3349401) с CloneR (Stem Cell Technologies, № по каталогу 05888) (соотношение 1:10) для повторно суспендированных нуклеофицированных клеток. Эту клеточную суспензию распределяли в две лунки покрытого витронектином (Gibco, № по каталогу A14700) 24-луночного планшета с дополнительными 250 мкл StemFlex с CloneR. Клетки возвращали в гипоксический инкубатор (37°C, 4% O₂, 8% CO₂) на 48 часов. Через 48 часов собирали геномную ДНК из одной лунки каждой технической повторности с использованием набора для выделения gDNA (Qiagen, № по каталогу 69506).

[000336] Выделенную gDNA подвергали ПЦР для определения частоты инсерционно-делеционных мутаций. Выполняли ПЦР для соответствующих участков с использованием Platinum Taq Supermix (Invitrogen, № по каталогу 125320176 и № по каталогу 11495017) с праймерами B2M. Праймерные последовательности представлены в

таблице 4, и локализации праймеров В2М относительно сайтов-мишеней gRNA показаны на фиг. 2. Условия циклов представлены в таблице 5.

Таблица 4. Праймеры В2М для TIDE

Название	Тип	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
B2MF2	прямой	CAGACAGCAAACCTCACCCAG	4
B2MR2	обратный	AAACTTTGTCCCGACCCTCC	5

Таблица 5. Параметры циклов ПЦР для В2М

Стадия	Температура	Время	Циклы
Денатурация	94°C	2 минуты	1
Денатурация	94°C	15 сек.	38
Отжиг	55°C°C	30 сек.	
Удлинение	68°C	45 сек.	
Элонгация	68°C	5 минут	1
Удерживание	4	удерживание	

[000337] Полученные амликоны подвергали ПЦР-очистке и секвенированию по Сенгеру. Результаты секвенирования по Сенгеру вводили в Tsunami вместе с направляющей последовательностью. Проценты инсерционно-делеционных мутаций и идентичности вычисляли с помощью программного обеспечения (фиг. 3А). gRNA В2М-1, В2М-2 и В2М-3 имели частоты инсерционно-делеционных мутаций $2,5\% \pm 1,1\%$, $87,6\% \pm 14,1\%$ и $63,9\% \pm 0,9\%$ соответственно (n=2). На фиг. 3В и 3С представлены распределения исходов инсерционно-делеционных мутаций для gRNA В2М-2 (фиг. 3В) и В2М-3 (фиг. 3С).

[000338] Клетки в лунке в двух повторностях поддерживали до конfluence, а затем засеивали в последовательно более крупные сосуды. Суммарную популяцию переводили на среду Advanced 20/10/10 (см. таблицу 6) и Laminin-521 (Stem Cell Technologies, № по каталогу 77004) для поддержания.

Таблица 6. Состав среды Advanced 20/10/10

Реагент	Количество	Рабочая концентрация	Информация о реагенте
DMEM/F12 без NEPEs	955мл	Основание	Gibco (11330032)
Нормоцин	2 мл		Invivogen (ANTNR1)
Заменимые аминокислоты, 100x	10 мл	1x	Gibco (11140076)
Химически определенные	2 мл	0,2x	Gibco

липиды, 100x			(11905031)
20% HSA (FAF)	5 мл	0,1%	Sigma (A1887)
7,5% бикарбоната натрия	7 мл	0,0525%	Gibco (25080094)
Человеческий инсулин, 4 мг/мл	5 мл	20 мкг/мл	Invitrogen (12585014)
Хлорид натрия, 250 мг/мл	2 мл	0,5 мг/мл	Sigma
Аскорбиновая кислота, 200 мМ	1 мл	200 мкМ	Sigma
Голотрансферрин, 10 мг/мл	1 мл	10 мкг/мл	Sigma
Селенит натрия, 140 мкг/мл	100 мкл	14 нг/мл	Sigma
Для получения полной Advanced 20/10/10 (объемом 1 л) добавляли следующее на момент первого применения			
Основной FGF, 100 мкг/мл	200 мкл	20 нг/мл	Peprotech
Активин А, 100 мкг/мл	100 мкл	10 нг/мл	Peprotech
Херегулин, 100 мкг/мл	100 мкл	10 нг/мл	Peprotech

[000339] **Создание и характеристика клона IPS B2M с КО.** Подвергнутые массовому редактированию популяции с подтвержденной последовательностью (фиг. 4A) сортировали по отдельным клеткам с использованием FACS-ARIA (BD Bioscience) в 96-луночные планшеты, покрытые витронектином, и выделяли в StemFlex с помощью CloneR. Вкратце, клетки диссоциировали из колб для поддержания с использованием Accutase и повторно суспендировали в StemFlex с помощью CloneR. Затем клетки подсчитывали с помощью Cellometer и разбавляли до 1×10^5 /мл. Из них 2 мл фильтровали через клеточное сито (Falcon, № 352235) в пробирку для FACS, предоставленную оператору, и отдельные клетки сортировали в отдельные лунки. Высеянные одиночные клетки выращивали в гипоксическом инкубаторе (37°C, 8% CO₂, 4% O₂) с заменой среды через день до тех пор, пока колонии не стали достаточно большими, чтобы их можно было повторно засеять как отдельные клетки. После достижения конfluence образцы разделяли для поддержания и экстракции gDNA (см. выше). Идентичность клона подтверждали с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру (подробности см. ниже). В таблице 7 представлены последовательности выбранных клонов вокруг сайта разреза (удаленные и/или вставленные последовательности выделены жирным шрифтом).

Таблица 7. Анализ последовательностей клонов B2M КО

Клон	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
WT	CT XCGC T CCGTGGZGCTA, X=N ₃₀ , Z=N ₁₆	27
A9	CT XCGCGCTACTTA- -----GZGCTA, X=N ₃₀ , Z=N ₁₆	28
A11	CT XCGC TTCCGTGGZGCTA, X=N ₃₀ , Z=N ₁₆	29
B10	CTAA----- - ----GGZGCTA, X=N ₃₀ , Z=N ₁₆	30
B12	CT XCGC TTCCGTGGZGCTA, X=N ₃₀ , Z=N ₁₆	29
C5	CT XCGC - -----GCTA, X=N ₃₀ , Z=N ₁₆	31
C9	CT XCGC - CCGTGGZGCTA, X=N ₃₀ , Z=N ₁₆	32
C11	CT XCGC TTCCGTGGZGCTA, X=N ₃₀ , Z=N ₁₆	29
C12	CT XCGC TTCCGTGGZGCTA, X=N ₃₀ , Z=N ₁₆	29

[000340] Последовательности клонов выравнивали в программном обеспечении Snargene для определения идентичности инсерционно-делеционных мутаций и гомо- или гетерозиготности. Как показано на фиг. 4B, 8 клонов были гомозиготными по B2M КО, а 7 клонов были гетерозиготными по B2M КО. Гомозиготные клоны с желаемыми редактированиями наращивали и дополнительно проверяли с помощью секвенирования и проточной цитометрии. Изначально клоны поддерживали в среде StemFlex на планшетах, покрытых витронектином, а затем в конечном итоге переносили в среду Advanced 20/10/10 и сосуды, покрытые ламинином-521.

[000341] Далее клетки поддерживали в покрытых ламинином-521 колбах с Advanced 20/10/10. Отредактированные клоны проверяли на идентичность по инсерционно-делеционным мутациям с помощью ПЦР участка B2M и секвенирования по Сэнгеру. Нокаут подтверждали с помощью проточной цитометрии для B2M и HLA-A (перечень используемых антител см. в таблицах 8 и 9) и анализа экспрессии B2M способом Taqman qPCR с использованием стандартных протоколов Taqman (Taqman FastAdvanced Mastermix, ThermoFisher, номер по каталогу 4444556). Уровни экспрессии B2M для трех клонов B2M КО, а также для клеток дикого типа (немодифицированных) представлены на фиг. 5. Все три тестируемых клона с КО демонстрировали пониженную экспрессию мРНК B2M по сравнению с клеткой дикого типа.

Таблица 8. Антитела для проточной цитометрии для определения плюрипотентности

Мишень	Флуорофор	Изготовитель	Номер по каталогу
SSEA-4	AlexaFluor 647	ThermoFisher	SSEA421
Tra-1-60	PE	ThermoFisher	MA1-023-PE
Tra-1-81	PE	BD Bioscience	560161

Таблица 9. Антитела для B2M и HLA-ABC

Мишень	Флуорофор	Изготовитель	Номер по каталогу
B2M	AlexaFluor 647	Biolegend	316311
HLA-ABC	FITC	BD Pharmigen	555552

[000342] Экстракцию РНК выполняли с использованием набора Qiagen RNeasy с ДНКазой, не содержащей РНКаз, в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen, № по каталогу 74104 и 79254). Синтез cDNA осуществляли с использованием набора для синтеза cDNA Advanced iScript для RT-qPCR (BioRad, № по каталогу 1725037) в соответствии с инструкциями производителя. Кариотипический статус клонов оценивали с помощью сервиса Karyostat (ThermoFisher) и отслеживали известные кариотипические аномалии BCL2L1 с помощью ddPCR с использованием инструкций производителя и супермикса ddPCR для зондов (без dUTP) (BioRad, № по каталогу 1863024; праймеры в таблице 10) с температурой отжига 59°C и RPP30 в качестве эталонного анализа.

Таблица 10. Наборы праймеров и зондов для ddPCR

	BCL2L1 (мишень)	SEQ ID NO:	RPP30 (эталон)	SEQ ID NO:
Прямой праймер	TCTGCAGAAGGCTAC CCCTA	7	GATTTGGACCTGCGAGC G	9
Обратный праймер	TGCTGTGTCTAAGAC CTCTTTCAT	8	CAAGCCTGGCAATAAAC AATGA	10
Зонд	Универсальный зонд № 44 (Sigma, № по каталогу 4688040001)	-	5' VIC- CTGCTGCCTGAACAT-3'- MGB-NFQ	11

[000343] Полученные ампликоны проверяли на готовом 2% агарозном геле (ThermoFisher, № по каталогу G501802) и отправляли на ПЦР-очистку и секвенирование по Сэнгеру. Полученные файлы секвенирования вводили в программное обеспечение Tsunami вместе с файлом последовательности gRNA и контрольной последовательности для определения идентичности и процента инсерционно-делеционных мутаций.

[000344] Также подтверждали, что клоны являются отрицательными по экспрессии антигенов B2M и МНС класса I (HLA-A, B, C) с обработкой гамма-интерфероном или без нее (25 нг/мл, R&D Systems, 285-IF) с помощью их проточной цитометрии. См. фиг. 6A-6D.

[000345] Подтверждали, что клоны сохраняют плюрипотентность с помощью проточной цитометрии для маркеров плюрипотентности клеточной поверхности (фиг. 7A-7D). Дополнительное подтверждение плюрипотентности предусматривало Taqman Scorecard (ThermoFisher, № по каталогу A15872), сервис Thermo Pluritest и Trilineage Differentiation (полный протокол см. ниже).

[000346] Клетки диссоциировали и подсчитывали, как указано выше, перед центрифугированием и повторным суспендированием в среде Advanced 20/10/10 с 2 мкМ

Y-27632 (Tocris, № по каталогу 1245) до 1×10^6 /мл. Затем повторно суспендированные клетки фильтровали через фильтр 40 мкм (Fisherbrand, № по каталогу 22363547) и 5 мл суспензии высевали в одну лунку 6-луночного планшета со верхним креплением (Corning, № по каталогу 3471). Затем клетки помещали на орбитальный шейкер на ночь при 98 оборотах в минуту для образования агрегатов. Через 16 часов использованные среды удаляли из каждой лунки, осторожно вращая планшет для сбора агрегатов. Добавляли 4 мл свежей Advanced 20/10/10.

[000347] Еще через 24 часа клетки дифференцировались. Агрегаты сначала собирали в коническую пробирку на 50 мл и центрифугировали при 1000 оборотах в минуту в течение 1 минуты для осаждения агрегатов. Среду аспирировали и агрегаты промывали с помощью DMEM/F12. Агрегаты снова собирали центрифугированием и повторно суспендировали в 4 мл соответствующей среды для дифференцировки перед возвращением в планшет и шейкер. Для всех дифференцировок использовали следующие базовые среды: 480 мл IMDM +GlutaMax (Gibco, № по каталогу 31980030), 480 мл F12+GlutaMax (Gibco, № по каталогу 31765035), 10 мл заменимых аминокислот (Gibco, № по каталогу 11140076), 5 мл 20% BSA (Sigma, № по каталогу A7638-5G), 2 мл химически определенных липидов (Gibco, № по каталогу 11905031), 1 мл 200 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma, № по каталогу A4403-100MG), 1 мл 10 мг/мл голотрансферрина (Sigma, № по каталогу T0665) и 100 мкл 140 мкг/мл селенита натрия (Sigma, № по каталогу S5261). Для дифференцировки клеток в клетку эктодермы использовали конечную концентрацию инсулина 4 мг/мл (Gibco, № по каталогу 12585014), 2 мкМ A83-01, 2 мкМ дорсоморфина (Peprotech, № по каталогу 8666430) и 2 мкМ PNU-74654 на протяжении двух дней. Для дифференцировки клеток в клетку мезодермы использовали конечную концентрацию 1 мкг/мл инсулина, 0,1 мкМ PIK-90, 3 мкМ CHIR99021 (Peprotech, № по каталогу 2520691) и 0,5 мкМ LDN193189 (Peprotech, № по каталогу 1062443) на протяжении двух дней. Для дня 1 дифференцировки в энтодерму использовали конечную концентрацию 0,2 мкг/мл инсулина, 0,1 мкМ PIK-90, 100 нг/мл активина-A (Peprotech, № по каталогу 120-00), 2 мкМ CHIR99021 и 20 нг/мл основного FGF (Peprotech, № по каталогу 101-18b). Дополнительные два дня дифференцировки в энтодерму проводили с: 0,2 мкг/мл инсулина, 0,1 мкМ PIK-90, 100 нг/мл активина-A и 0,25 мкМ LDN193189. Среду меняли ежедневно для всех дифференцировок. Все собирали для анализа РНК с использованием системы Taqman Scorecard в день 3.

Пример 2. Поддержание и размножение клеток

[000348] **Поддержание hESC/hiPSC.** Клетки линии СуТ49 эмбриональных стволовых клеток человека (hESC) поддерживали, культивировали, засевали, пролиферировали и высевали, как описано в Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004. Клетки СуТ49 диссоциировали с использованием ACCUTASE® (Stemcell Technologies 07920 или эквивалент).

[000349] Человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (hiPSC), такие как клеточная линия TC1133 (Lonza), поддерживали в StemFlex Complete

(Life Technologies, A3349401) на планшетах для культивирования тканей, покрытых BIOLAMININ 521 CTG (BioLamina, № по каталогу CT521). Планшеты предварительно покрывали разбавлением BIOLAMININ в DPBS, кальция, магнии (Life Technologies, 14040133) 1:10 или 1:20 в течение 2 часов при 37°C. Клетки ежедневно подпитывали средой StemFlex. Для посева клеток использовали те же плотности клеток, что и для СуТ49. Для высевания клеток в виде отдельных клеток клетки высевали с 1% добавкой RevitaCell™ (100X) (ThermoFisher, № по каталогу A2644501) в StemFlex на планшеты, покрытые BIOLAMININ.

[000350] **Клонирование отдельных клеток hPSC.** Для клонирования отдельных клеток hPSC (hESC или hiPSC) подпитывали StemFlex Complete с Revitacell (для конечной концентрации 1X Revitacell) за 3-4 часа до диссоциации с помощью ACCUTASE®. После диссоциации клетки сортировали как одну клетку на лунку 96-луночного планшета для культуры ткани, покрытого BIOLAMININ. Устройство для сортировки WOLF FACS (Nanocollect) использовался для сортировки отдельных клеток в лунки. Планшеты предварительно заполняли 100-200 мкл StemFlex Complete с Revitacell. Через три дня после посева клеток в клетки подпитывали свежей StemFlex и продолжали подпитывать через день 100-200 мкл среды. После 10 дней роста клетки ежедневно подпитывали StemFlex до дня 12-14. В это время планшеты диссоциировали с помощью ACCUTASE®, и собранные клеточные суспензии разделяли 1:2, при этом половину помещали в новый 96-луночный планшет для поддержания, а половину - в раствор для экстракции ДНК QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen). После экстракции ДНК проводили ПЦР для оценки присутствия или отсутствия желаемых редактируемых генов в целевом локусе ДНК. Секвенирование по Сэнгеру использовали для проверки желаемых редактируемых генов.

[000351] **Размножение полученных из отдельной клетки клонов hPSC.** Для СуТ49 успешно нацеленные клоны засеивали в 24-луночные планшеты с чистой 10% средой XF KSR A10H10, но на планшеты, покрытые BIOLAMININ. После 24-луночной стадии клоны СуТ49 засеивали, как описано в Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004.

[000352] Для hiPSC (TC1133) клетки поддерживали в StemFlex Complete на протяжении всего процесса клонирования и регулярного поддержания в планшетах, покрытых BIOLAMININ, с Revitacell на стадиях посева.

Пример 3. Создание покаутных по В2М человеческих плюрипотентных стволовых клеток (hPSC)

[000353] **Отбор направляющей РНК (gRNA) для В2М в hPSC.** Три нацеливающихся на В2М gRNA, описанных выше в примере 1, использовали для нацеливания на ген В2М в hPSC. Чтобы оценить их эффективность разрезания в hPSC, клетки СуТ49 электропорировали с использованием Neon Electroporator (набор для трансфекции Neon от ThermoFisher, № по каталогу MPK5000) со смесью рибонуклеопротеина (RNP) белка Cas9 (Biomay) и направляющей РНК (Synthego) при молярном соотношении 3:1 (gRNA:Cas9) с абсолютными значениями 125 пмоль Cas9 и 375 пмоль gRNA. Для образования комплекса RNP gRNA и Cas9 объединяли в одном

сосуде с R-буфером (набор для трансфекции Neon) до суммарного объема 25 мкл и инкубировали в течение 15 минут при к. т. Клетки диссоциировали с использованием ACCUTASE®, затем повторно суспендировали в среде DMEM/F12 (Gibco, № по каталогу 11320033), подсчитывали с использованием NC-200 (Chemometec) и центрифугировали. Всего 1×10^6 клеток повторно суспендировали с комплексом RNP и добавляли R-буфер до суммарного объема 125 мкл. Затем эту смесь подвергали электропорации с помощью 2 импульсов в течение 30 мс при 1100 В. После электропорации клетки переносили пипеткой в пробирку Эппендорфа, заполненную средой StemFlex с RevitaCell. Эту клеточную суспензию затем высевали в чашки для культуры тканей, предварительно покрытые BIOLAMININ 521 CTG при разбавлении 1:20. Клетки культивировали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO₂) в течение 48 часов. Через 48 часов геномную ДНК собирали из клеток с использованием QuickExtract (Lucigen, Миддлтон, штат Висконсин, США; № по каталогу QE09050).

[000354] Выполняли ПЦР для целевой последовательности B2M и полученную амплифицированную ДНК оценивали по эффективности разрезания с помощью анализа TIDE. Выполняли ПЦР для соответствующих участков с использованием Platinum Taq Supermix (Invitrogen, № по каталогу 125320176 и № по каталогу 11495017). Последовательности праймеров для ПЦР представлены в таблице 4; а условия циклов представлены в таблице 5. Полученные ампликоны подвергали ПЦР-очистке и секвенированию по Сенгеру. Результаты секвенирования по Сенгеру вводили в программное обеспечение Tsunami вместе с направляющей последовательностью. Проценты инсерционно-делеционных мутаций и идентичности вычисляли с помощью программного обеспечения. Затем отбирали отдельные gRNA на основании их частоты инсерционно-делеционных мутаций в hPSC. На фиг. 8 показана эффективность разрезания для 3 gRNA B2M.

[000355] Нецелевые эффекты выбранных gRNA оценивали в ДНК, полученной из стволовых клеток, с использованием анализа гибридного захвата предсказанных сайтов подобия последовательностей. Направляющие последовательности B2M-2 и B2M-3 не показали выявляемых нецелевых эффектов. gRNA B2M-2 выбирали для дальнейшего создания клона за ее высокую целевую активности и невыявляемую нецелевую активность.

[000356] **Создание и характеристика клона hPSC B2M KO.** С использованием gRNA B2M-2 электропорировали hESC CyT49 и сортировали по отдельным клеткам через 3 дня после электропорации с использованием устройства для сортировки клеток WOLF FACS (Nanoclect) в 96-луночные планшеты, покрытые BIOLAMININ 521 CTG с StemFlex и Revitacell. Высейные одиночные клетки выращивали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO₂) с заменой среды через день до тех пор, пока колонии не стали достаточно большими, чтобы их можно было повторно засеять как отдельные клетки. После достижения конfluence образцы разделяли для поддержания и экстракции геномной ДНК.

[000357] Состояние В2М КО клонов подтверждали с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. Полученные последовательности ДНК целевого участка В2М выравнивали в программном обеспечении Snapgene для определения идентичности инсерционно-делеционных мутаций и гомо- или гетерозиготности. Клоны с желаемыми редактированиями размножали и дополнительно проверяли посредством оценивания с помощью проточной цитометрии на предмет экспрессии В2М (перечень используемых антител см. в таблице 11). Клоны оценивали с обработкой интерфероном-гамма (25 нг/мл, R & D Systems, 285-IF) и без таковой. На фиг. 9А показана экспрессия В2М в клетках дикого типа, а на фиг. 9В представлена экспрессия В2М в клетках с КО. Кариотипический статус клонов оценивали с помощью сервиса Cell Line Genetics (Мадисон, штат Висконсин, США) и регистрировали нормальный кариотип.

Таблица 11. Антитела для проточной цитометрии для определения плюрипотентности

Антиген	Клон	Флуорофор	Изготовитель	№ по каталогу
Oct3/4	40/3	Alexa 647	BD Bioscience	560329
SOX2	030-678	PE	BD Bioscience	562195
В2М	2М2	PE	Biolegend	316305
HLA-ABC	W6/32	Alexa 488	Biolegend	311415
mIgG1 каппа	Нет данных	PE	BD Bioscience	555749
PD-L1	В7-Н1	Alexa-488	ThermoFisher	53-5983-42
HLA-E	3D12	PE	ThermoFisher	12-9953-42

[000358] Подтверждали, что клоны сохраняют плюрипотентность с помощью внутриклеточной проточной цитометрии для маркеров плюрипотентности OCT4 и SOX2. Клоны с подтвержденной плюрипотентностью дифференцировали в эндокринные предшественники поджелудочной железы с использованием ранее обоснованных способов (Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004).

Пример 4. Создание нокаутных по В2М с нокином PD-L1 человеческих плюрипотентных стволовых клеток (hPSC)

[000359] **Схема стратегии В2М-КО PD-L1-KI.** Конструкцию плазмиды для вставки PD-L1 (CD274) в локус В2М создавали таким образом, что исходный кодон В2М был удален после подвергания гомологически направленной репарации (HDR) для вставки PD-L1, что сводило на нет любую возможность частичной экспрессии В2М. На фиг. 10 представлена схема плазмиды, а в таблице 12 указаны элементы и их локализации. Плазмида-донор содержала управляемую промотором CAGGS cDNA PD-L1, фланкированную плечами гомологии из 800 пар оснований с последовательностью, идентичной локусу В2М вблизи экзона 1. Полная последовательность плазмиды представлена под SEQ ID NO: 33.

Таблица 12. Элементы плазмиды-донора B2M-CAGGS-PD-L1

Элемент	Локализация (размер в п. о.)	SEQ ID NO:
Левый ITR	1-130 (130)	12
LNA-B2M	145-944 (800)	13
Энхансер CMV	973-1352 (380)	14
Промотор куриного бета-актина	1355-1630 (276)	15
Химерный интрон	1631-2639 (1009)	16
PD-L1	2684-3556 (873)	17
Сигнал поли(A) bGH	3574-3798 (225)	18
RNA-B2M	3805-4604 (800)	19
Правый ITR	4646-4786 (141)	20

[000360] gRNA B2M-2 использовали для облегчения вставки трансгена PD-L1 в целевой локус B2M. Плазмиду-донора PD-L1 вводили вместе с комплексом RNP, состоящим из нацеливающейся на B2M gRNA и белка Cas9. На 1 миллион клеток СуТ49 вместе с RNP доставляли 4 мкг плазмидной ДНК. Электропорацию проводили, как описано в примере 3. Через семь дней после электропорации клетки сортировали на предмет поверхностной экспрессии PD-L1 с использованием устройства для сортировки WOLF FACS (Nanocollect) в 96-луночные планшеты, покрытые BIOLAMININ 521 CTG, с StemFlex с Revitacell. Для FACS-сортировки неотредактированные клетки служили отрицательным контролем. PD-L1-положительные клетки отбирали для сортировки и клонирования одиночных клеток.

[000361] Для выявления поверхностной экспрессии PD-L1 использовали флуоресцентные антитела к PD-L1 (см. таблицу 11). Высеянные одиночные клетки выращивали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO₂) с заменой среды через день до тех пор, пока колонии не стали достаточно большими, чтобы их можно было повторно засеять как отдельные клетки. После достижения конfluence образцы разделяли для поддержания и экстракции геномной ДНК.

[000362] Правильно нацеленные клоны идентифицировали с помощью ПЦР в отношении вставки путем нокина (KI) PD-L1 с использованием праймеров, которые амплифицируют участок за пределами плеч гомологии плазмиды до вставки cDNA PD-L1, что обеспечивает амплификацию только интегрированной ДНК с KI. Целевую вставку тестировали на зиготность с помощью ПЦР, чтобы оценить, совершается ли KI гетерозиготным или гомозиготным образом. Если идентифицировали гетерозиготный клон, то KI-негативный аллель отправляли на секвенирование по Сэнгеру, чтобы убедиться, что он содержит разрушающую B2M инсерционно-делеционную мутацию. Правильные клоны с KI с полным разрушением B2M (посредством либо вставки путем KI, либо образования инсерционно-делеционной мутации) размножали в форматах

нарастающей культуры тканей до тех пор, пока размер популяции не достигал 30 миллионов клеток. Таким образом размножали примерно 10 клонов и их плюрипотентность подтверждали тестированием в отношении OCT4 и SOX2 с помощью внутриклеточной проточной цитометрии (фиг. 11). Затем клоны, прошедшие указанные выше тесты, дополнительно тестировали с помощью кариотипического анализа (Cell Line Genetics), как описано ниже. Кроме того, затем клоны тестировали по их способности дифференцироваться в предшественники энтодермы поджелудочной железы (PEC) по установленному протоколу (Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7 (5): e37004), как описано ниже. Потерю B2M далее подтверждали отсутствием экспрессии B2M с обработкой гамма-интерфероном или без нее (25 нг/мл, R & D Systems, 285-IF) с помощью проточной цитометрии. На фиг. 12А и 12В показана экспрессия PD-L1 в клетках дикого типа и клетках B2M KO/PD-L1 KI соответственно.

Пример 5. Создание нокаутных по B2M с нокином HLA-E человеческих плюрипотентных стволовых клеток (hPSC)

[000363] **Схема стратегии B2M-KO HLA-E -KI.** Конструкцию плазмиды для вставки тримера HLA-E в локус B2M создавали таким образом, что исходный кодон B2M был удален после подвергания гомологически направленной репарации (HDR) для вставки тримера HLA-E, что сводило на нет любую возможность частичной экспрессии B2M. На фиг. 13 представлена схема плазмиды, а в таблице 13 указаны элементы и их локализации. cDNA тримера HLA-E состояла из сигнального пептида B2M, слитого с пептидом презентации HLA-G, слитым с мембранным белком B2M, слитым с белком HLA-E без его сигнального пептида. Эта тримерная конструкция была опубликована ранее (Gornalusse et al. (2017) Nat. Biotechnol. 35(8): 765-772). Плазмида-донор для доставки HLA-E содержит промотор CAGGS, управляющий экспрессией тримера HLA-E, фланкированный плечами гомологии из 800 пар оснований с последовательностью, идентичной локусу B2M вблизи экзона 1. Полная последовательность плазмиды представлена под SEQ ID NO: 34.

Таблица 13. Элементы плазмиды-донора B2M-CAGGS-HLA-E

Элемент	Локализация (размер в п. о.)	SEQ ID NO:
Левый ITR	1-130 (130)	12
LNA-B2M	145-944 (800)	13
Энхансер CMV	973-1352 (380)	14
Промотор куриного бета-актина	1355-1630 (276)	15
Химерный интрон	1631-2639 (1009)	16
Сигнальная последовательность B2M	2684-2743 (60)	21
Пептид HLA-G	2744-2770 (27)	22
Линкер GS	2771-2815 (45)	23

Мембранный белок B2M	2816-3112 (297)	24
Линкер GS	3113-3172 (60)	25
HLA-E	3173-4183 (1011)	26
Сигнал поли(A) bGH	4204-4428 (225)	18
RNA-B2M	4435-5234 (800)	19
Правый ITR	5276-5416 (141)	20

[000364] gRNA B2M-2 использовали для облегчения вставки трансгена HLA-E в целевой локус B2M. Плазмиду-донора HLA-E вводили вместе с комплексом RNP, состоящим из нацеливающейся на B2M gRNA и белка Cas9. На 1 миллион клеток СуТ49 вместе с RNP доставляли 4 мкг плазмидной ДНК. Электропорацию проводили, как описано в примере 3. Через семь дней после электропорации клетки сортировали на предмет поверхностной экспрессии HLA-E с использованием устройства для сортировки WOLF FACS (Nanocollect) в 96-луночные планшеты, покрытые BIOLAMININ 521 CTG, с StemFlex с Revitacell. Для FACS-сортировки неотредактированные клетки служили отрицательным контролем. HLA-E-положительные клетки отбирали для сортировки и клонирования одиночных клеток.

[000365] Для выявления поверхностной экспрессии HLA-E использовали флуоресцентные антитела к HLA-E (таблица 11). Высеянные одиночные клетки выращивали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO₂) с заменой среды через день до тех пор, пока колонии не стали достаточно большими, чтобы их можно было повторно засеять как отдельные клетки. После достижения конfluence образцы разделяли для поддержания и экстракции геномной ДНК.

[000366] Правильно нацеленные клоны идентифицировали с помощью ПЦР для вставки путем нокина (KI) HLA-E с использованием праймеров, которые амплифицируют участок за пределами плеч гомологии плазмиды до вставки cDNA HLA-E, что обеспечивает амплификацию только интегрированной ДНК с KI. Целевую вставку тестировали на зиготность с помощью ПЦР, чтобы оценить, совершается ли KI гетерозиготным или гомозиготным образом. Если идентифицировали гетерозиготный клон, то KI-негативный аллель отправляли на секвенирование по Сэнгеру, чтобы убедиться, что он содержит разрушающую B2M инсерционно-делеционную мутацию. Правильные клоны с KI с полным разрушением B2M (посредством либо вставки путем KI, либо образования инсерционно-делеционной мутации) размножали в форматах нарастающей культуры тканей до тех пор, пока размер популяции не достигал 30 миллионов клеток. Таким образом размножали примерно 10 клонов и их плюрипотентность подтверждали тестированием в отношении OCT4 и SOX2 с помощью внутриклеточной проточной цитометрии (фиг. 14). Затем клоны, прошедшие указанные выше тесты, дополнительно тестировали с помощью кариотипического анализа (Cell Line Genetics). Кроме того, клоны тестировали по их способности дифференцироваться в предшественники энтодермы поджелудочной железы (PEC) по установленному протоколу

(Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7 (5): e37004). Потерю В2М далее подтверждали по отсутствию экспрессии HLA-A, В,С с обработкой гамма-интерфероном или без нее (50 нг/мл, R & D Systems, 285-IF) с помощью проточной цитометрии (фиг. 15). На фиг. 16 показана экспрессия HLA-E.

Пример 6. Кариотипический анализ редактированных клонов

[000367] **Анализ кариотипирования с G-бэндингом редактированных эмбриональных стволовых (ES) клеток.** 1 миллион редактированных ES-клеток засеивали в культуральную колбу Т-25 с культуральной средой (DMEM/F12+10% KSR без Хепо с 10 нг/мл активина и 10 нг/мл херегулина). После культивирования в течение ночи три культуральные колбы Т-25 отправляли в Cytogenetics Laboratory (Cell Line Genetics, Inc.) для анализа кариотипирования, FISH-анализа на хромосомы 1, 12, 17, 20 и анализа сравнительной геномной гибридизации на чипе (aCGH) со стандартным чипом 8×60К. Результаты G-бэндинга отобранных клеток, подвергнутых электропорации с использованием неразрезающих направляющих последовательностей ("NCG"), клонов В2М КО, клонов В2М НО/PD-L1 НI ("V1-A") и клонов В2М КО/HLA-E КI ("V2-A") показаны в таблице 14.

Таблица 14. Результаты кариотипирования с G-бэндингом

Клеточная линия	Тип	Засев	Анализ кариотипирования	FISH-анализ	Анализ aCGH на чипе
NCG#1	Неразрезающая направляющая	P36	Нормальный	Нормальный	PASS
NCG#2	Неразрезающая направляющая	P36	Нормальный	Нормальный	PASS
В2МКО#1	В2М КО	P38	Нормальный	Нормальный	PASS
В2МКО#2	В2М КО	P36	Нормальный	Нормальный	PASS
В2МКО#3	В2М КО	P36	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-A003	В2М КО/PD-L1 КI	P37	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-A004	В2М КО/PD-L1 КI	P38	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-A007	В2М КО/PD-L1 КI	P37	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-A008	В2М КО/PD-L1 КI	P38	Нормальный	Нормальный	PASS

V2-A005	B2M KO/HLA-E KI	P42	Нормальный	Нормальный	PASS
V2-A006	B2M KO/HLA-E KI	P38	Нормальный	Нормальный	PASS
V2-A007	B2M KO/HLA-E KI	P38	Нормальный	Нормальный	PASS

Пример 7. Дифференциация редактированных человеческих эмбриональных стволовых клеток в клетки энтодермы поджелудочной железы (PEC)

[000368] **Поддержание редактированных человеческих эмбриональных стволовых клеток (ES).** Редактированные человеческие эмбриональные стволовые клетки при различных засевах (P38-42) высевали при 33000 клеток/см² для 4-дневного засева или 50000 клеток/см² для 3-дневного засева со средой hESM (DMEM/F12+10% KSR+10 нг/мл активина-А и 10 нг/мл херегулина) и конечной 10% сыворотке АВ человека.

[000369] **Агрегация редактированных человеческих эмбриональных стволовых клеток для дифференцировки в PEC.** Редактированные ES диссоциировали на отдельные клетки с помощью ACCUTASE®, а затем центрифугировали и повторно суспендировали в 2% StemPro (№ по каталогу A1000701, Invitrogen, штат калифорния, США) в среде DMEM/F12 из расчета 1 миллион клеток на мл и всего 350-400 миллионов клеток высевали в один роллерный флакон емкостью 850 см² (№ по каталогу 431198, Корнинг, штат Нью-Йорк, США) со скоростью вращения 8 оборотов в минуту ± 0,5 оборота в минуту в течение 18-20 часов перед дифференцировкой. Агрегаты ES из редактированных человеческих эмбриональных стволовых клеток дифференцировали в линии клеток поджелудочной железы с использованием роллерных флаконов, как описано в Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7 (5): e37004.

Пример 8. Характеристика дифференцированных клеток энтодермы поджелудочной железы (PEC)

[000370] **Проточная цитометрия в отношении FOXA2 и SOX17 на стадии 1 (DE) и CHGA, PDX1 и NKX6.1 на стадии PEC.** Агрегаты, полученные из hESC на стадии 1, или агрегаты клеток поджелудочной железы, полученные из hESC, промывали с помощью PBS, а затем ферментативно диссоциировали до суспензии отдельных клеток при 37°C с использованием ACCUMAX™ (№ по каталогу A7089, Sigma, Миссури, США). Добавляли буфер для разделения MACS (№ по каталогу 130-091-221, Miltenyi Biotec, Северный Рейн-Вестфалия, Германия) и суспензию пропускали через фильтр с размером пор 40 мкм и осаждали. Для окрашивания в отношении внутриклеточного маркера клетки фиксировали в течение 30 минут в 4% (вес/объем) параформальдегиде, промывали в буфере FACS (PBS, 0,1% (вес/объем) BSA, 0,1% (вес/объем) NaN₃), а затем клетки пермеабелизировали с помощью буфера Perm (PBS, 0,2% (объем/объем) Triton X-100 (№ по каталогу A16046, Alfa Aesar, штат Массачусетс, США), 5% (объем/объем) нормальной

сыворотки крои осла, 0,1% (вес/объем) NaN₃) в течение 30 минут на льду, а затем промывали промывочным буфером (PBS, 1% (вес/объем) BSA, 0,1% (вес/объем) NaN₃). Клетки инкубировали с первичными антителами (таблица 15), разбавленным блокирующим буфером (PBS, 0,1% (объем/объем) Triton X-100, 5% (объем/объем) нормальной сыворотки крои осла, 0,1% (вес/объем) NaN₃) в течение ночи при 4°C. Клетки промывали в буфере IC, а затем инкубировали с соответствующими вторичными антителами в течение 60 минут при 4°C. Клетки промывали в буфере IC, а затем в буфере для FACS. Данные проточной цитометрии получали с помощью проточного цитометра NovoCyte (ACEA Biosciences, Брюссель). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Интактные клетки идентифицировали по прямому (малый угол) и боковому (ортогональный, 90°) светорассеянию. Фон оценивали с использованием контрольных антител и недифференцированных клеток. В графических материалах показан иллюстративный график проточной цитометрии для одной из субпопуляций. Числа, представленные на графических материалах, представляют собой процент от суммарного числа клеток из ворот интактных клеток.

Таблица 15. Антитела для проточной цитометрии для характеристики дифференцированных PEC

Антиген	Флуорофор	Источник	Разбавление
SOX17	AF647	BD Bioscience (№ по каталогу 562594)	1:50
FOXA2	PE	Miltenyi Biototechnology (№ по каталогу 130-107-773)	1:10
PDX1	PE	BD Bioscience (№ по каталогу 562161)	1:2,5
NKX6,1	AF647	BD Bioscience (№ по каталогу 563338)	1:2,5
CHGA	AF405	Novus (№ по каталогу NBP2-33198AF405)	1:1000

[000371] На стадии DE популяция FOXA2 и SOX17 дважды позитивных клеток составляла более чем 90% всех клеток из дифференцированных клеток СуТ49 дикого типа. Клетки PD-L1 KI/B2M KO, HLA-E KI/B2M KO и B2M KO демонстрировали сопоставимый процент DE по сравнению с клетками дикого типа (фиг. 17А-17В и фиг. 18).

[000372] На стадии PEC проводили проточную цитометрию в отношении хромогранина (CHGA), PDX1 и NKX6.1. Гетерогенная популяция на стадии PEC включает в себя предшественников поджелудочной железы, ранние эндокринные клетки (фиг. 19). По круговой диаграмме гетерогенной популяции (фиг. 20) распределение популяций клеток из дифференцированных редактированных клеток (PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO) было очень похоже на клетки дикого типа.

[000373] **Нацеленное секвенирование РНК.** Нацеленное секвенирование РНК для анализа экспрессии генов выполняли с использованием Illumina TruSeq и настраиваемой

панели олигонуклеотидов, нацеливающихся на 111 генов. Панель в основном содержала гены, которые являются маркерами стадий развития во время дифференцировки клеток поджелудочной железы. В конце каждой стадии дифференцировки собирали 10 мкл APV (объем агрегированного осадка) и экстрагировали с использованием протокола спин-колонки Qiagen RNeasy или RNeasy 96, включающего в себя обработку ДНКазой на колонке. Количественная оценка и контроль качества выполняли либо с использованием TapeStation в сочетании с Qubit, либо с использованием Qiagen QIAxcel. 50-200 нг РНК обрабатывали в соответствии с протоколом подготовки библиотеки Illumina TruSeq, который состоит из синтеза cDNA, гибридизации пула специально созданных олигонуклеотидов, отмывки, удлинения, лигирования связанных олигонуклеотидов, ПЦР-амплификации библиотек и очистки библиотек перед количественной оценкой и контролем качества полученных библиотек dsDNA либо с использованием TapeStation в сочетании с Qubit, либо с использованием Qiagen QIAxcel. Затем библиотеки разбавляли до концентрации 4 нМ и объединяли с последующей денатурацией, добавлением контроля PhiX и дальнейшим разбавлением до 10-12 пМ перед загрузкой в секвенатор Illumina MiSeq. После цикла секвенирования выполняли начальный анализ данных автоматически с помощью BaseSpace, генерирующего необработанные подсчеты чтений для каждого из специально созданных зондов. Для каждого гена эти подсчеты чтений затем суммировали для всех зондов, соответствующих этому гену, с добавлением 1 подсчета чтений (для предотвращения последующих делений на 0). Нормализацию выполняли по гену SF3B2 и считывания обычно визуализировали как кратное изменение по сравнению со стадией 0. Когда данные обрабатывали для анализа главных компонентов, нормализацию выполняли с использованием способа DEseq. Экспрессия выбранных генов показан в на фиг. 21. Кинетический паттерн экспрессии FOXA2, CHGA, PDX1 и NKX6.1 клетками PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO был подобен клеткам дикого типа.

[000374] **Подтверждение экспрессии B2M и PD-L1 на стадии PEC.** На стадии PEC дифференцированные агрегаты стимулировали с помощью или без гамма-интерферона (50 нг/мл) в течение 48 часов. Агрегаты промывали PBS, а затем ферментативно диссоциировали до суспензии отдельных клеток при 37°C с использованием ACCUMAX™ (№ по каталогу A7089, Sigma, штат Миссури, США). Добавляли буфер для разделения MACS (№ по каталогу 130-091-221, Miltenyi Biotec, Северный Рейн-Вестфалия, Германия) и суспензию пропускали через фильтр с размером пор 40 мкм и осаждали. Для окрашивания в отношении поверхностного маркера диссоциированные клетки инкубировали с флуоресцентно-конъюгированным антителом, разбавленным буфером для разделения MACS, в течение 20 минут, а затем промывали в буфере для разделения MACS. Клетки повторно суспендировали в буфере для FACS для обеспечения текучести. Данные проточной цитометрии получали с помощью проточного цитометра NovoCyte. Как показано на фиг. 22A-22F, экспрессия B2M была ниже предела выявления в PEC, дифференцированных из PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO, а PDL1 экспрессировался в PEC, дифференцированных из клеток PD-L1 KI/B2M KO.

[000375] **Иммунный фенотип клеток PEC.** На стадии PEC дифференцированные агрегаты стимулировали с помощью или без гамма-интерферона (50 нг/мл) в течение 48 часов. Агрегаты собирали для окрашивания в отношении МНС класса I и II. Экспрессия МНС класса II отсутствовала на стадии PEC в клетках дикого типа или редактированных клетках (клеток PD-L1 KI/B2M KO и B2M KO) (фиг. **23D-23F**). Экспрессия HLA-ABC (МНС класса I) была низкой (1,3% клеток дикого типа) и в высокой степени регулировалась при стимуляции IFN- γ . Однако HLA-ABC не экспрессировался даже при стимуляции IFN- γ редактированными клетками (клетками PD-L1 KI/B2M KO и B2M KO) (фиг. **23A-23C**).

Пример 9. Анализ активации/пролиферации T-клеток

[000376] Дифференцированные из PEC клетки тестировали на их способность запускать иммунный ответ с помощью *in vitro* анализов активации/пролиферации человеческих T-клеток. Свежие PBMC доноров приобретали в компании Nemascare и CD3⁺ T-клетки очищали с использованием набора для выделения всех T-клеток для человека (Miltenyi, № по каталогу 130-096-535). Выделенные T-клетки метили с помощью протокола набора для пролиферации клеток CellTrace™ CFSE (Thermofisher, № по каталогу C34554) в соответствии с инструкциями производителя и совместно инкубировали с дифференцированной PEC в течение 5 дней. Использовали Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 для размножения и активации T-клеток (Thermofisher, № по каталогу 11161D) в качестве положительного контроля для активации T-клеток. T-клетки отдельно метили с помощью CFSE и использовали в качестве отрицательного контроля. Процент CD3⁺ CFSE⁺ клеток измеряли для оценки процента пролиферации T-клеток (фиг. **24A-24D**). PEC WT запускали пролиферацию T-клеток, превышающую таковую в контроле в виде T-клеток отдельно. Полученные из B2M KO и B2M KO/PD-L1 KI CyT49 PEC не запускали пролиферацию T-клеток, превышающую таковую в контроле в виде T-клеток отдельно, что свидетельствует о гипоиммуногенной природе редактированных клеток.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения универсальной донорской клетки, при этом способ предусматривает осуществление генетического модифицирования клетки посредством введения делеции и/или вставки по меньшей мере одной пары оснований в геном клетки по сайту в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и

введения в геном клетки вставки из по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте из (i), с получением тем самым универсальной донорской клетки.

2. Способ получения универсальной донорской клетки, при этом способ предусматривает осуществление генетического модифицирования клетки посредством

введения делеции и/или вставки по меньшей мере одной пары оснований в геном клетки по сайту в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и

введения в геном клетки вставки из по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, в локус типа "safe harbor", с получением тем самым универсальной донорской клетки.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенным ускользанием от иммунного надзора и/или повышенной выживаемостью клетки по сравнению с немодифицированной клеткой.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где по меньшей мере один ген, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II или компонент или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, представляет собой ген МНС-I, выбранный из HLA-A, HLA-B или HLA-C, ген МНС-II, выбранный из HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ или HLA-DR, или ген, выбранный из B2M, NLRC5, СИТА, RFX5, RFXAP или RFXANK.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере один полинуклеотид, который кодирует толерогенный фактор, представляет собой один или несколько полинуклеотидов, которые кодируют один или несколько из PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где по меньшей мере один полинуклеотид, который кодирует толерогенный фактор, функционально связан с экзогенным промотором.

7. Способ по п. 6, где экзогенный промотор является конститутивным, индуцируемым, временным, тканеспецифическим или клеточноспецифическим промотором, при этом экзогенный промотор необязательно представляет собой промотор CMV, EFla, PGK, CAG или UBC.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где делецию и/или вставку из (i) осуществляют в пределах или рядом с B2M, и при этом вставка из (ii) представляет собой полинуклеотид, кодирующий PD-L1 или HLA-E.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где способ дополнительно предусматривает введение по меньшей мере одной генетической модификации, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии по меньшей мере фактора выживания по сравнению с немодифицированной клеткой.

10. Способ по п. 9, где по меньшей мере одна генетическая модификация, которая обеспечивает повышение или снижение экспрессии по меньшей мере фактора выживания, представляет собой вставку полинуклеотида, который кодирует MANF, что обеспечивает повышение экспрессии MANF по сравнению с немодифицированной клеткой; или делецию и/или вставку по меньшей мере одной пары оснований в пределах гена, который кодирует ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK, или рядом с ним, что обеспечивает снижение или устранение экспрессии ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK по сравнению с немодифицированной клеткой.

11. Способ по п. 10, где вставку полинуклеотида, который кодирует MANF, осуществляют в локус типа "safe harbor" или в ген, относящийся к MHC-I, MHC-II или регулятору транскрипции MHC-I или MHC-II.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где генетическое модифицирование предусматривает доставку по меньшей мере одной РНК-направляемой эндонуклеазной системы в клетку.

13. Способ по п. 12, где по меньшей мере одна РНК-направляемая эндонуклеазная система представляет собой систему CRISPR, содержащую CRISPR-нуклеазу и направляющую РНК.

14. Способ по п. 13, где CRISPR-нуклеаза представляет собой Cas9, Cpf1, их гомолог, их модифицированный вариант, их кодон-оптимизированный вариант или любую их комбинацию.

15. Способ по п. 13 или п. 14, где CRISPR-нуклеаза представляет собой Cas9 из *S. pyogenes*.

16. Способ по любому из пп. 13-15, где CRISPR-нуклеаза содержит N-концевой сигнал ядерной локализации (NLS) и/или C-концевой NLS.

17. Способ по любому из пп. 13-16, где CRISPR-нуклеаза и направляющая РНК присутствуют при соотношении по весу 1:1.

18. Способ по любому из п. 1 или пп. 3-17, где делецию и/или вставку из (i) осуществляют в пределах локуса гена B2M или рядом с ним, и при этом вставка из (ii) представляет собой полинуклеотид, кодирующий PD-L1.

19. Способ по п. 18, где направляющая РНК, используемая для осуществления (i) и (ii), содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну из последовательностей под SEQ ID NO: 1-3 или SEQ ID NO: 35-44.

20. Способ по п. 18 или п. 19, где полинуклеотид, кодирующий PD-L1, фланкирован (а) нуклеотидной последовательностью, характеризующейся гомологией последовательности с участком, расположенным слева от сайта из (i), и (b) нуклеотидной последовательностью, характеризующейся гомологией последовательности с участком, расположенным справа от сайта из (i).

21. Способ по п. 20, где вставку полинуклеотида, кодирующего PD-L1, осуществляют в локус гена B2M в пределах 50 пар оснований сайта из (i).

22. Способ по п. 20 или п. 21, где (а) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 13, и (b) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 19.

23. Способ по любому из пп. 18-22, где полинуклеотид, кодирующий PD-L1, функционально связан с экзогенным промотором, где экзогенный промотор необязательно представляет собой промотор CAG.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где клетка представляет собой клетку млекопитающего, где клетка необязательно представляет собой клетку человека.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где клетка представляет собой стволовую клетку.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (PSC), эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гематопозитическую стволовую и клетку-предшественника (HSPC).

27. Способ по любому из пп. 1-24, где клетка представляет собой дифференцированную клетку или соматическую клетку.

28. Способ по любому из пп. 1-24, где универсальная донорская клетка способна дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

29. Способ по п. 28, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой энтодермальные предшественники поджелудочной железы, эндокринные предшественники поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки или нервные клетки-предшественники.

30. Способ по п. 28, где полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы.

31. Совокупность универсальных донорских клеток, полученных посредством способа по любому из пп. 1-30.

32. Совокупность универсальных донорских клеток по п. 31, поддерживаемых в течение времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки подверглись дифференцировке.

33. Композиция, содержащая клетки, которые характеризуются:

(i) по меньшей мере одной делецией в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II или компоненты или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним; и

(ii) по меньшей мере одной вставкой полинуклеотида, который кодирует по меньшей мере один толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом генетической делеции из (i) или содержится в нем.

34. Способ, предусматривающий введение субъекту совокупности универсальных донорских клеток по п. 31 или п. 32.

35. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает

получение или обеспечение получения совокупности универсальных донорских клеток по п. 31 или п. 32 после дифференцировки в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки и

введение линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток субъекту.

36. Способ получения клеток для введения субъекту, нуждающемуся в этом, при этом способ предусматривает:

(i) получение или обеспечение получения универсальных донорских клеток по п. 31 или п. 32 и

(ii) поддержание универсальных донорских клеток в течение времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки дифференцировались в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

37. Способ по п. 35 или п. 36, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой энтодермальные предшественники поджелудочной железы, эндокринные предшественники поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки или нервные клетки-предшественники.

38. Способ по п. 35 или п. 36, где полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы.

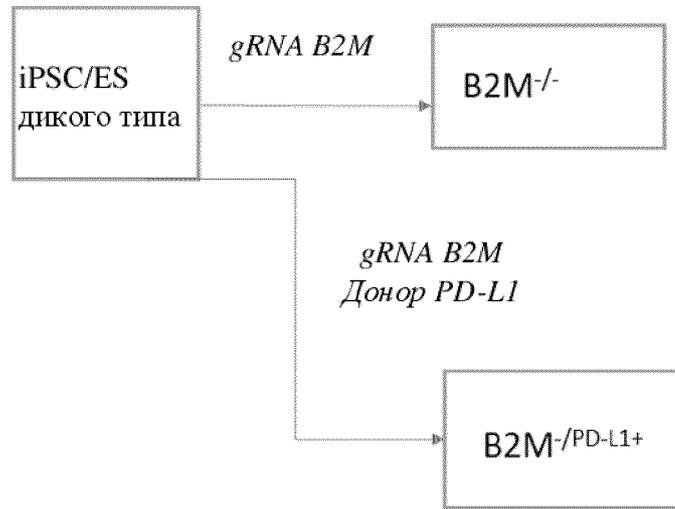
39. Способ по любому из пп. 34-38, где субъект представляет собой человека, у которого имеется заболевание, с подозрением на его наличие или у которого имеется риск возникновения заболевания.

40. Способ по п. 39, где заболевание представляет собой генетически наследуемое заболевание.

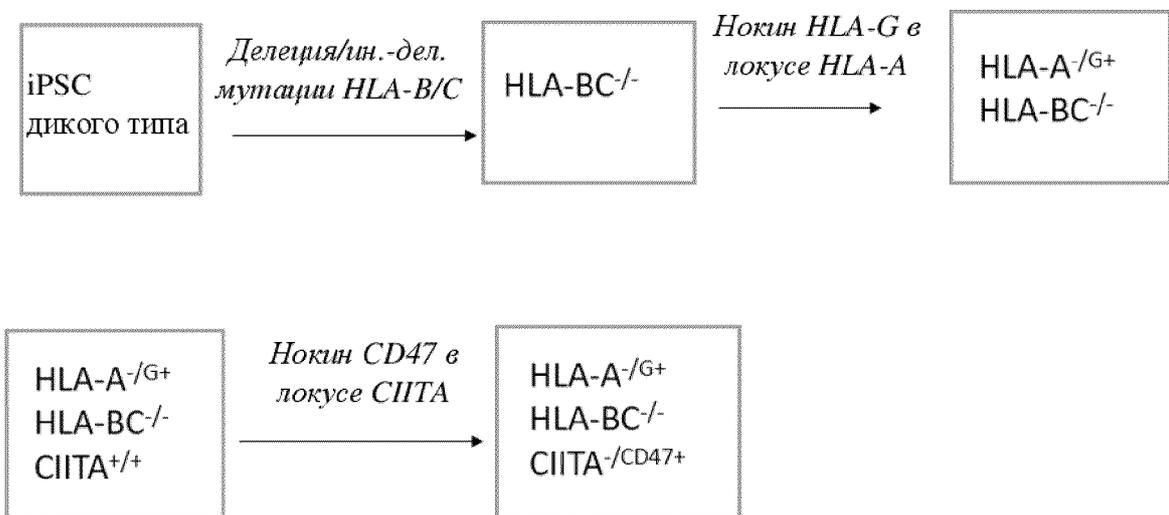
По доверенности

	Нейронные клетки	Клетки поджелудочной железы	Другие направления дифференцировки
Примеры мишеней	<i>Нокаут B2M</i> <i>Слияние B2M/HLA-G с нокином</i>	<i>Нокаут B2M</i> <i>Нокаут СИТА</i> <i>Нокин PD-L1</i> <i>Нокин CTLA4-Ig</i>	<i>Нокаут HLA-ABC</i> <i>Нокин HLA-G</i> <i>Нокаут СИТА</i> <i>Нокин CD47</i>
Другие мишени/промоторы	<i>Гены, которые необходимы для выживания клеток</i> <i>Переключатели на самоубийство: HSV-tk, iCaspase9</i> <i>Промоторы: конститутивные промоторы, клеточноспецифические промоторы, эндогенные промоторы</i>		

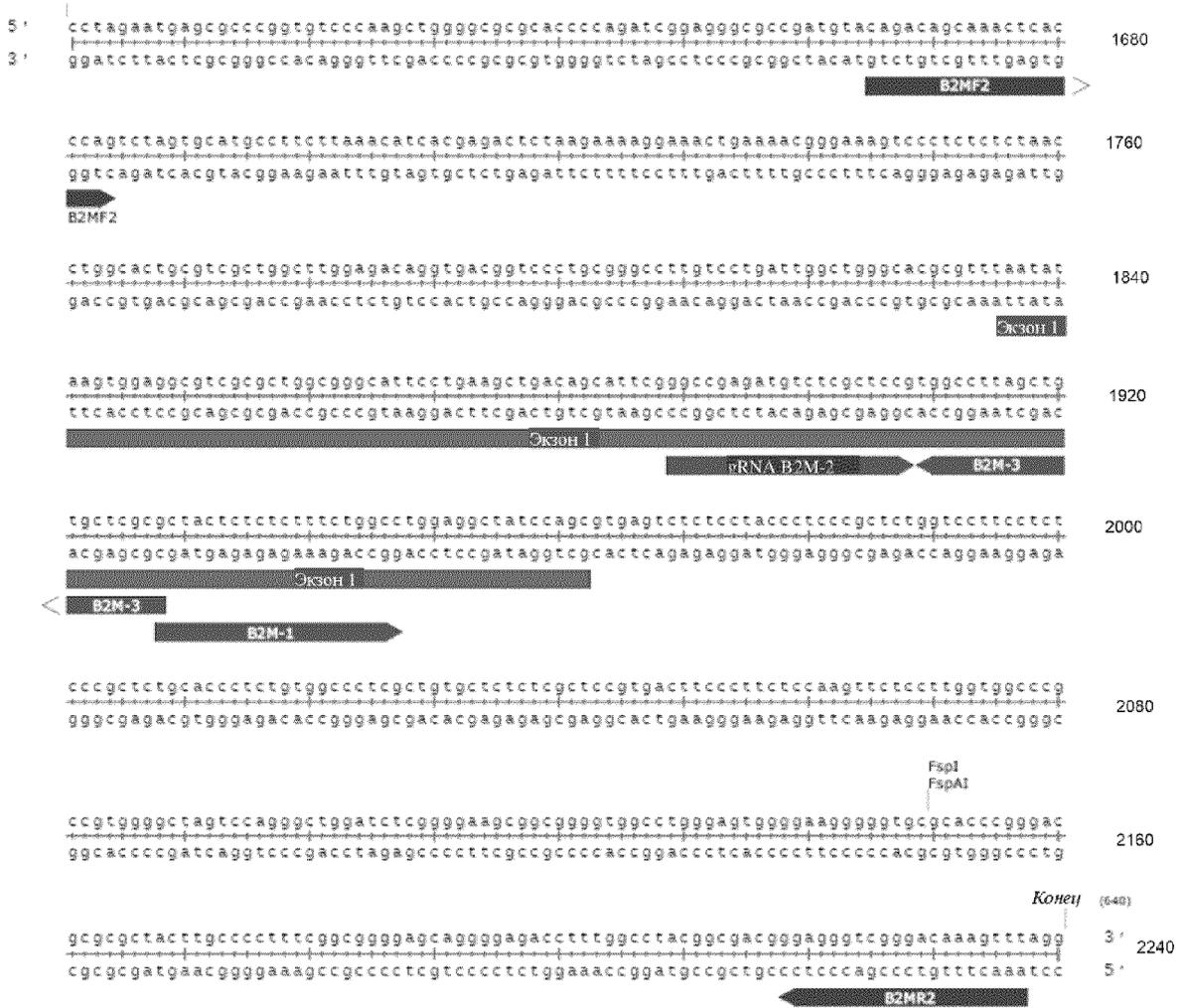
ФИГ. 1А



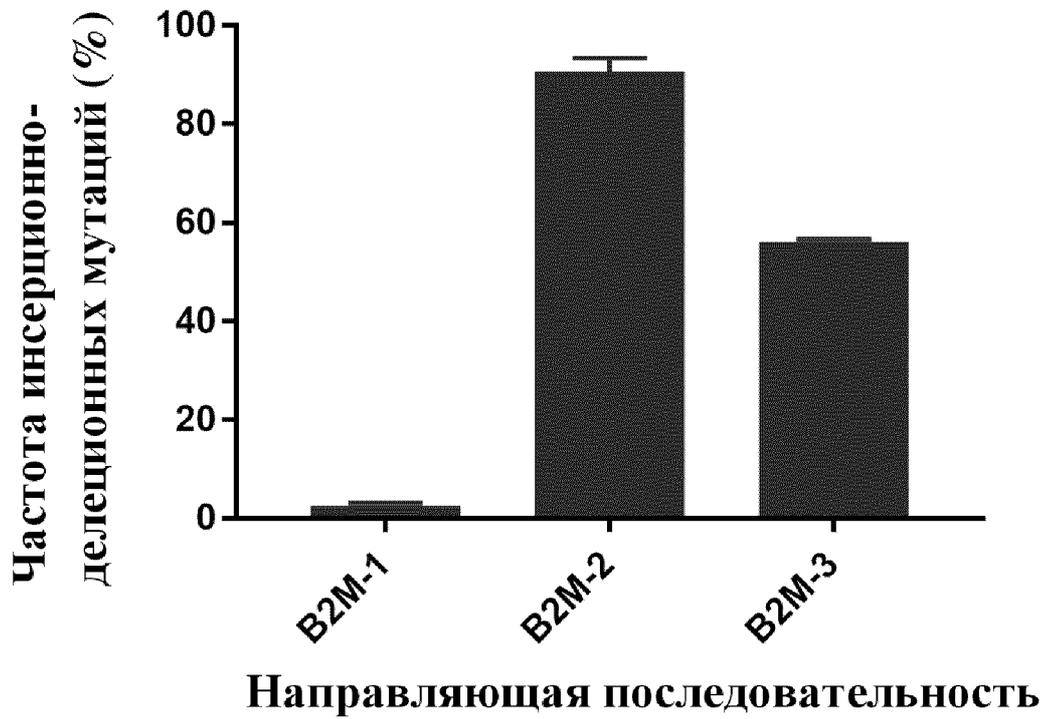
ФИГ. 1В



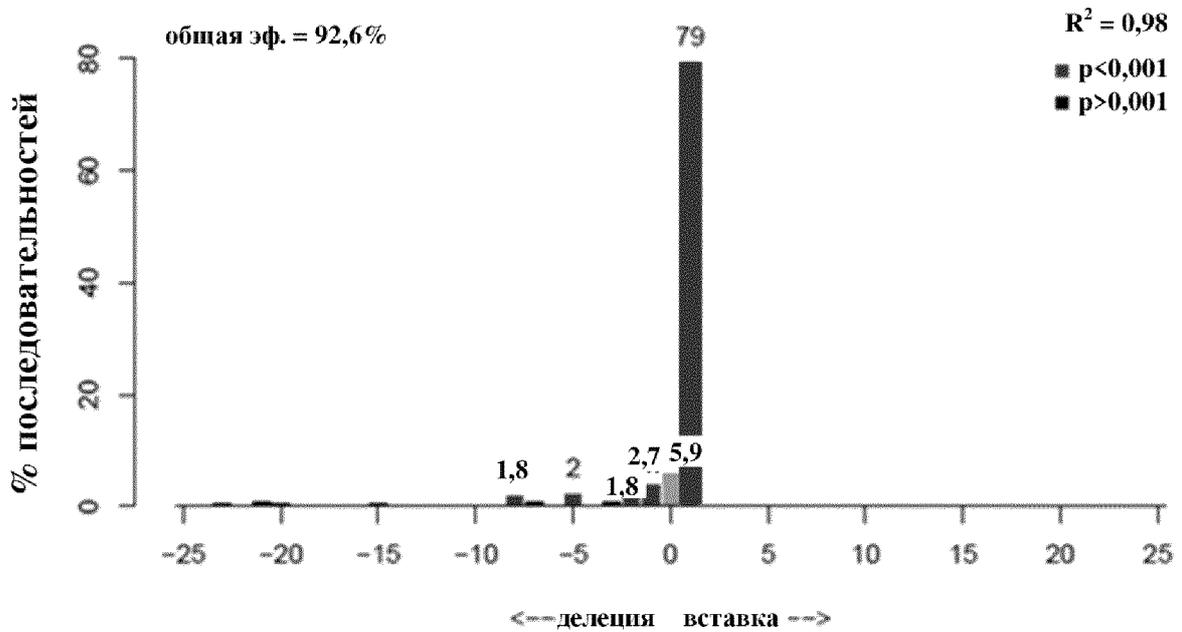
ФИГ. 1С



ФИГ. 2

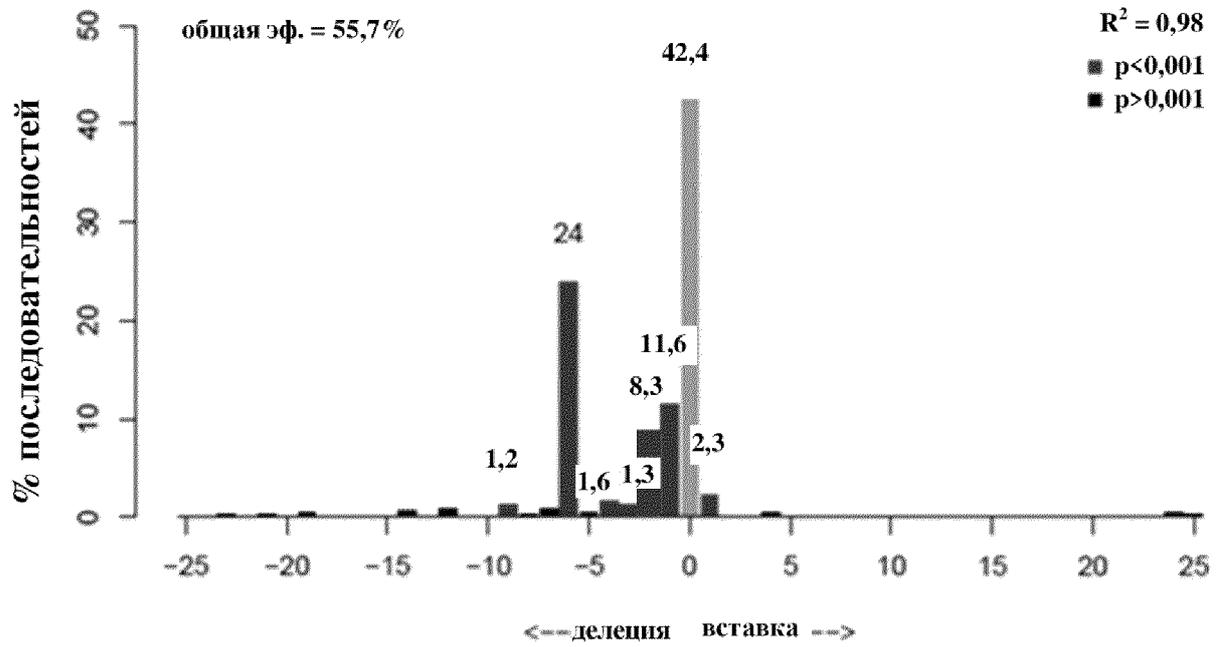


ФИГ. 3А

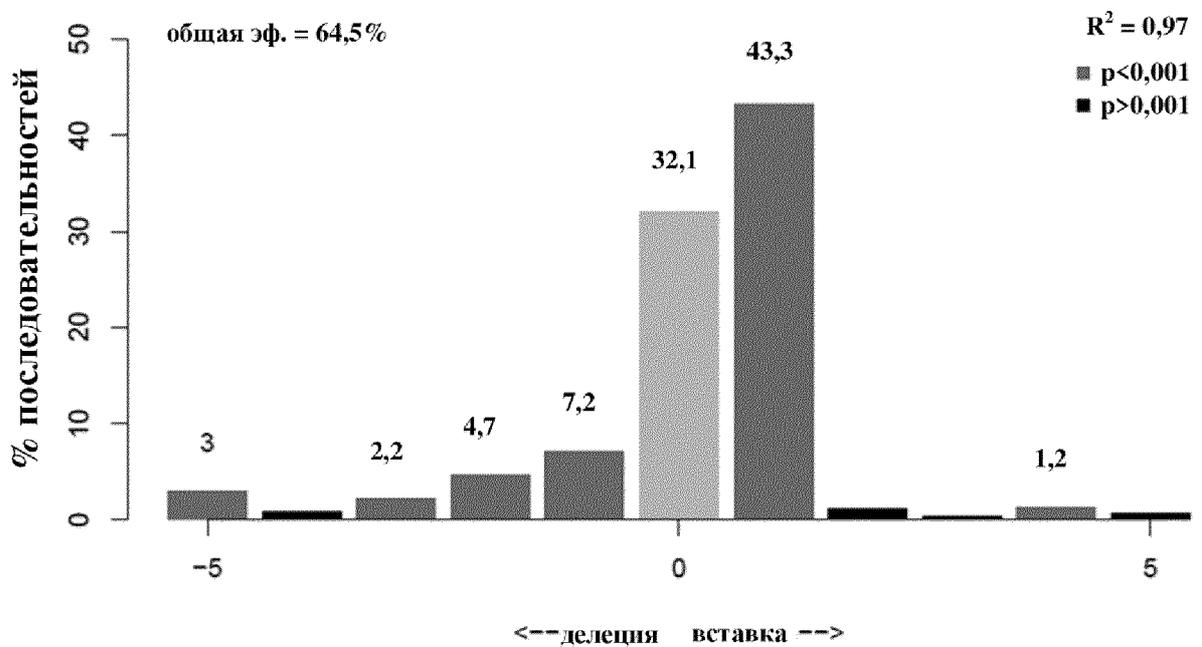


ФИГ. 3В

5/42



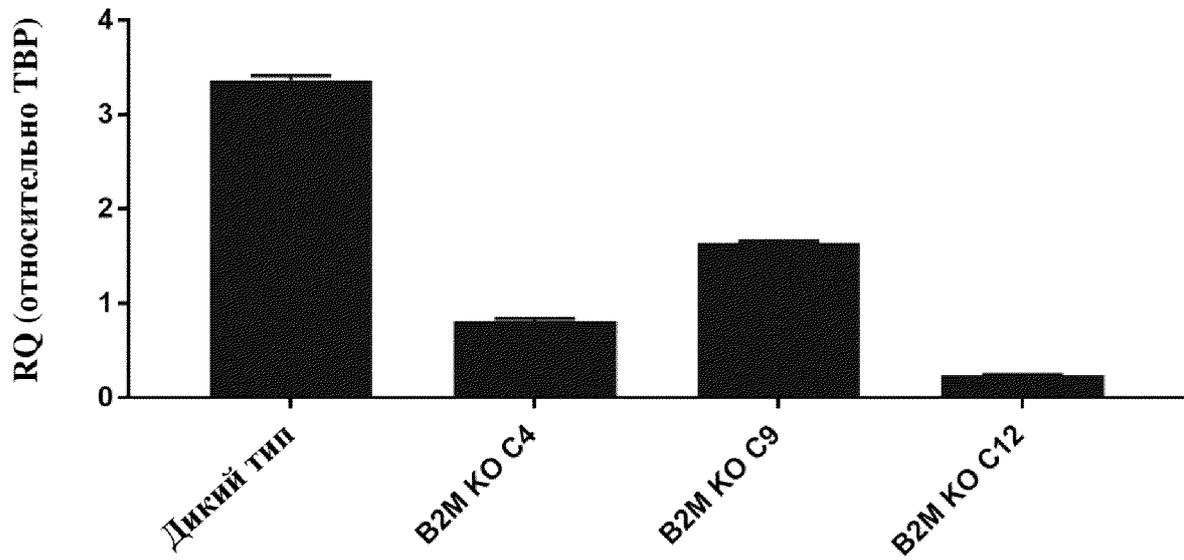
ФИГ. 3С



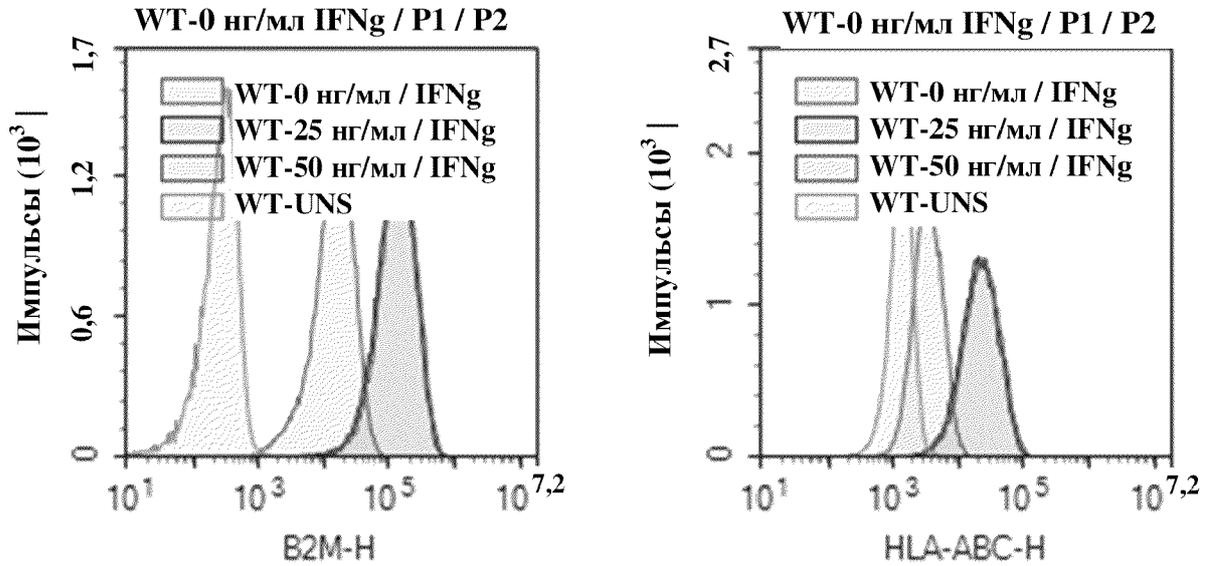
ФИГ. 4А

B2M KO Homo		B2M KO Hets	
Клон	Профиль	Клон	Профиль
A9	+2/+2	A5	+1/-28
A11	+1/+1	B2	-1/-21
B10	-36/-36	B4	+1/-23
B12	+1/+1	B8	-4/-5
C5	-23/-23	B9	+1/+14
C9	-1/-1	C2	+1/-5
C11	+1/+1	C4	+1/-1
C12	+1/+1		

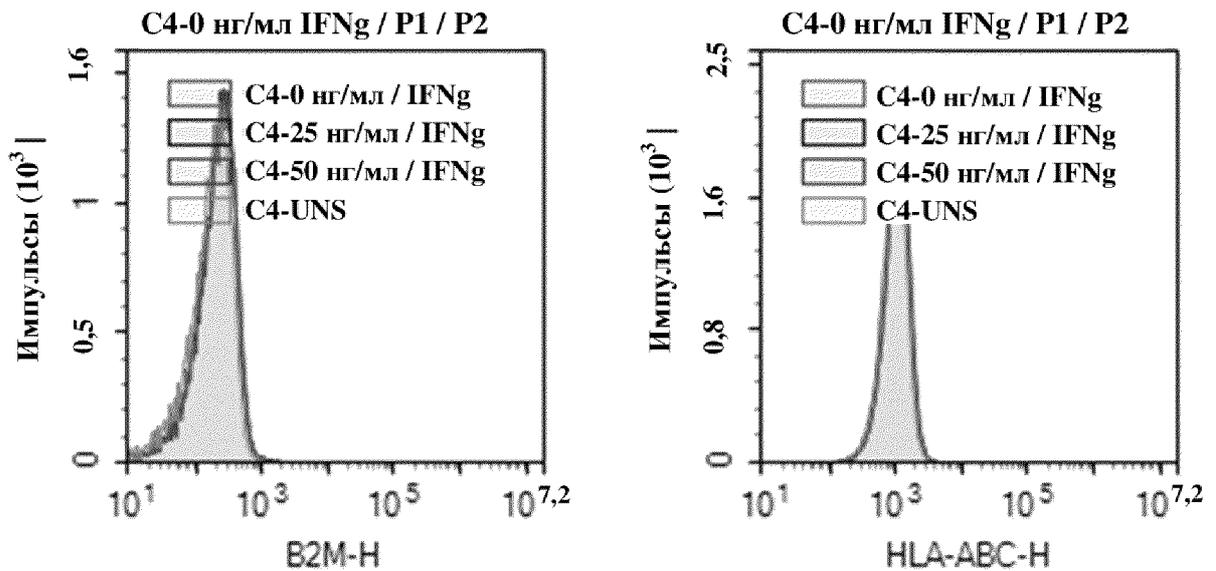
ФИГ. 4В



ФИГ. 5

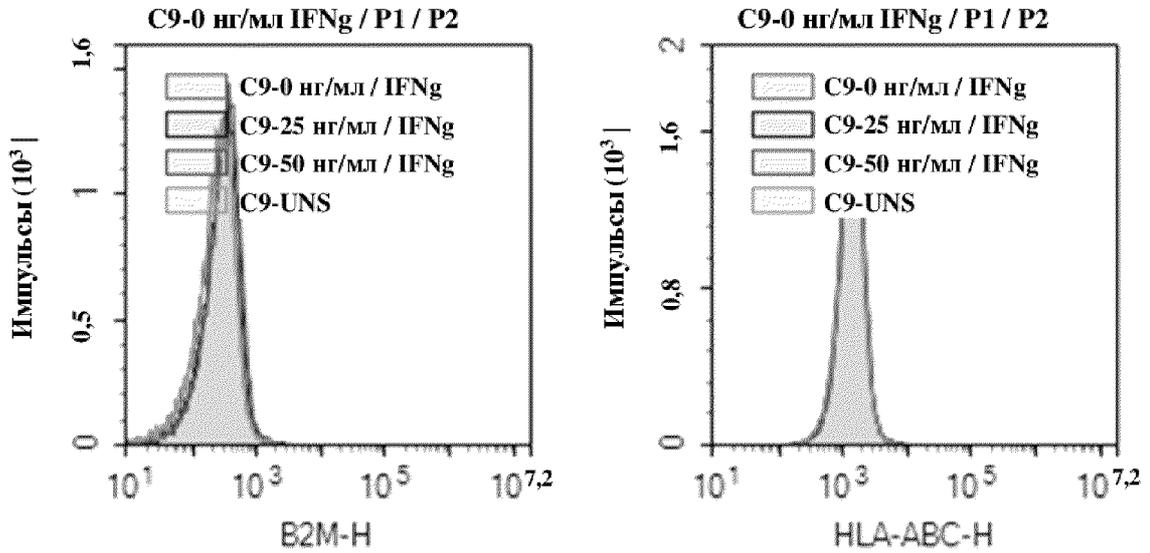
Дикий тип

ФИГ. 6А

Нокаут B2M C4

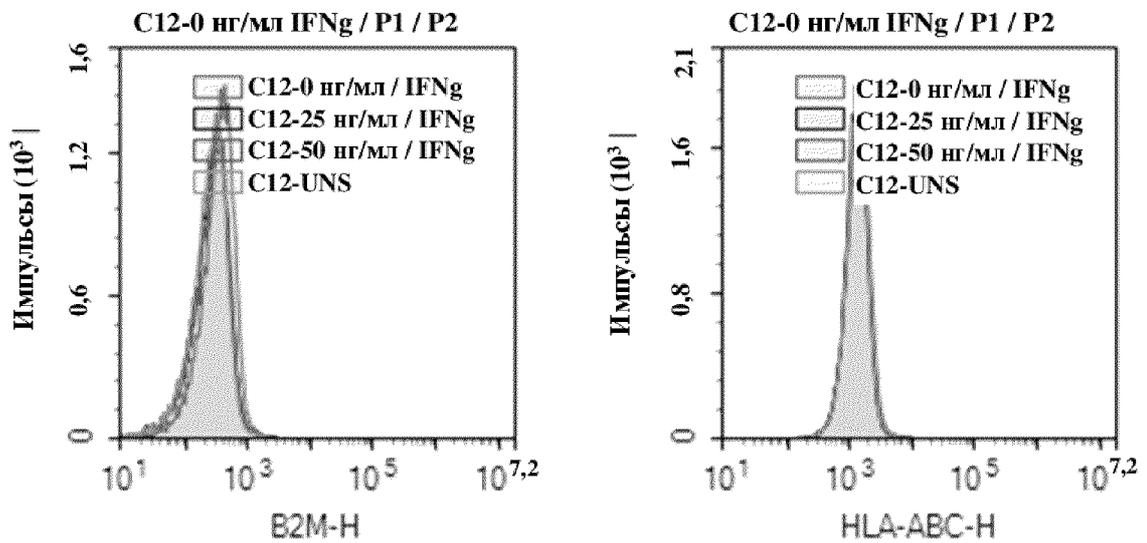
ФИГ. 6В

Нокаут B2M C9



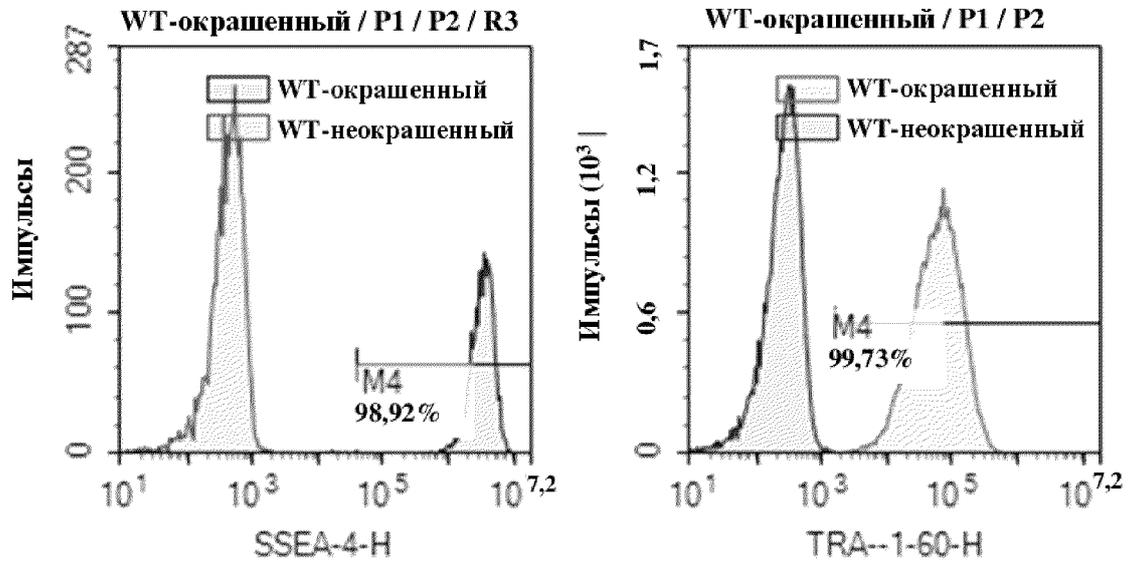
ФИГ. 6С

Нокаут B2M C12



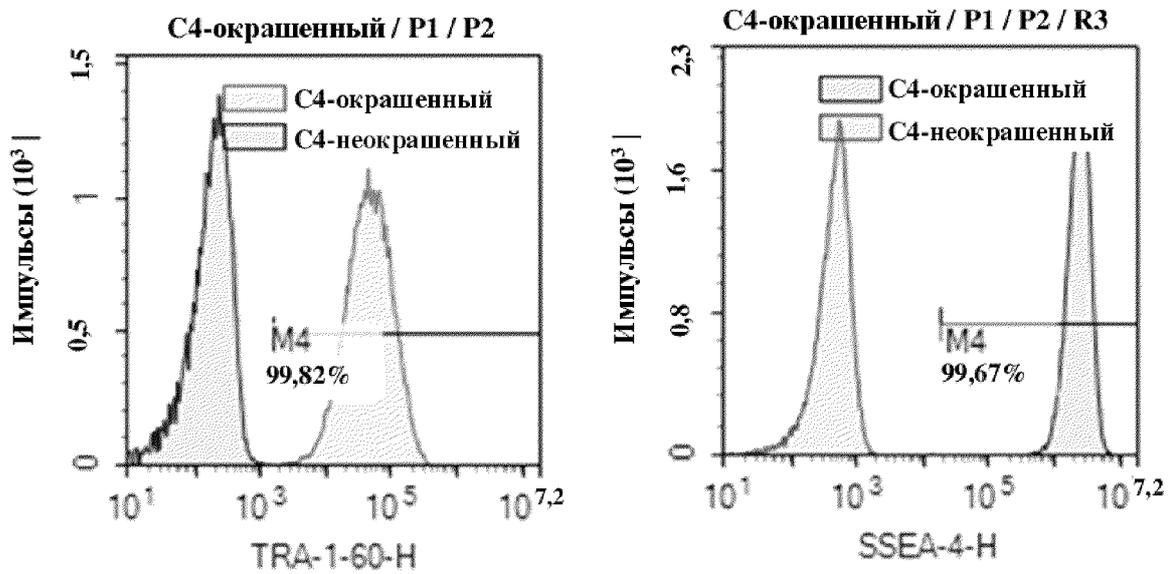
ФИГ. 6D

Дикий тип



ФИГ. 7А

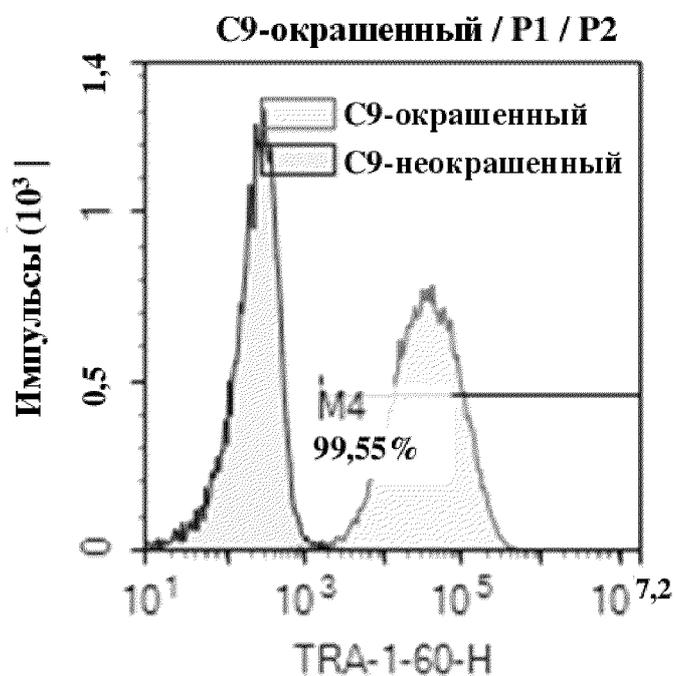
Нокаут В2М С4



ФИГ. 7В

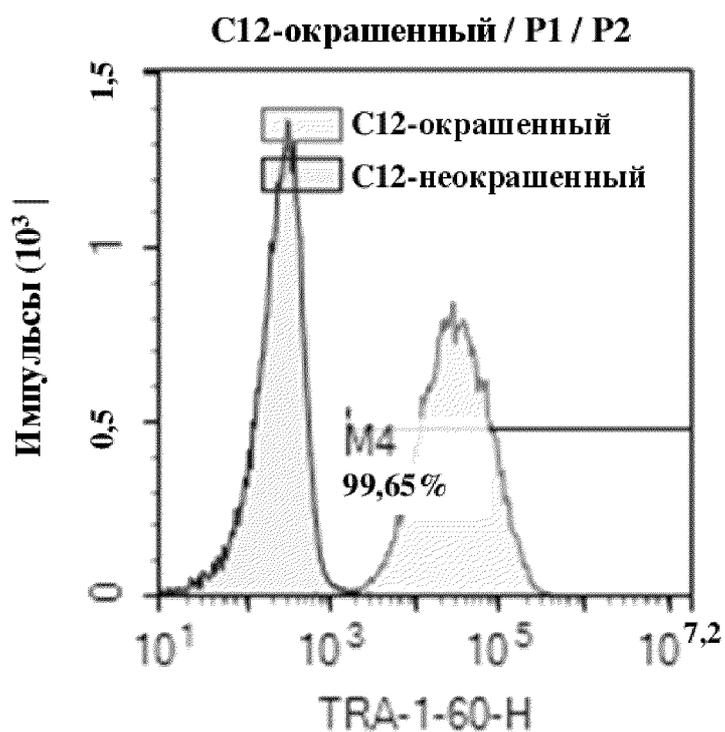
10/42

Нокаут В2М С9



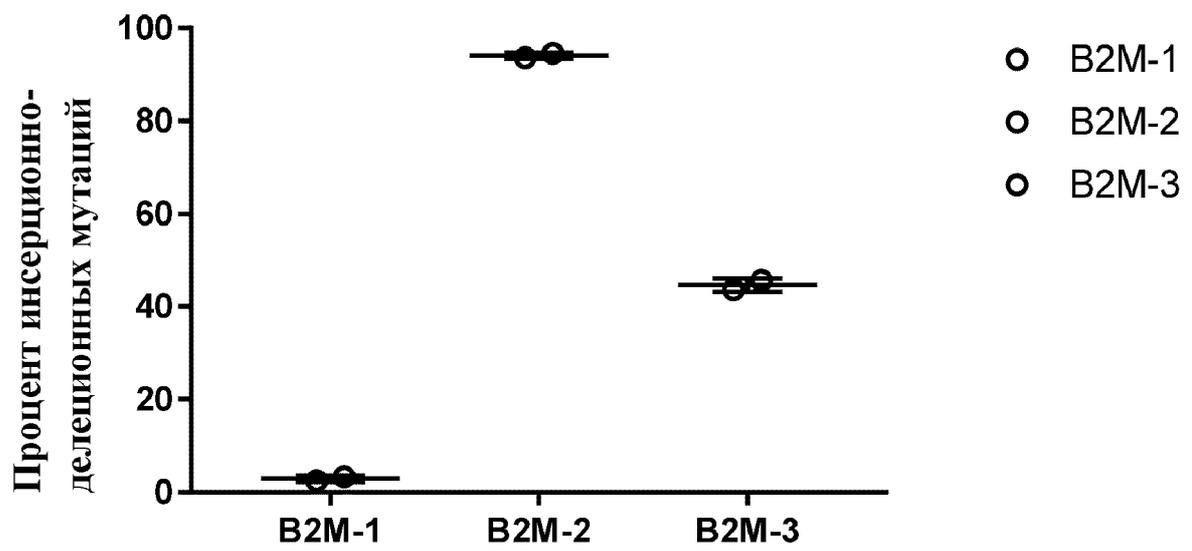
ФИГ. 7С

Нокаут В2М С12



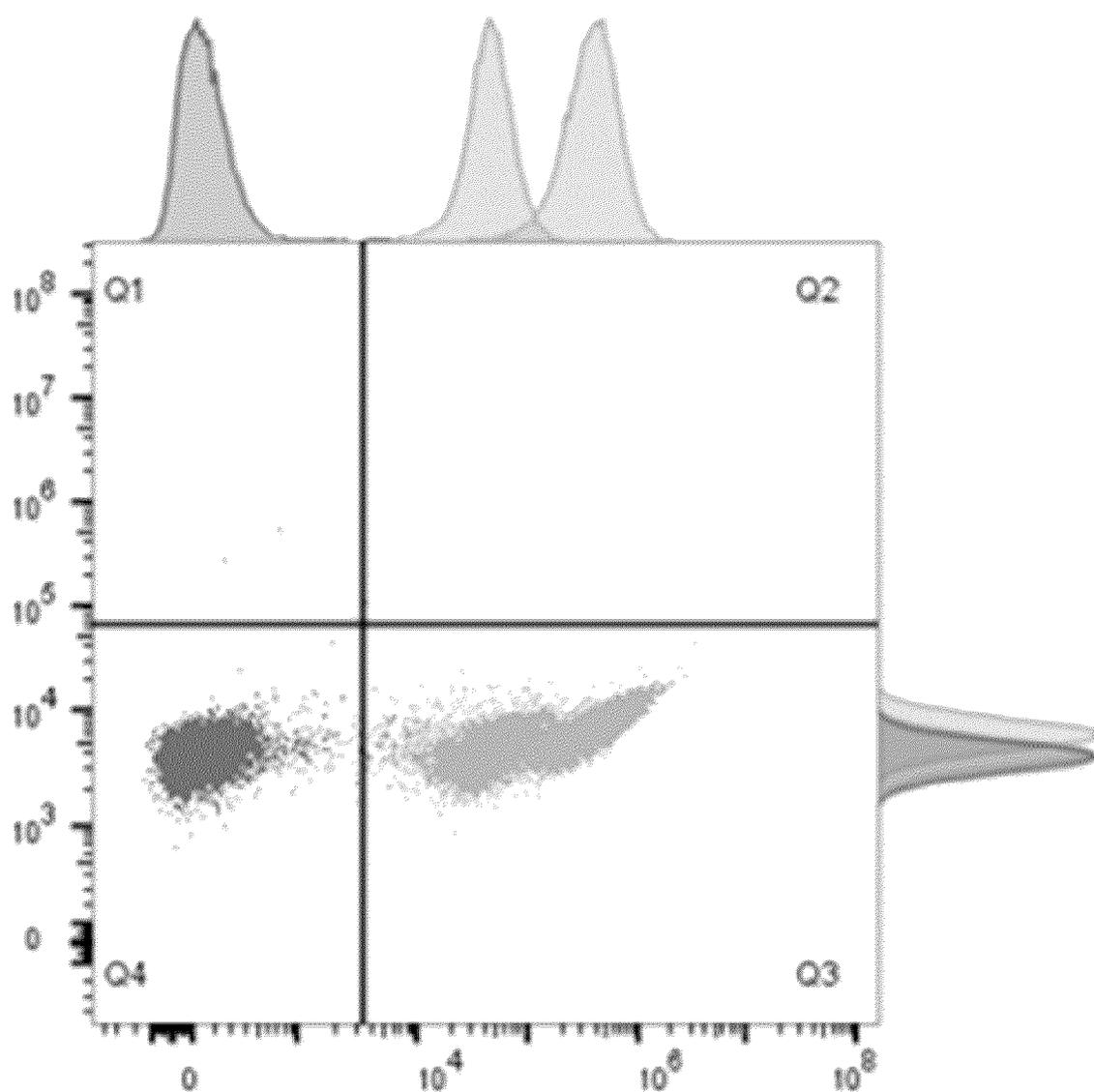
ФИГ. 7D

Эффективность разрезания gRNA B2M в СуТ49



ФИГ. 8

CYT49 WT BIO-1

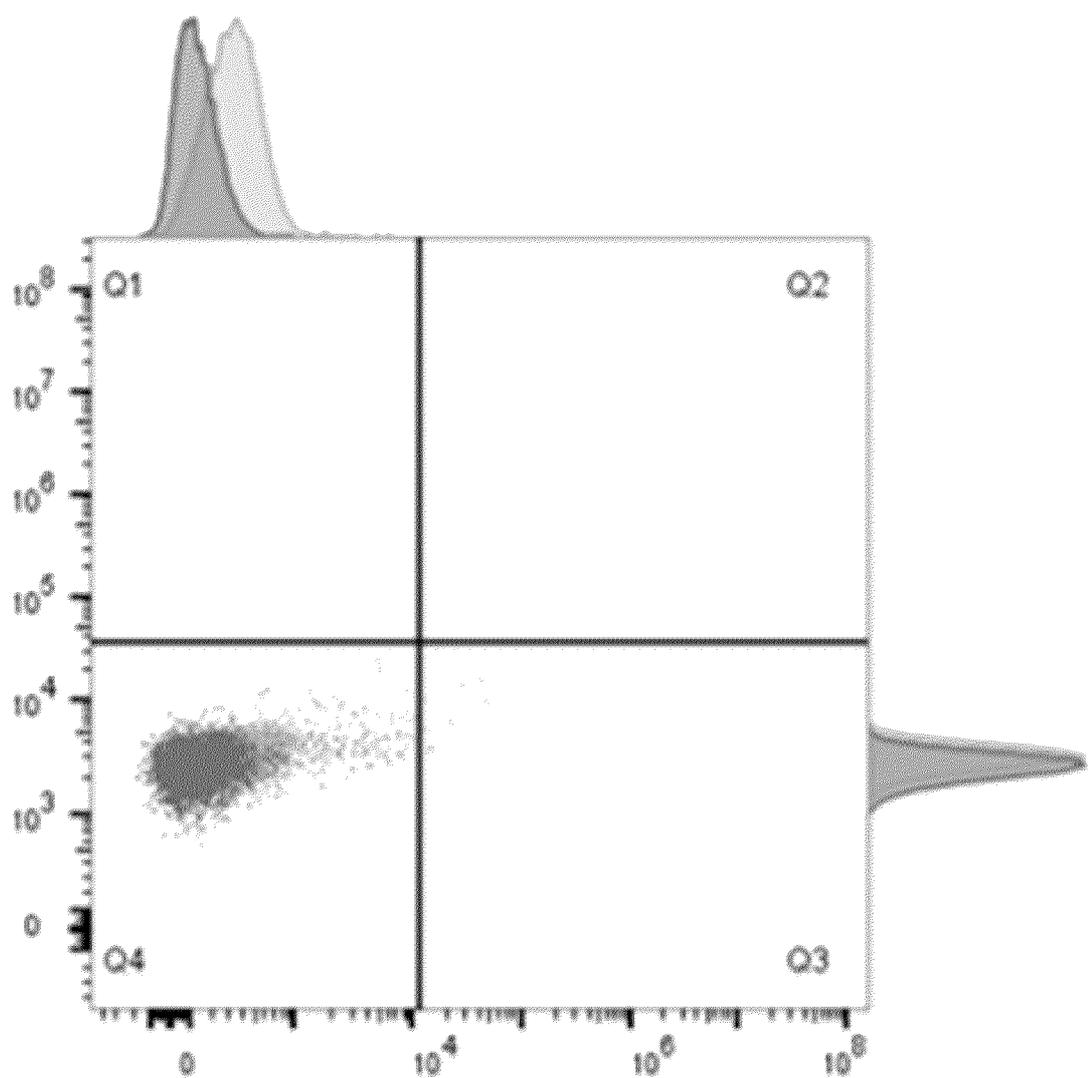


Экспрессия В2М

	Примечания для рабочей зоны
■	Контроль IGG
■	50 нг INTG-1
■	NT-1

ФИГ. 9А

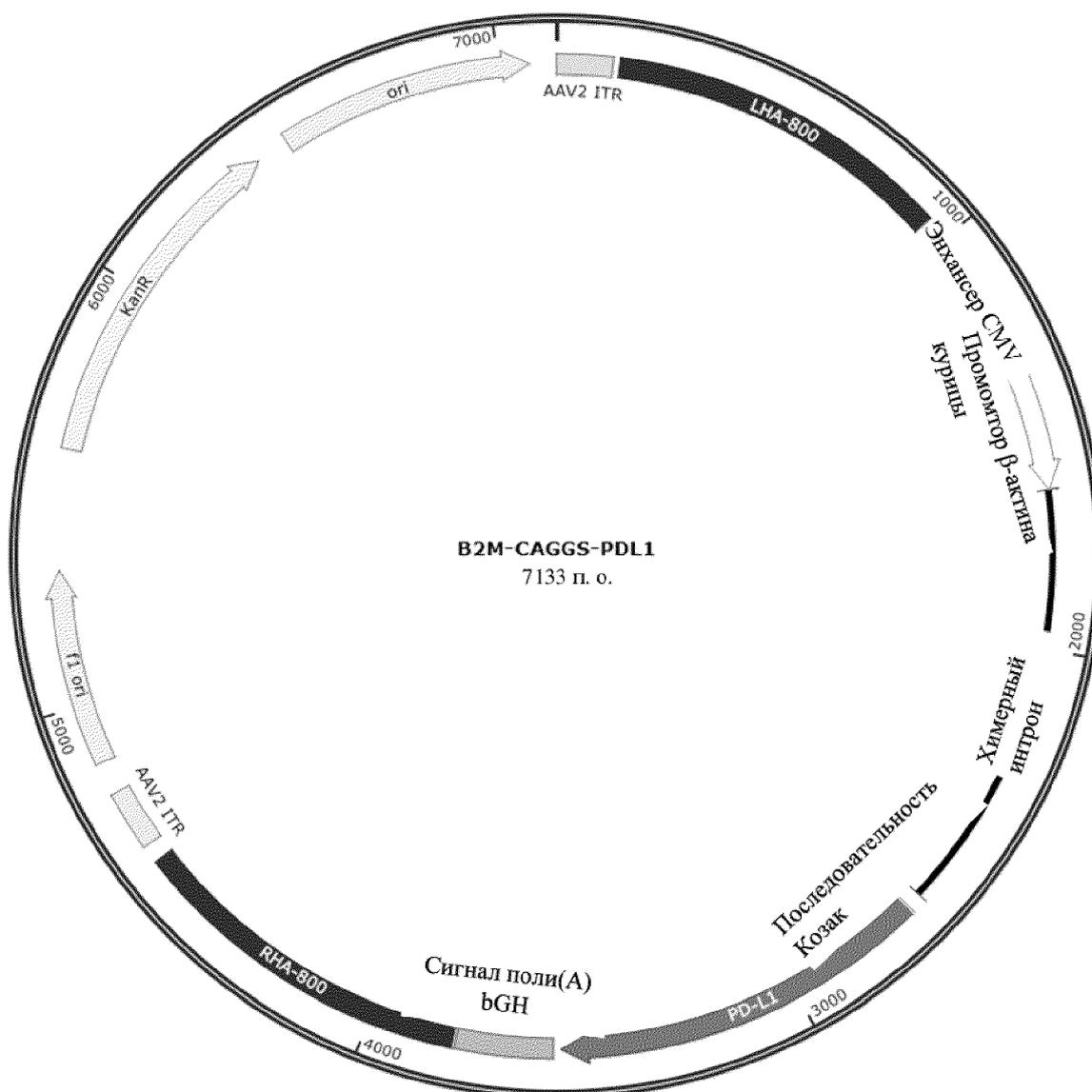
B2M-KO-1 BIO-1



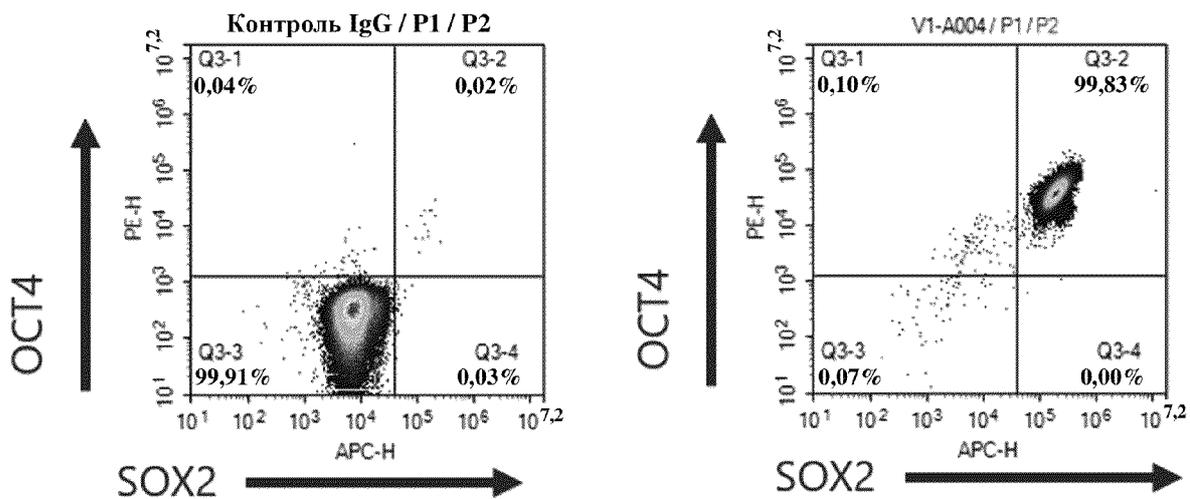
Экспрессия B2M

	Примечания для рабочей зоны
■	Контроль IGG
■	50 нг INTG-1
■	NT-1

ФИГ. 9В

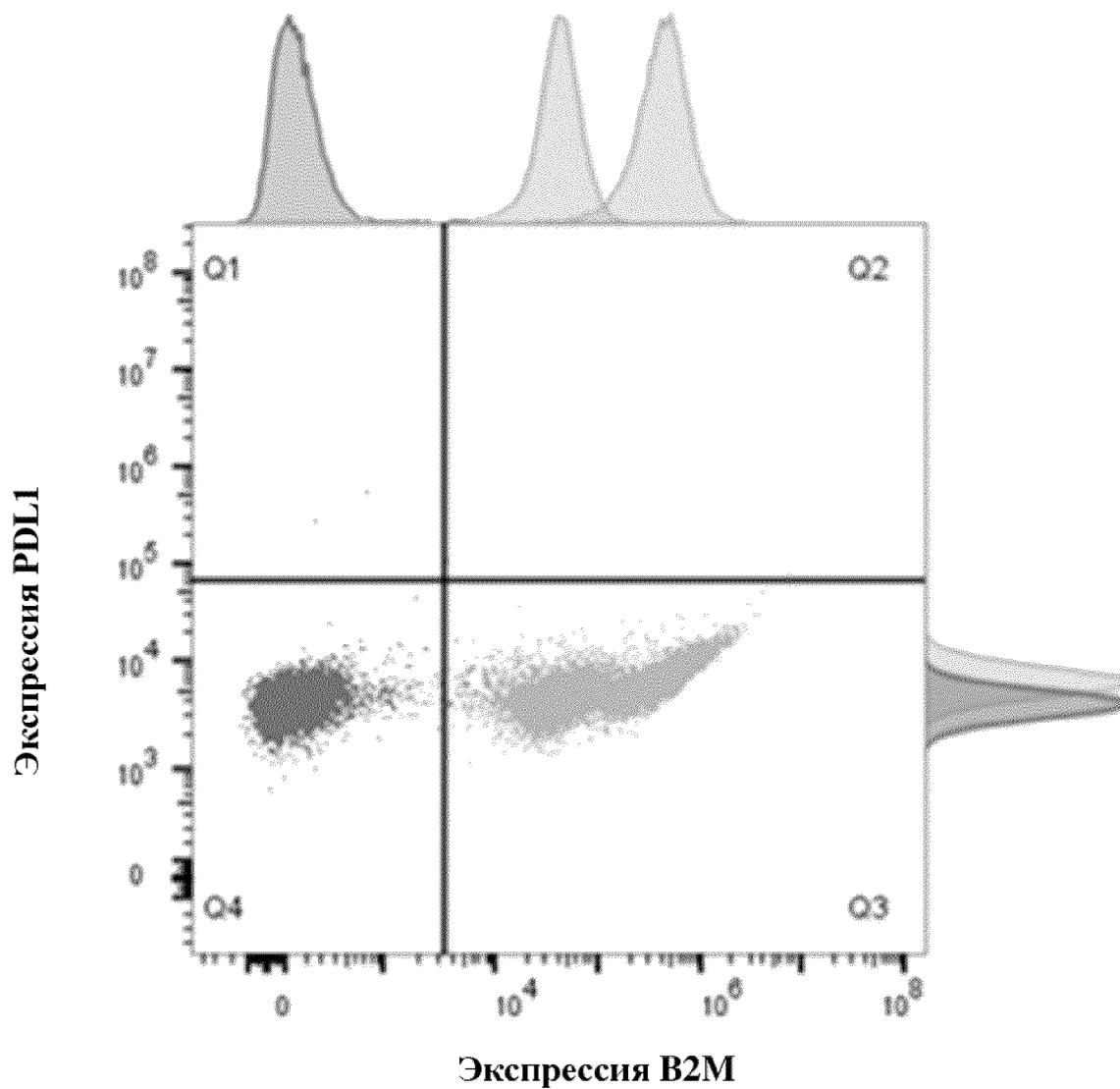


ФИГ. 10



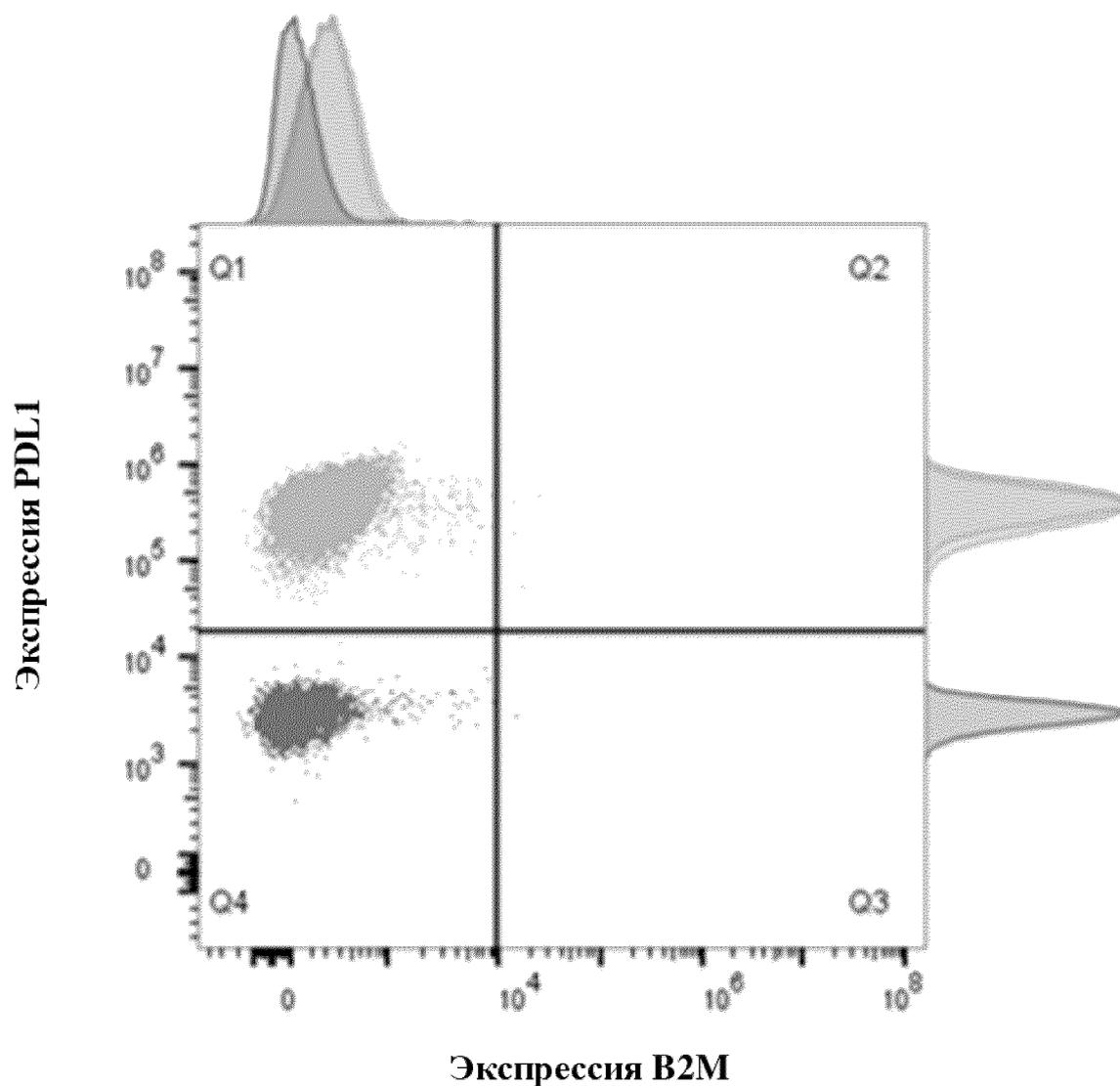
ФИГ. 11

CYT49 WT BIO-1



ФИГ. 12А

B2M KO PDL1 KI

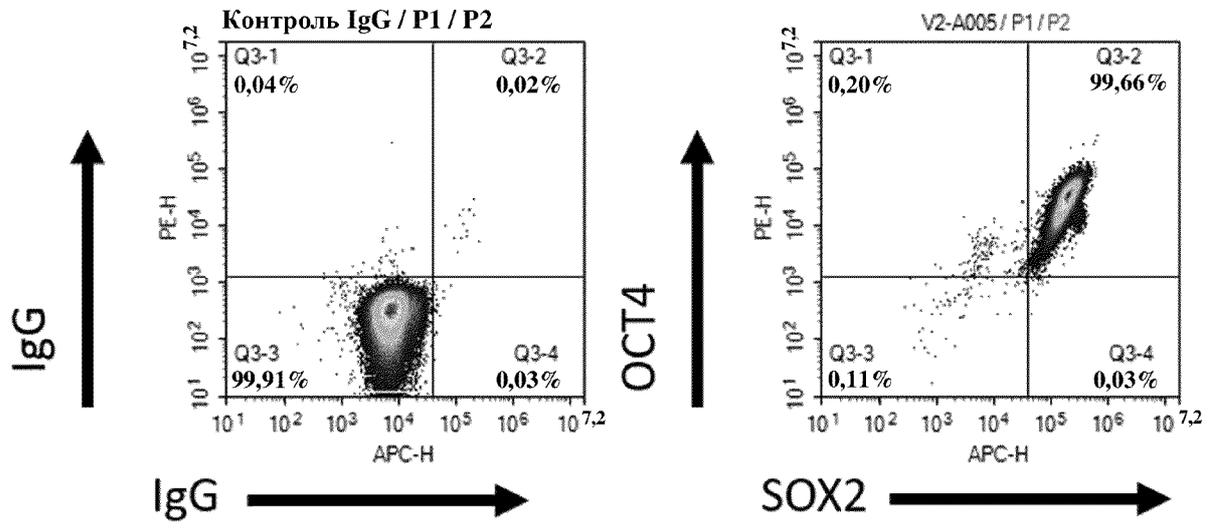


	Примечания для рабочей зоны
■	Контроль IGG
■	50 нг INTG-1
■	NT-1

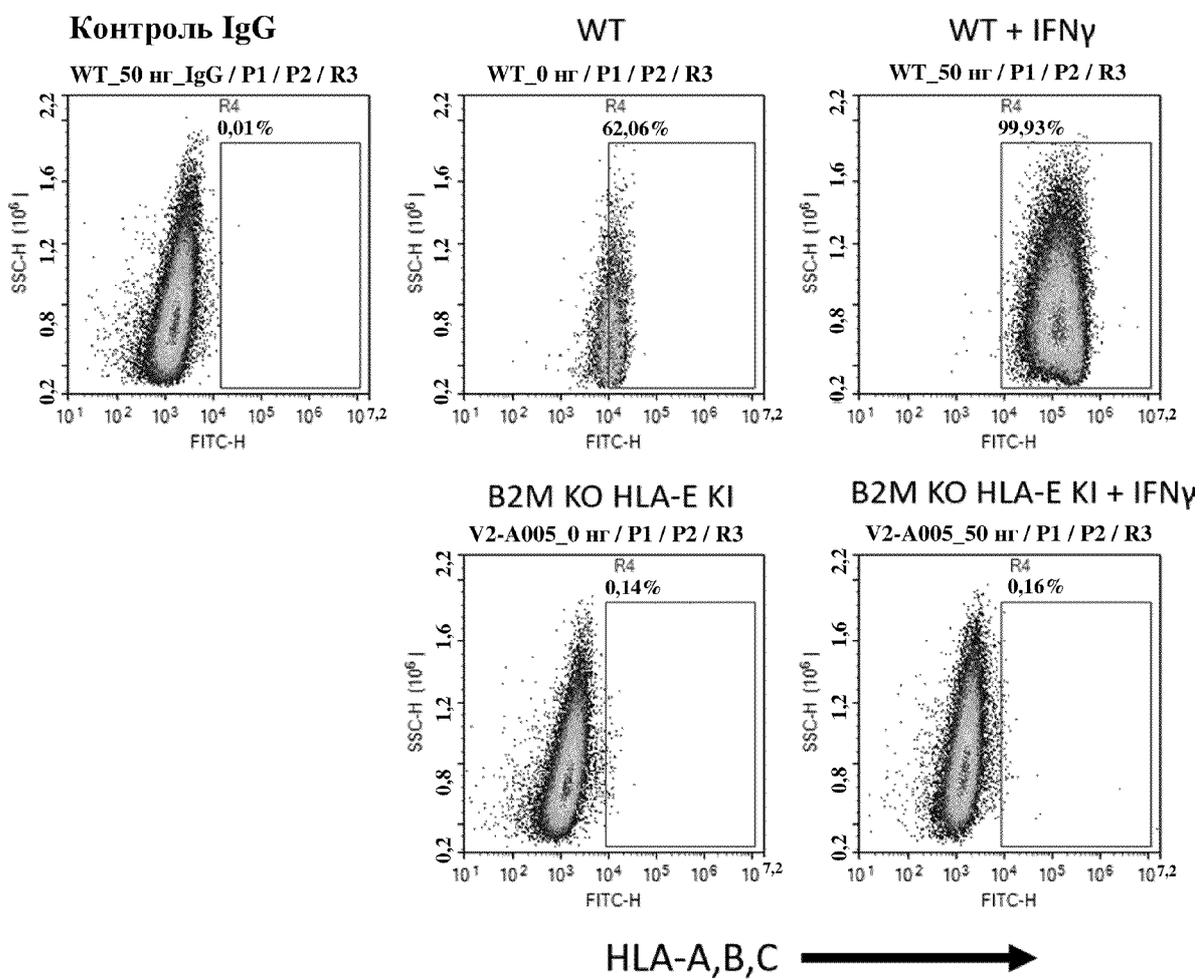
ФИГ. 12В



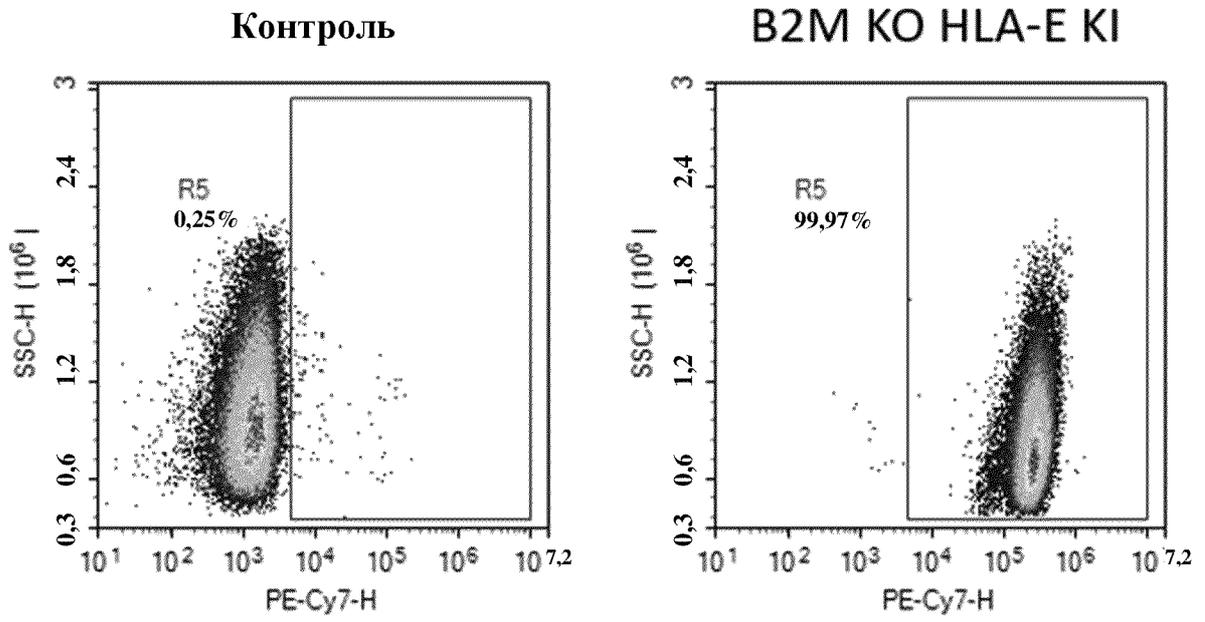
ФИГ. 13



ФИГ. 14

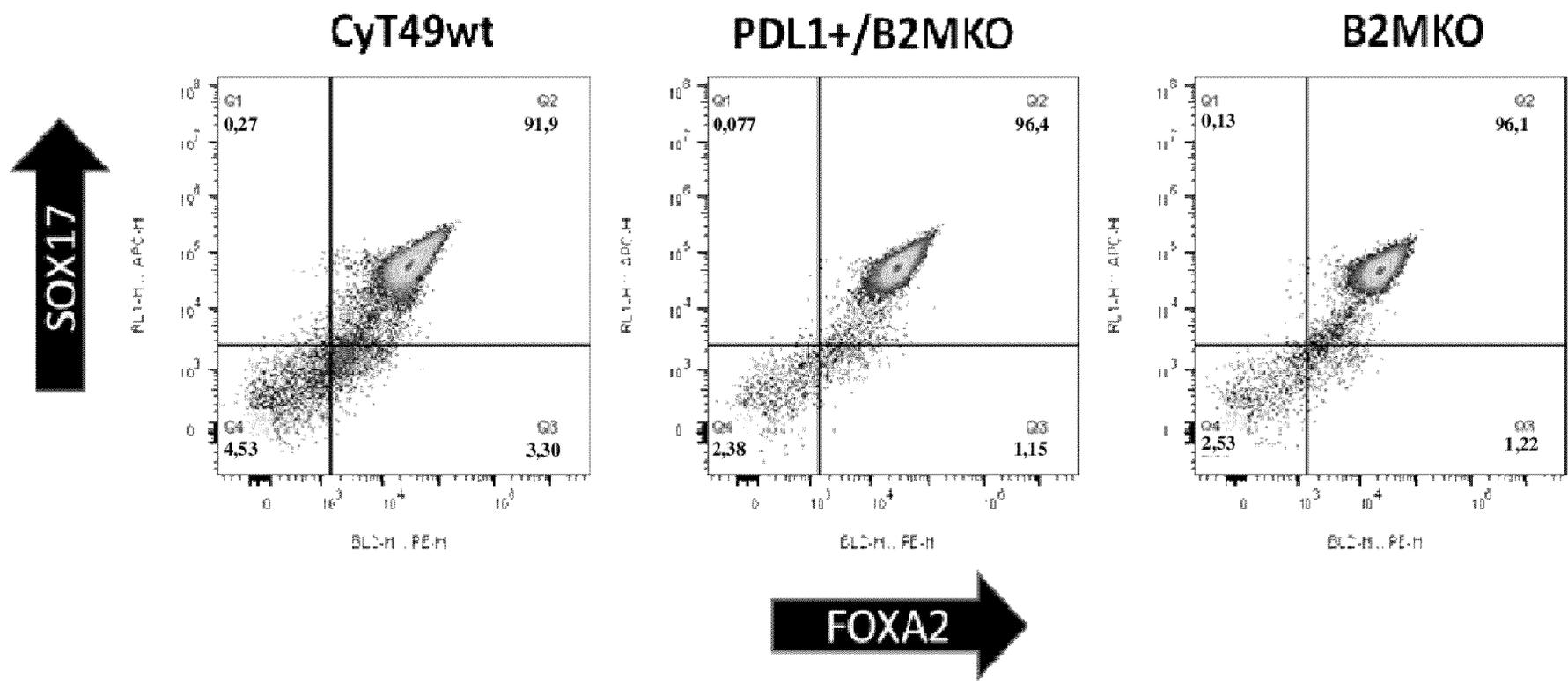


ФИГ. 15

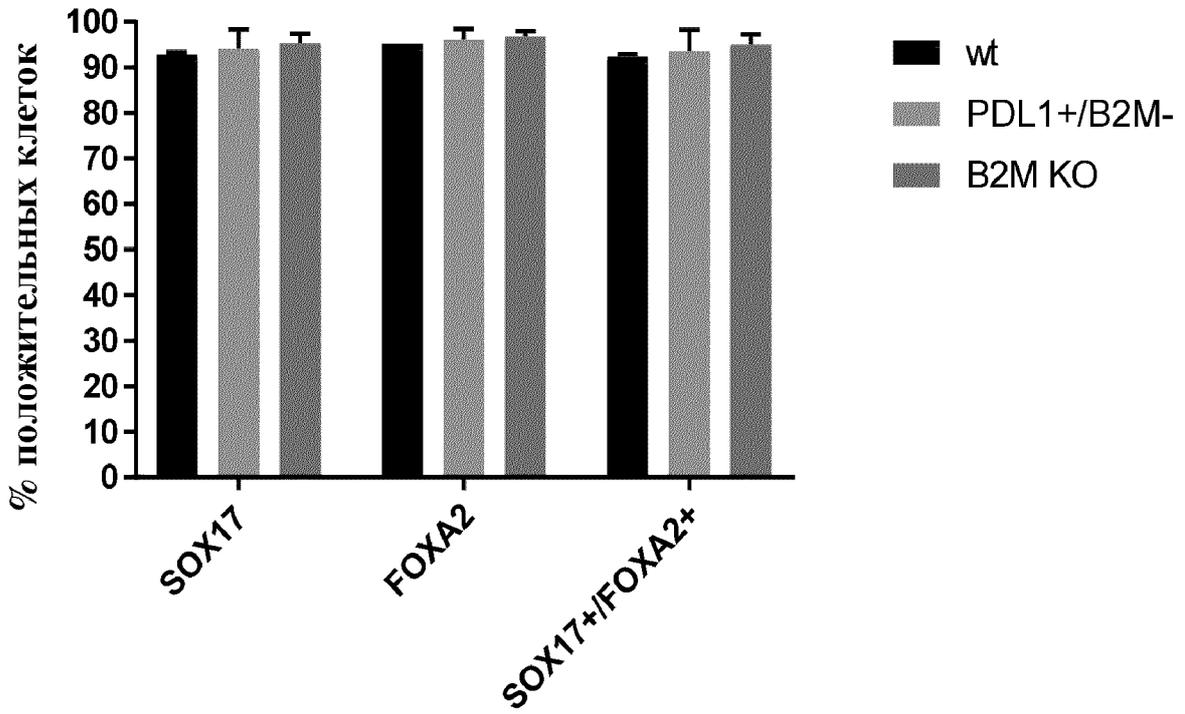


HLA-E →

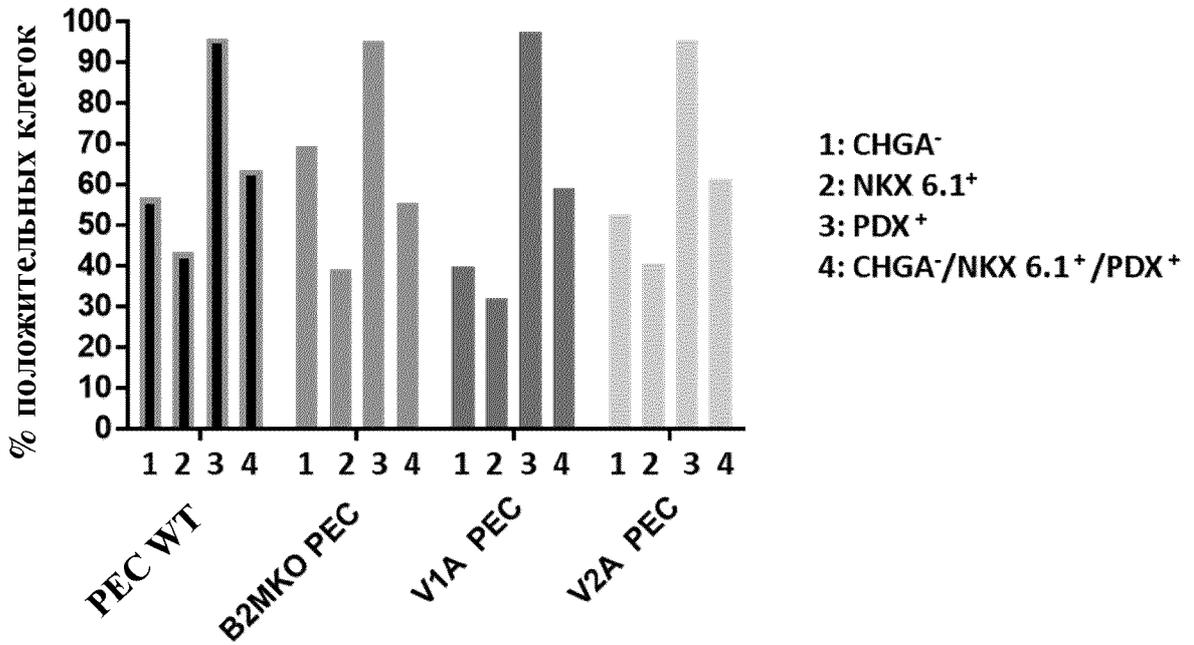
ФИГ. 16



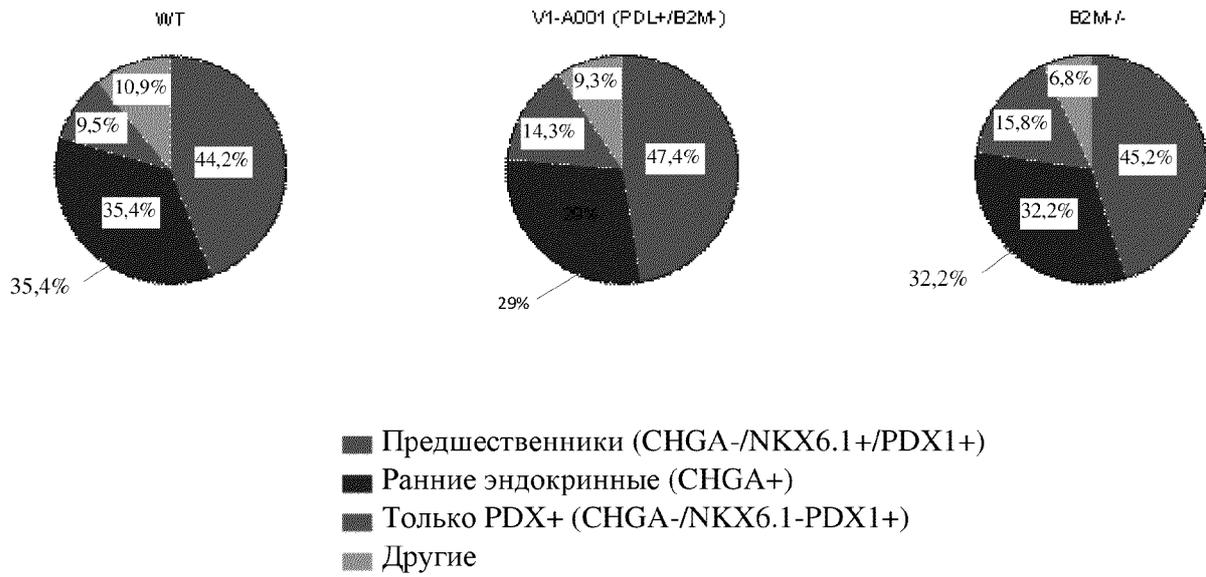
ФИГ. 17



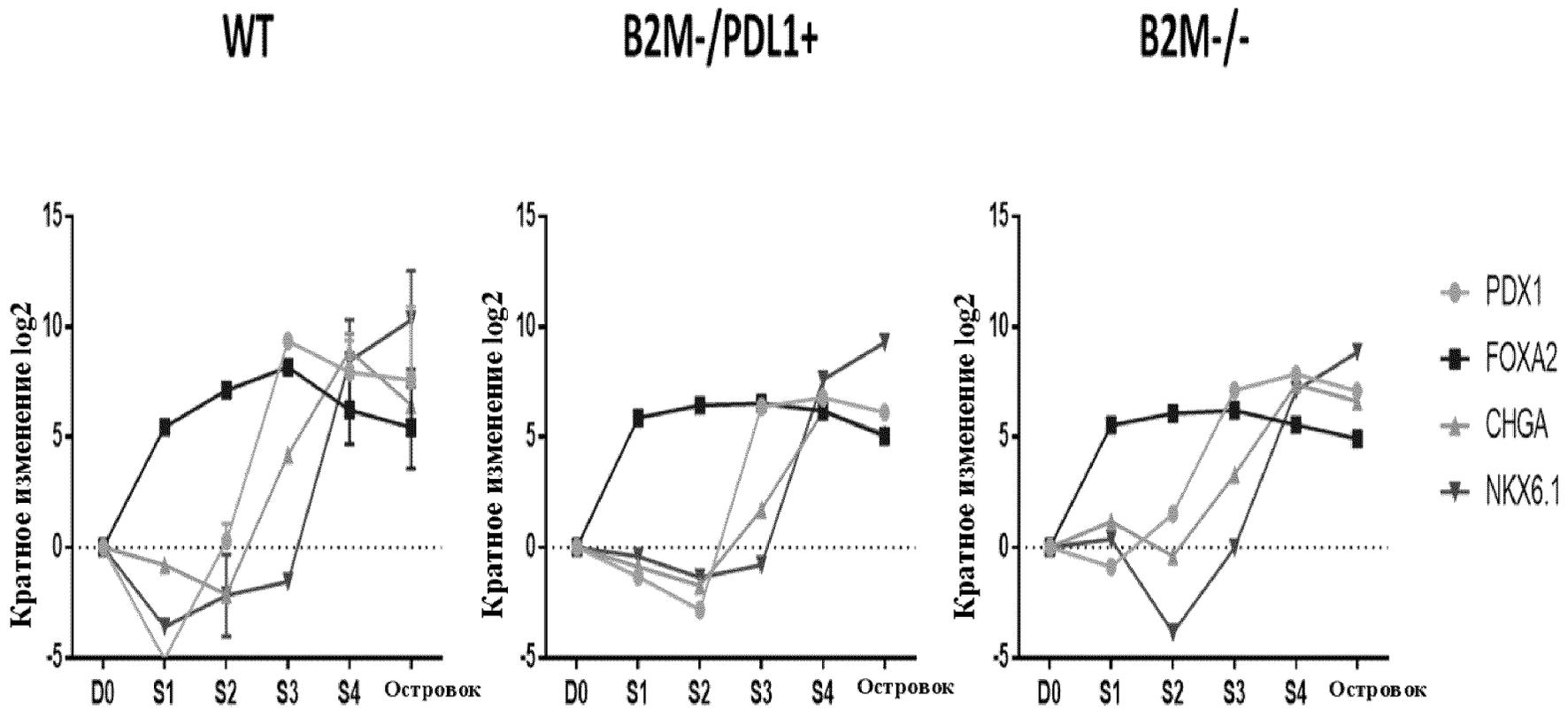
ФИГ. 18



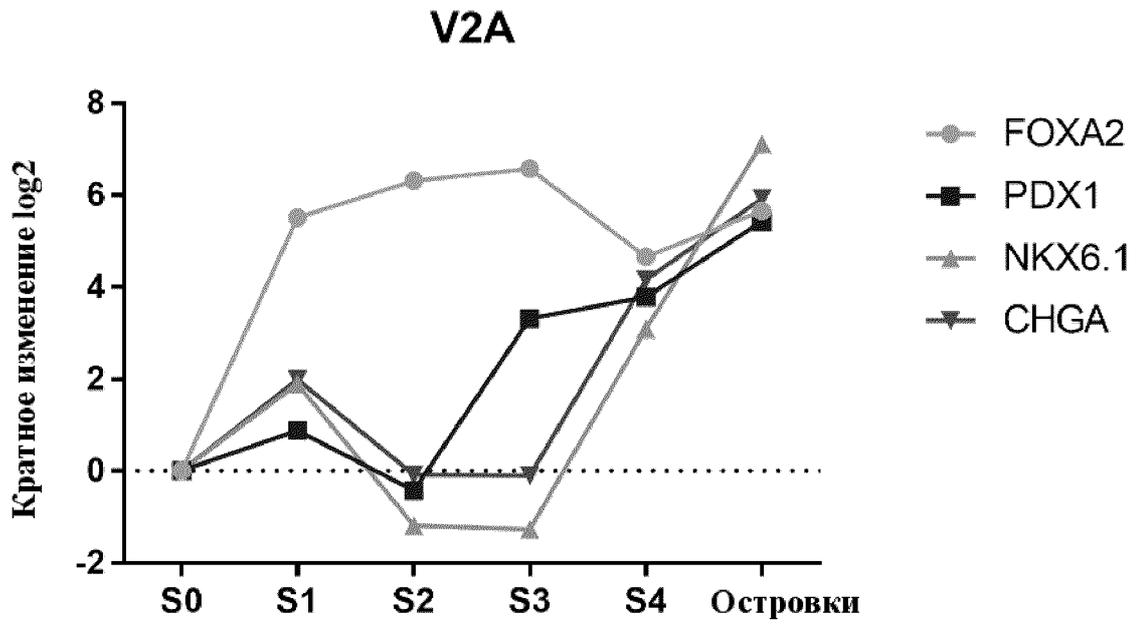
ФИГ. 19



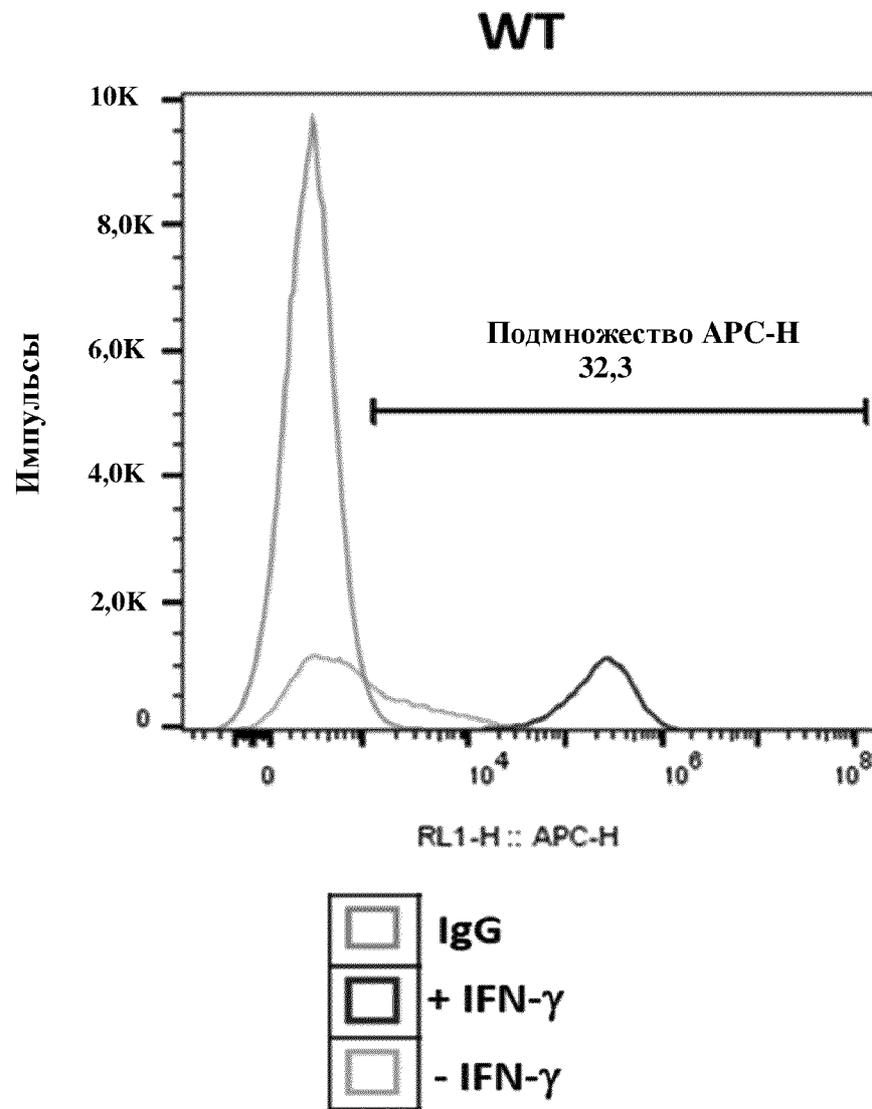
ФИГ. 20



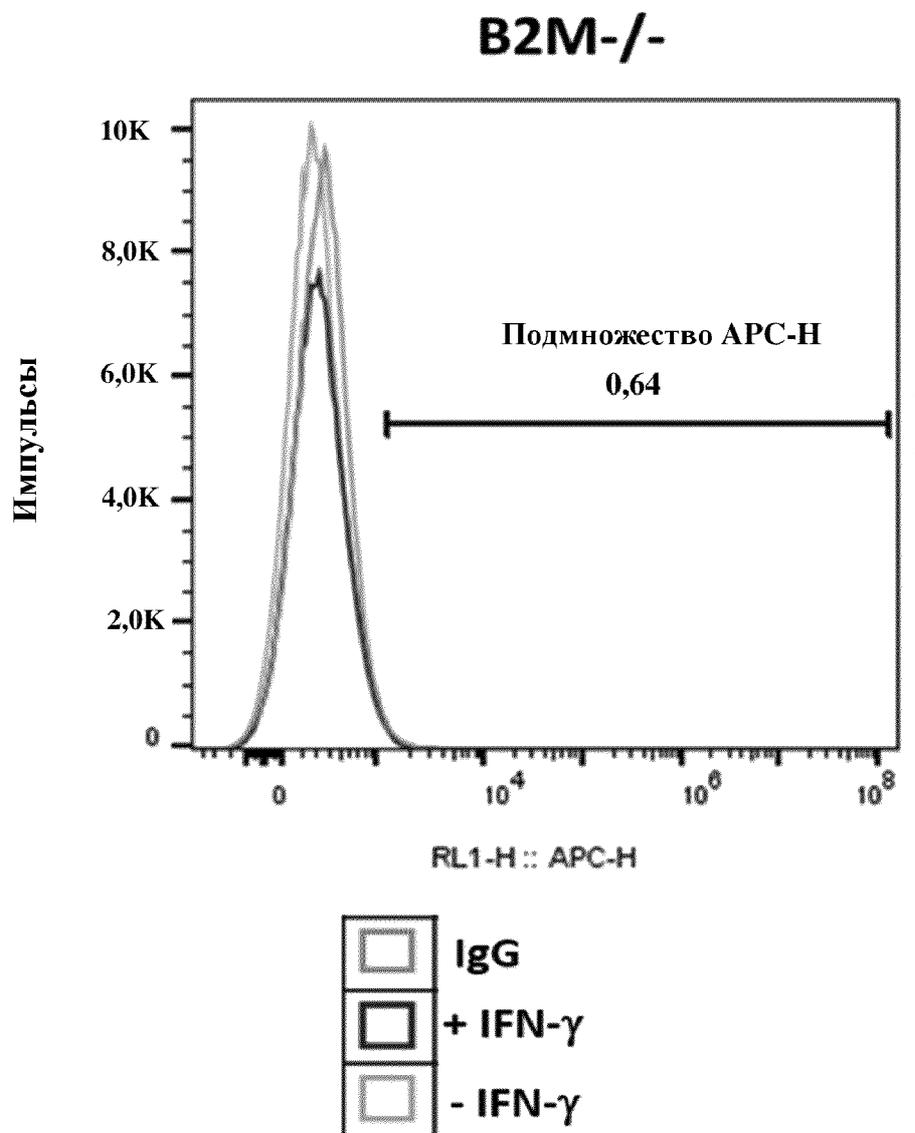
ФИГ. 21А



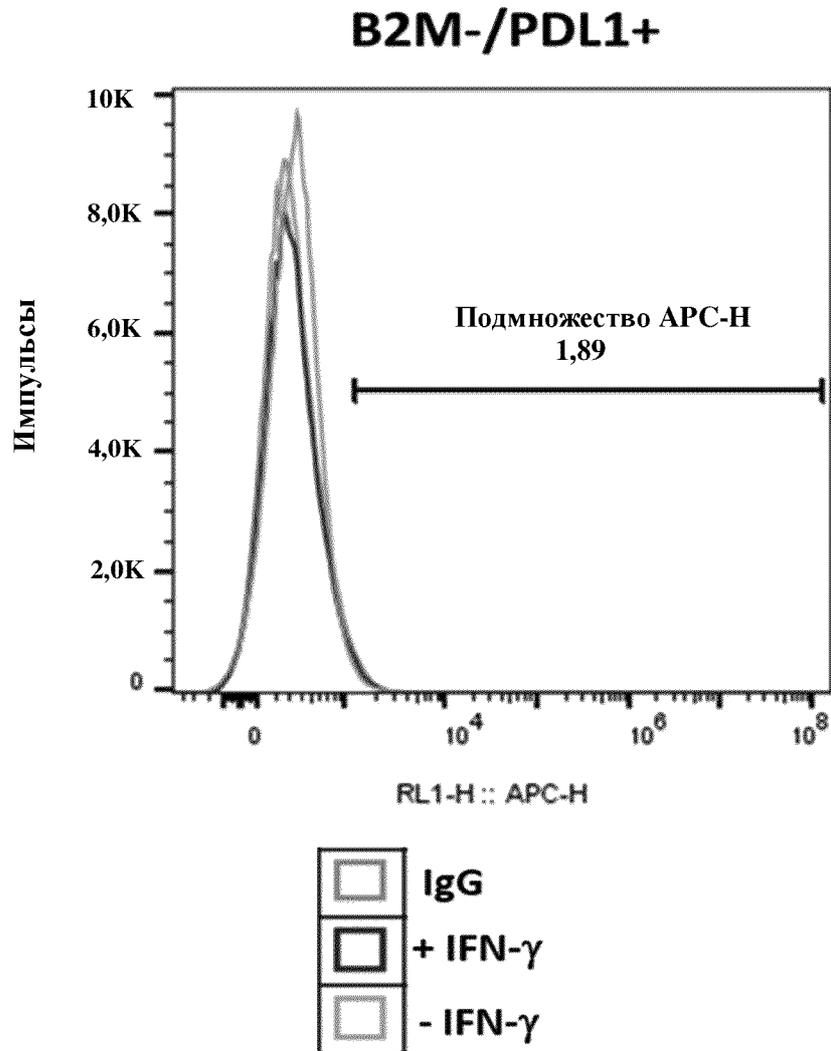
ФИГ. 21В



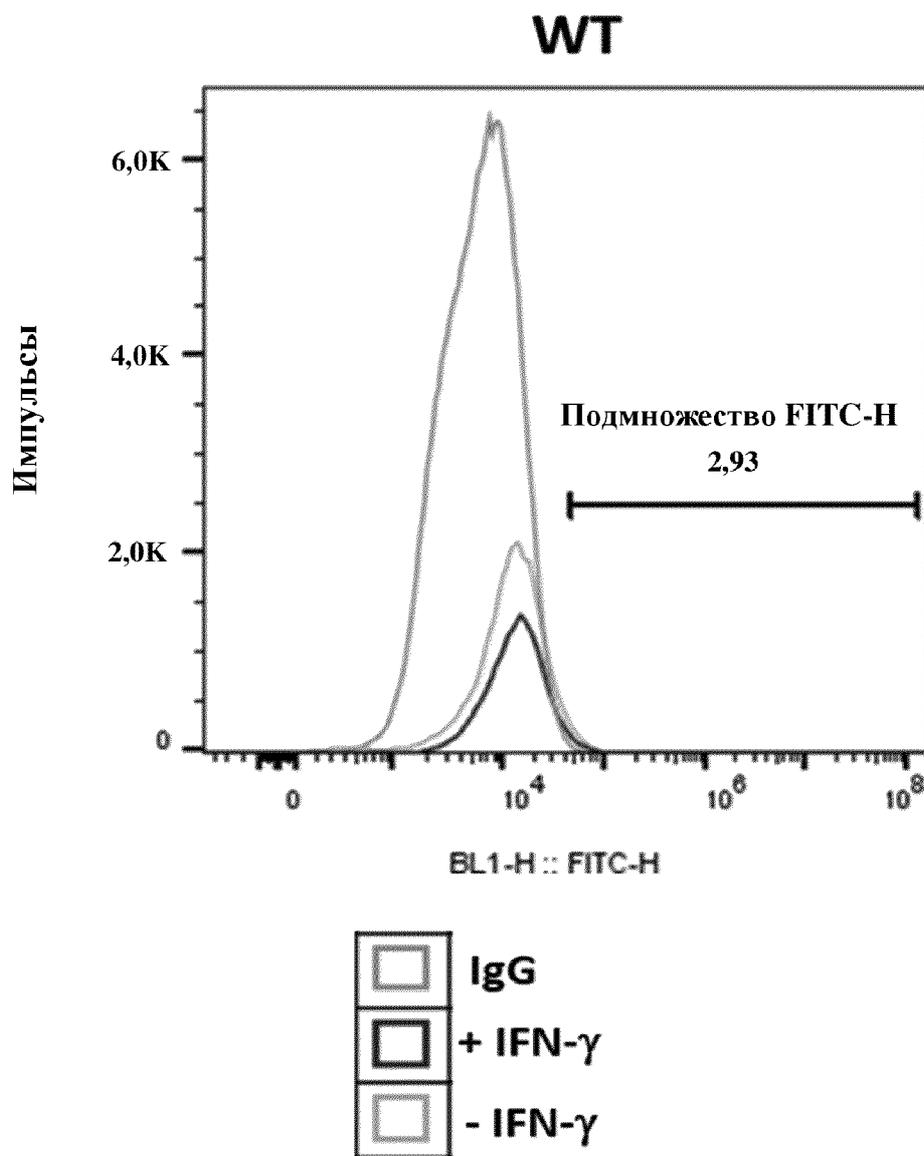
ФИГ. 22А



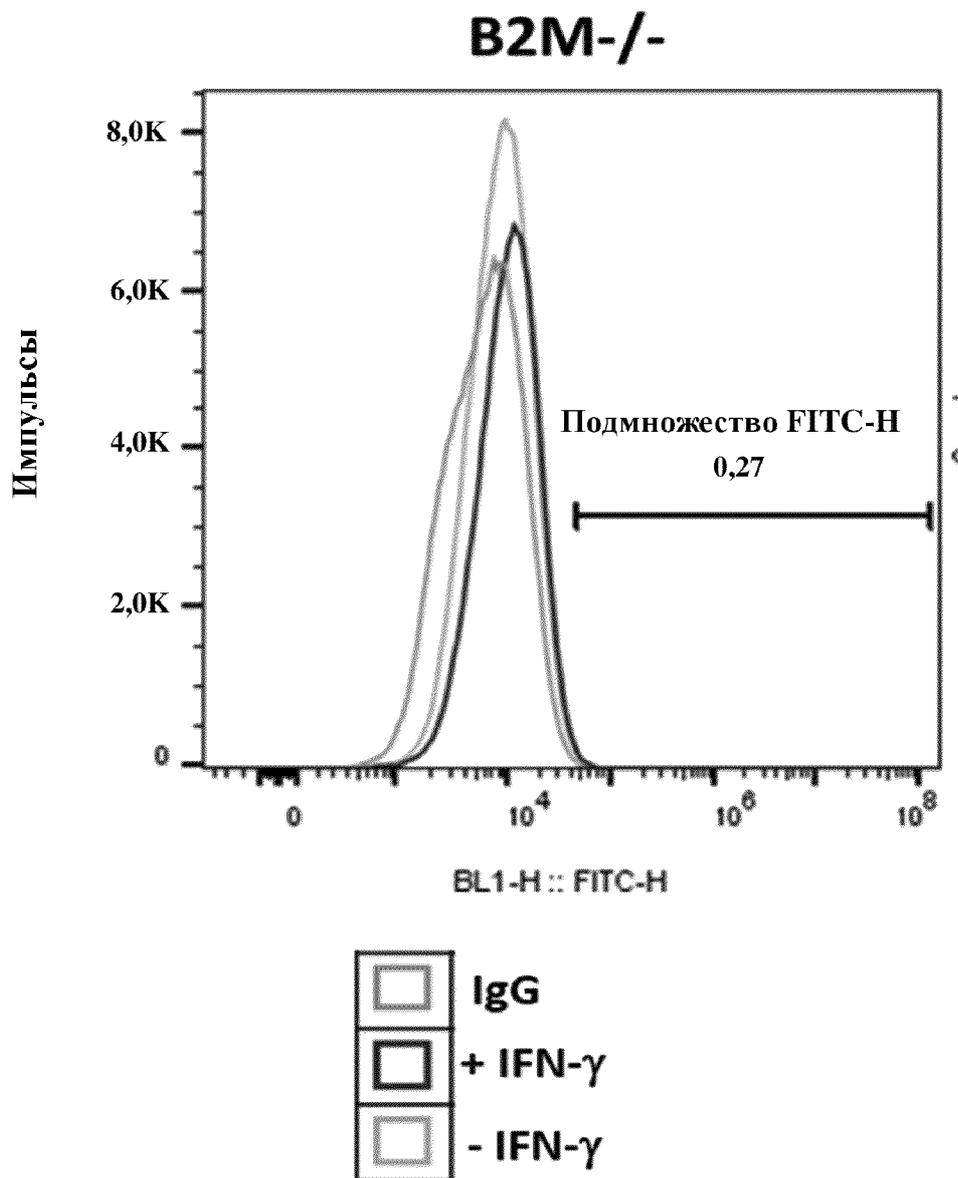
ФИГ. 22В



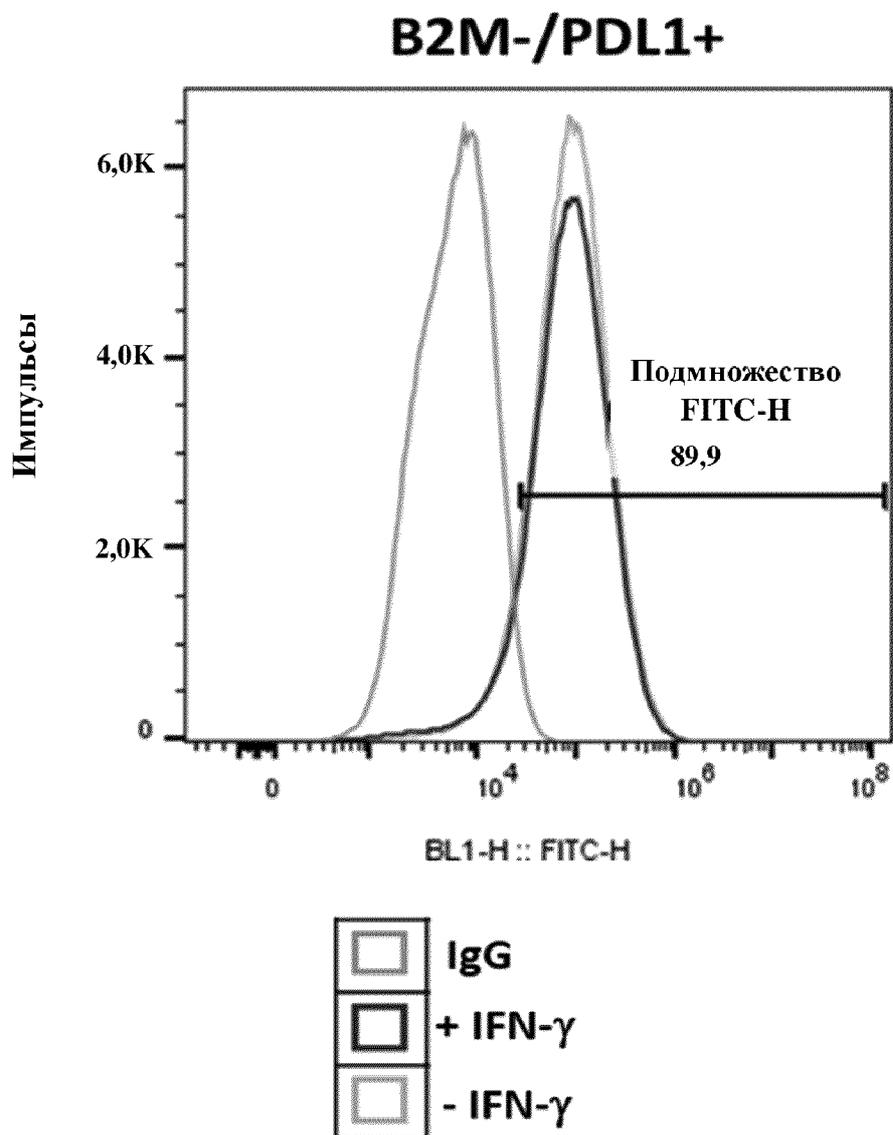
ФИГ. 22С



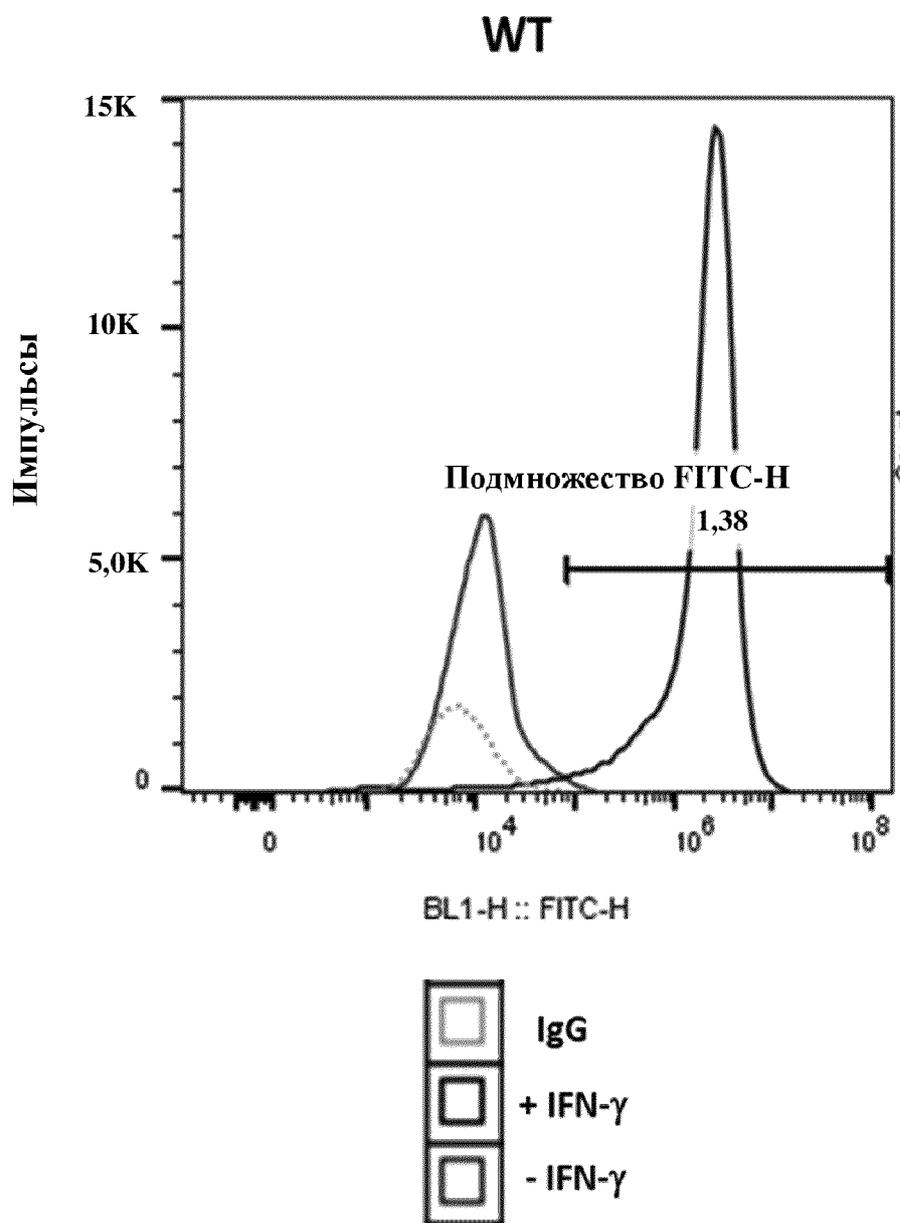
ФИГ. 22D



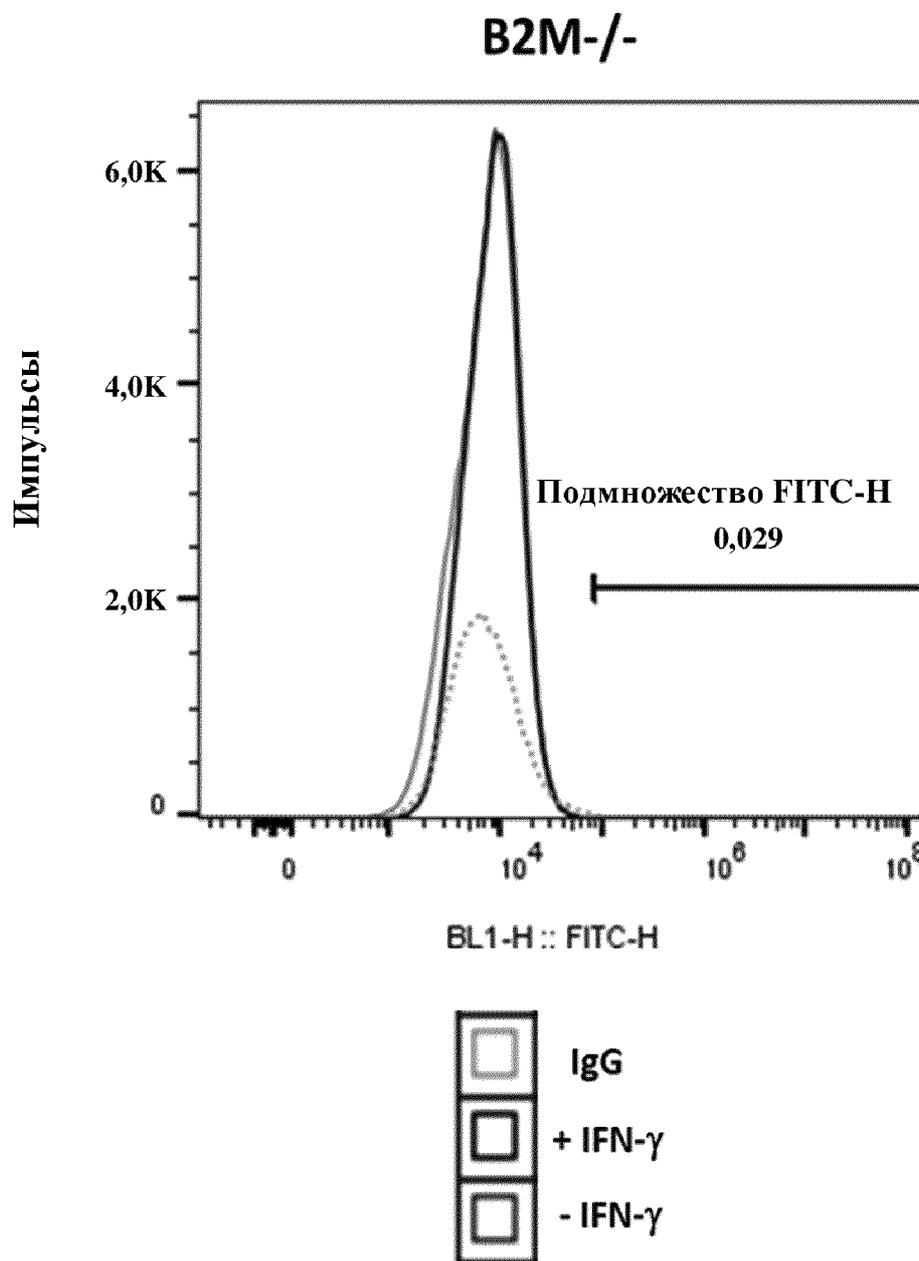
ФИГ. 22Е



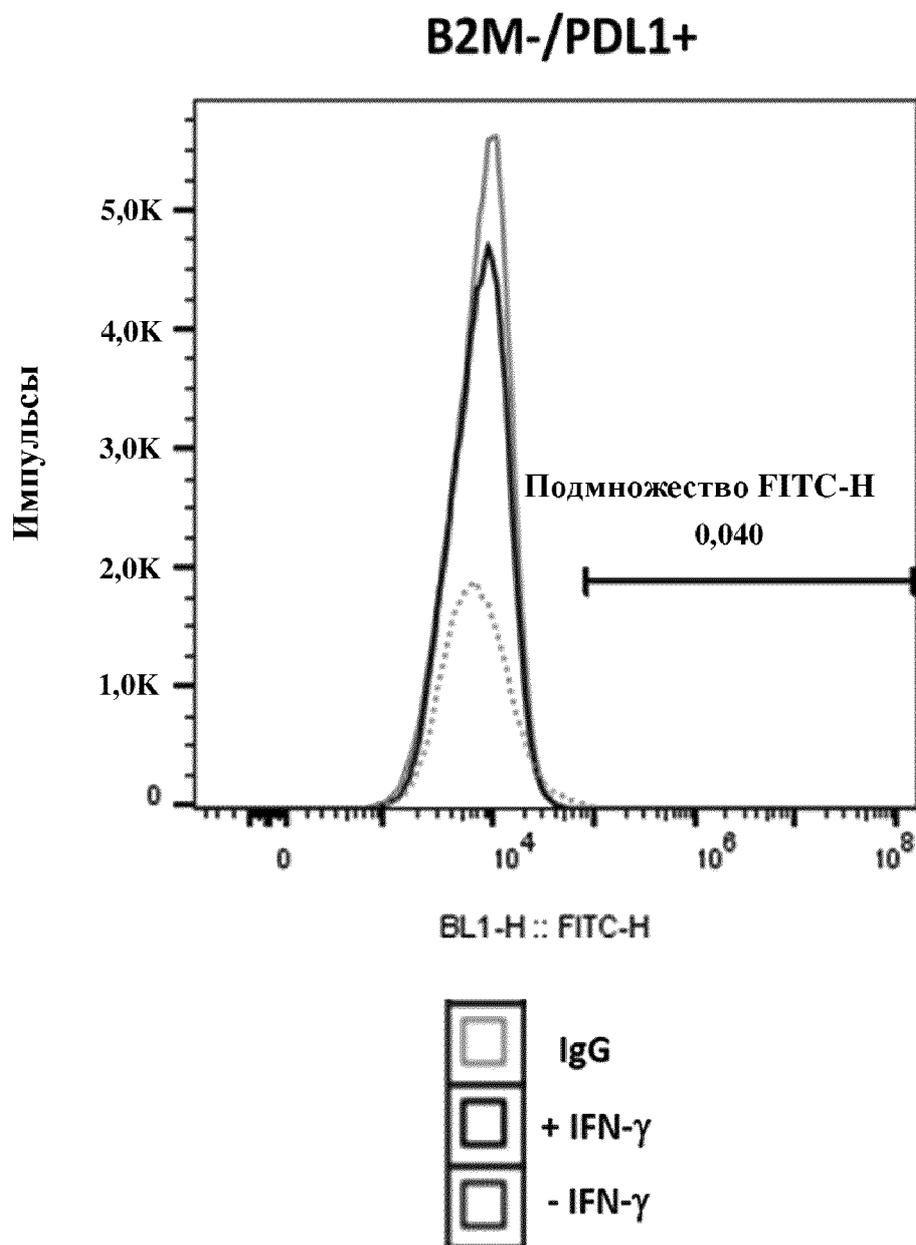
ФИГ. 22F



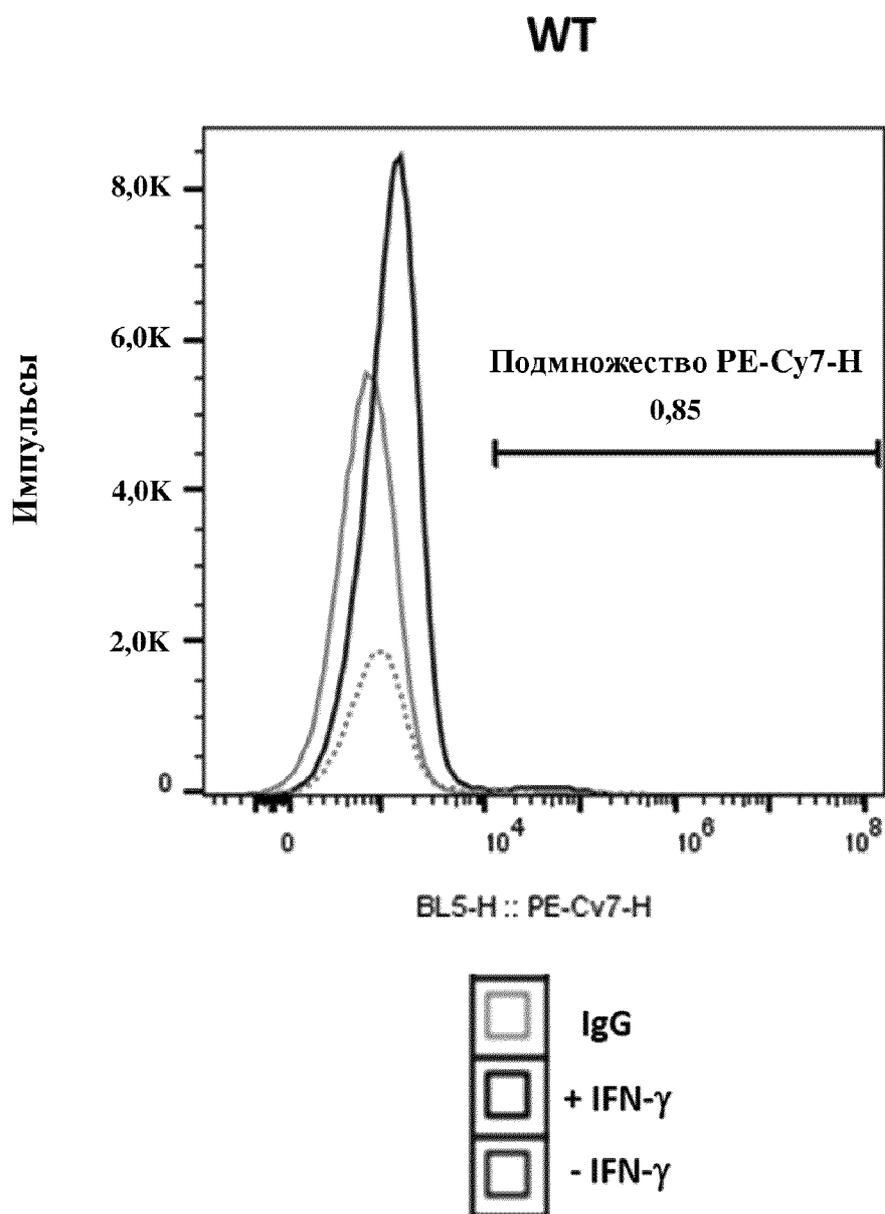
ФИГ. 23А



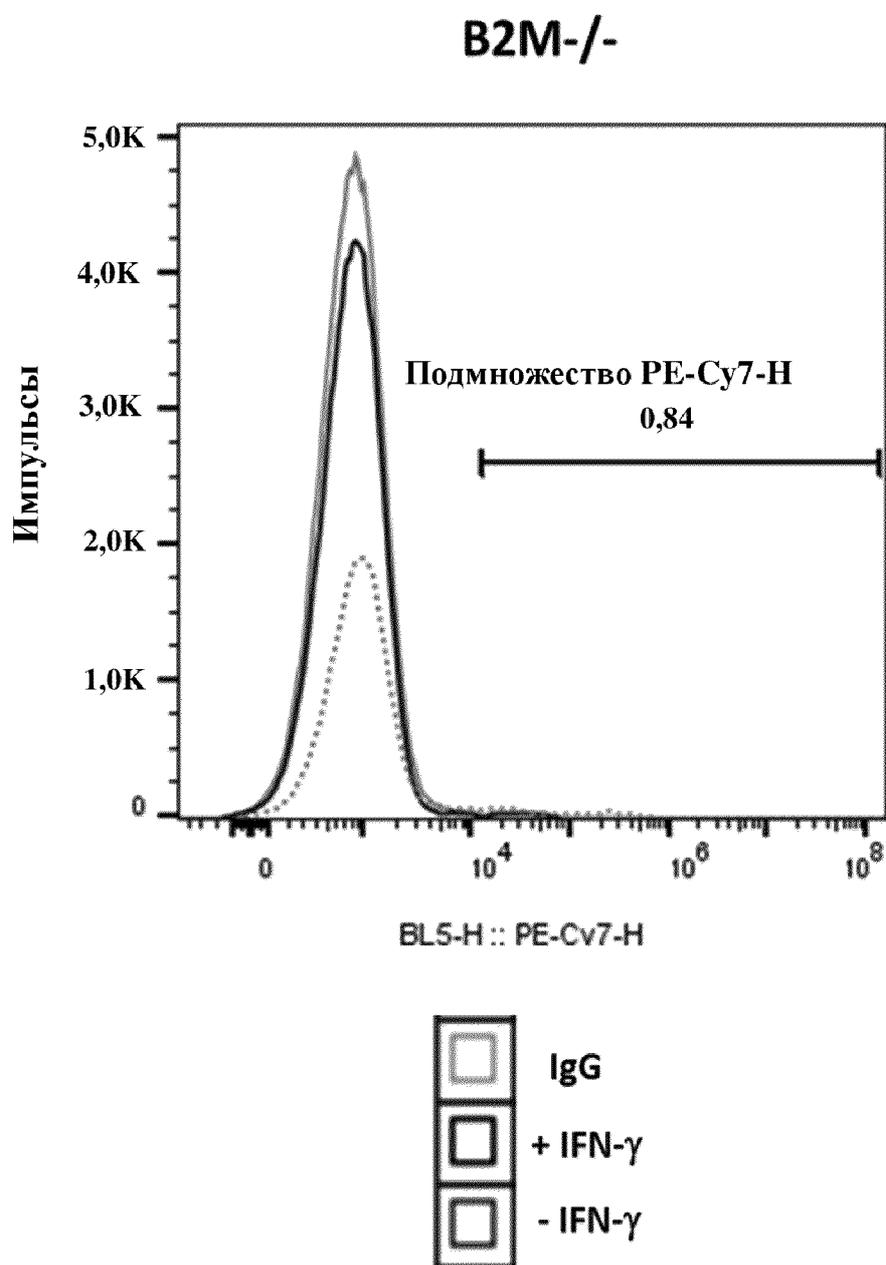
ФИГ. 23В



ФИГ. 23С

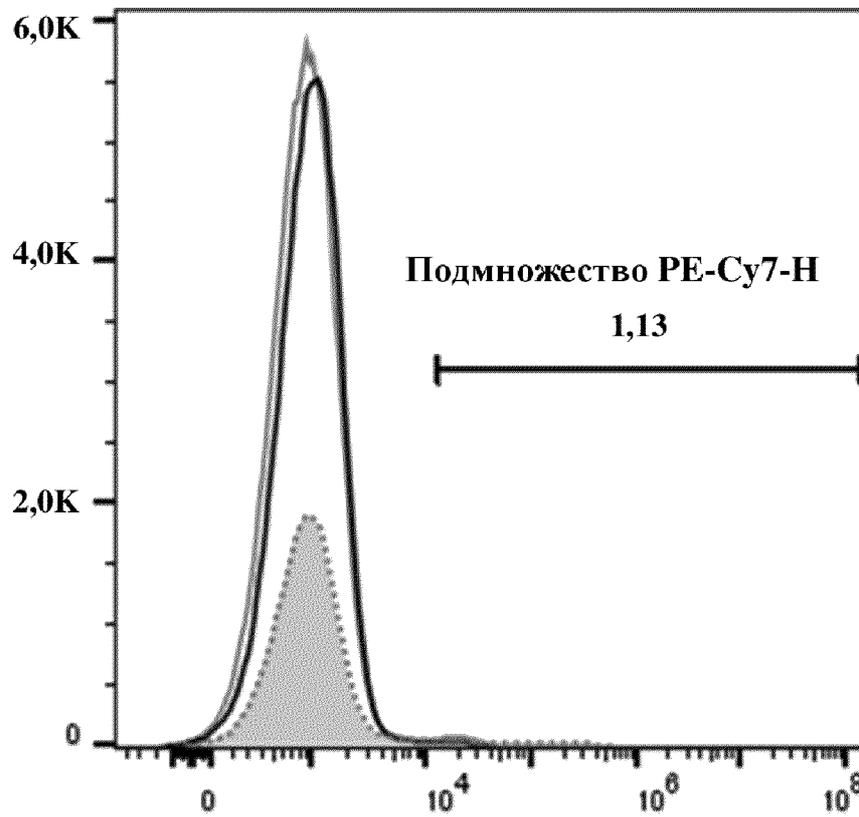


ФИГ. 23D



ФИГ. 23Е

B2M-/PDL1+

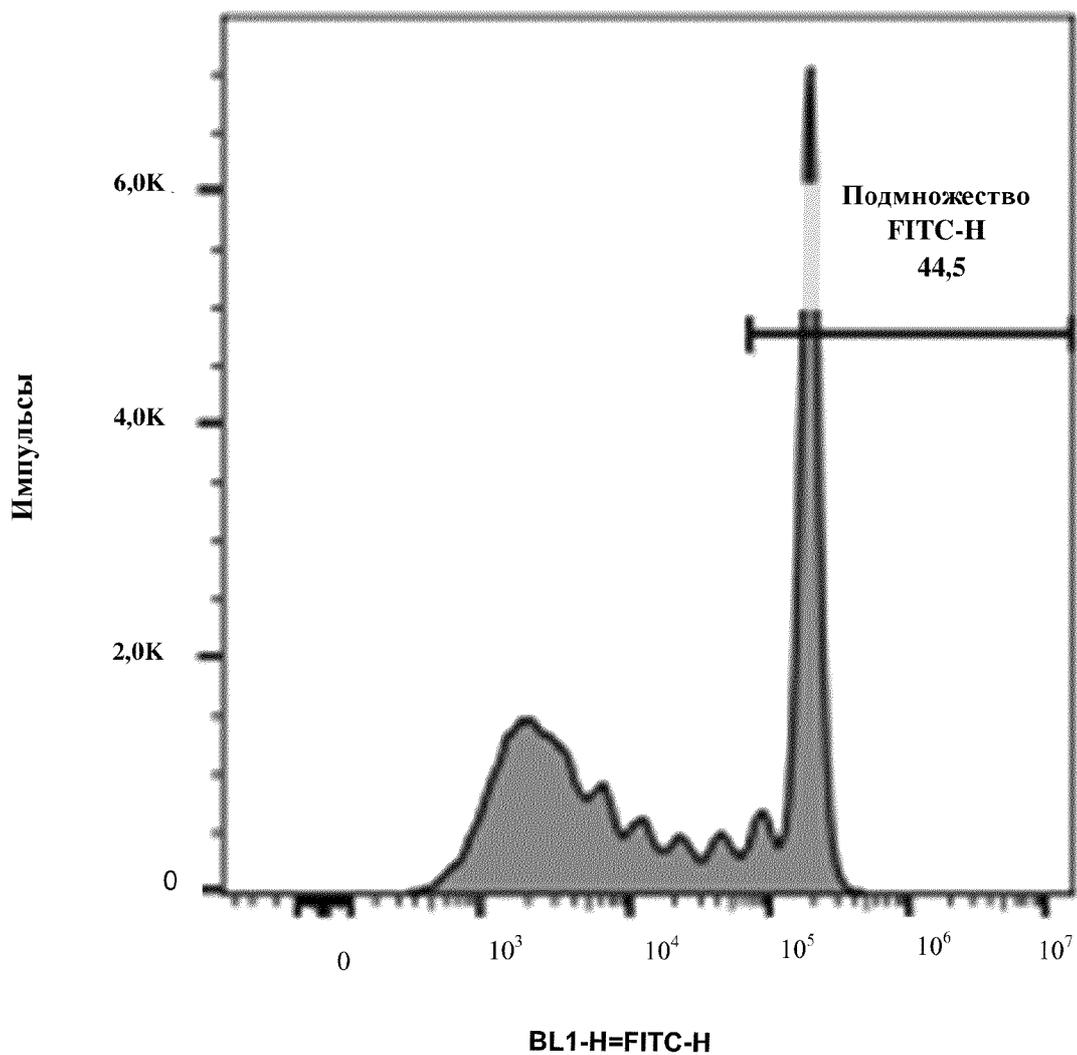


BL5-H :: PE-Cv7-H

- IgG
- + IFN- γ
- IFN- γ

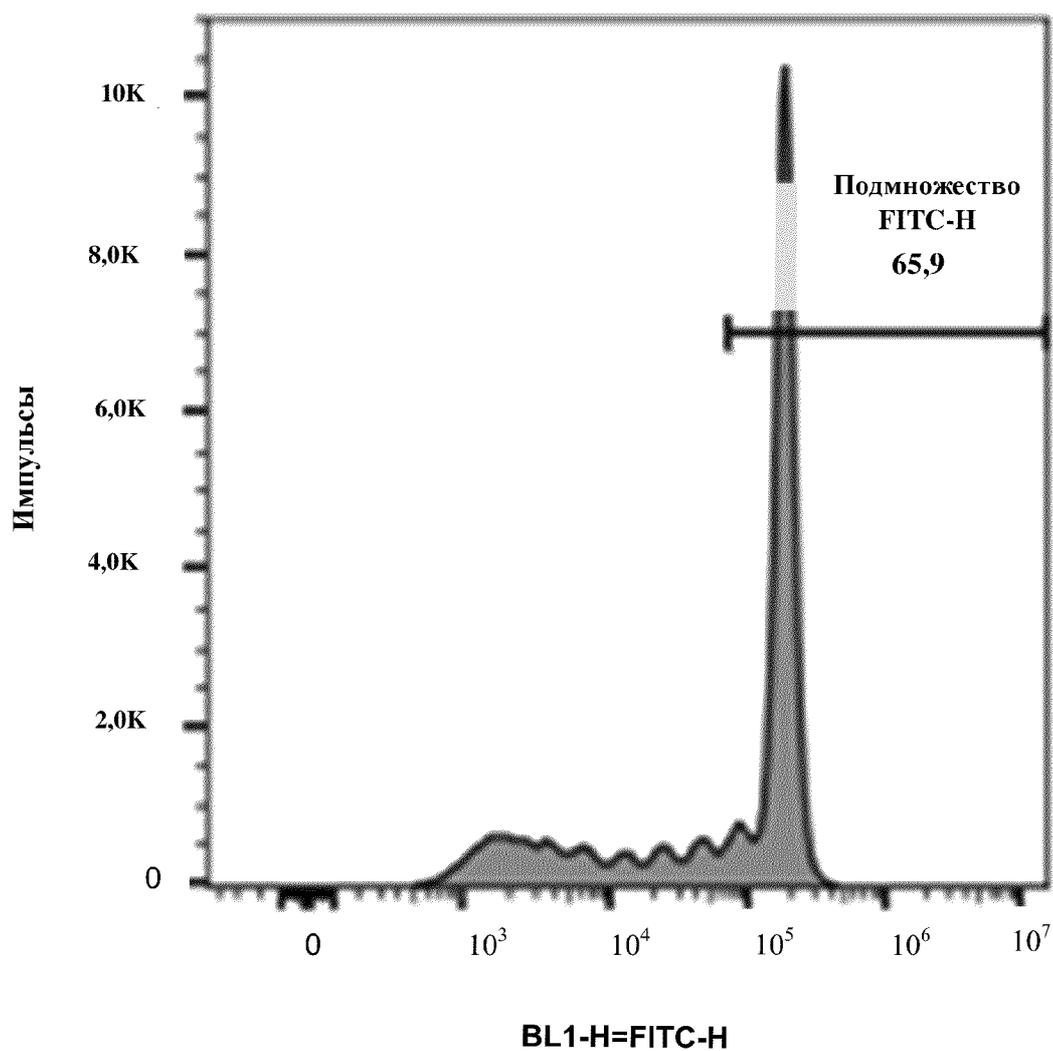
ФИГ. 23F

PEC-WT



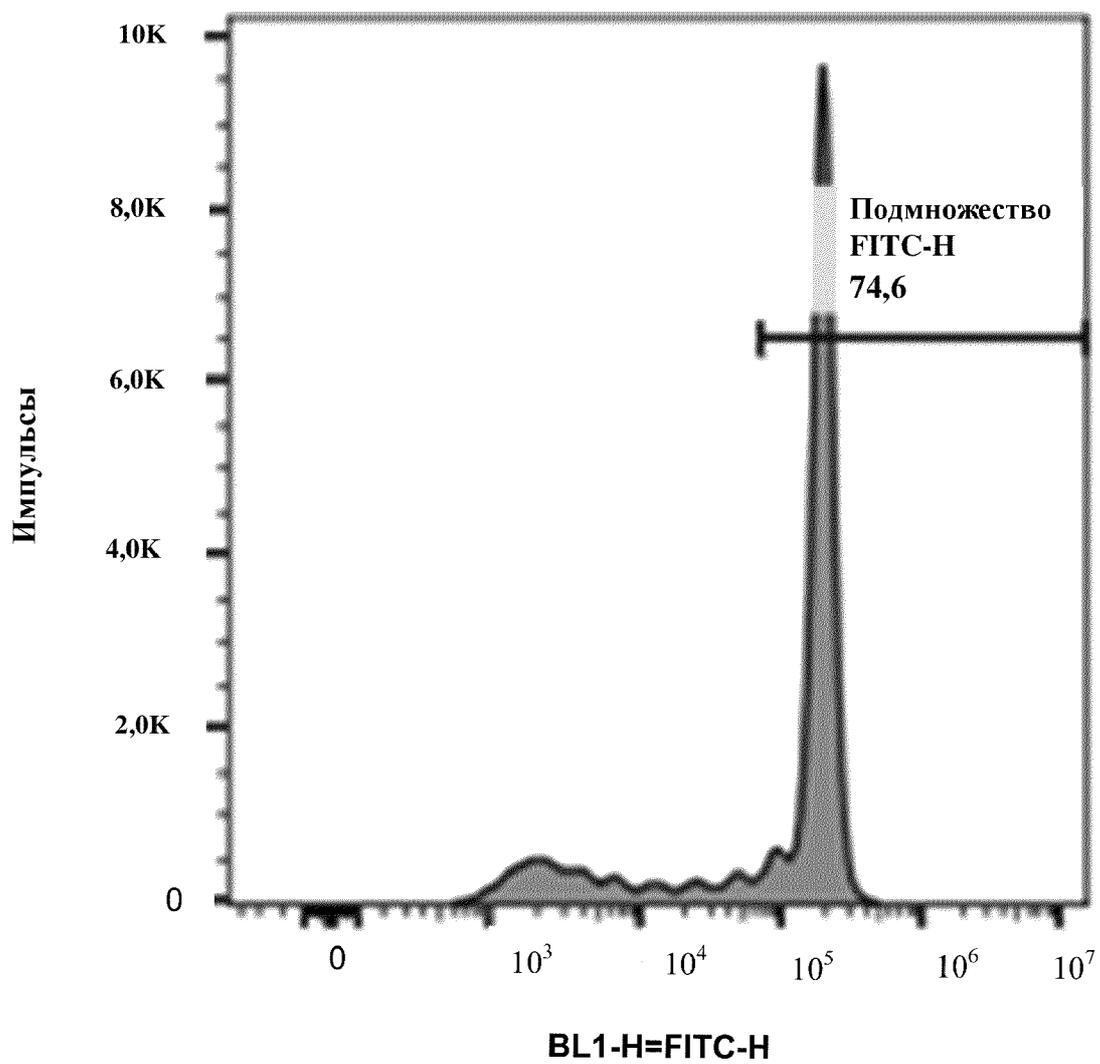
ФИГ. 24А

РЕС-B2M КО PDL1 KI



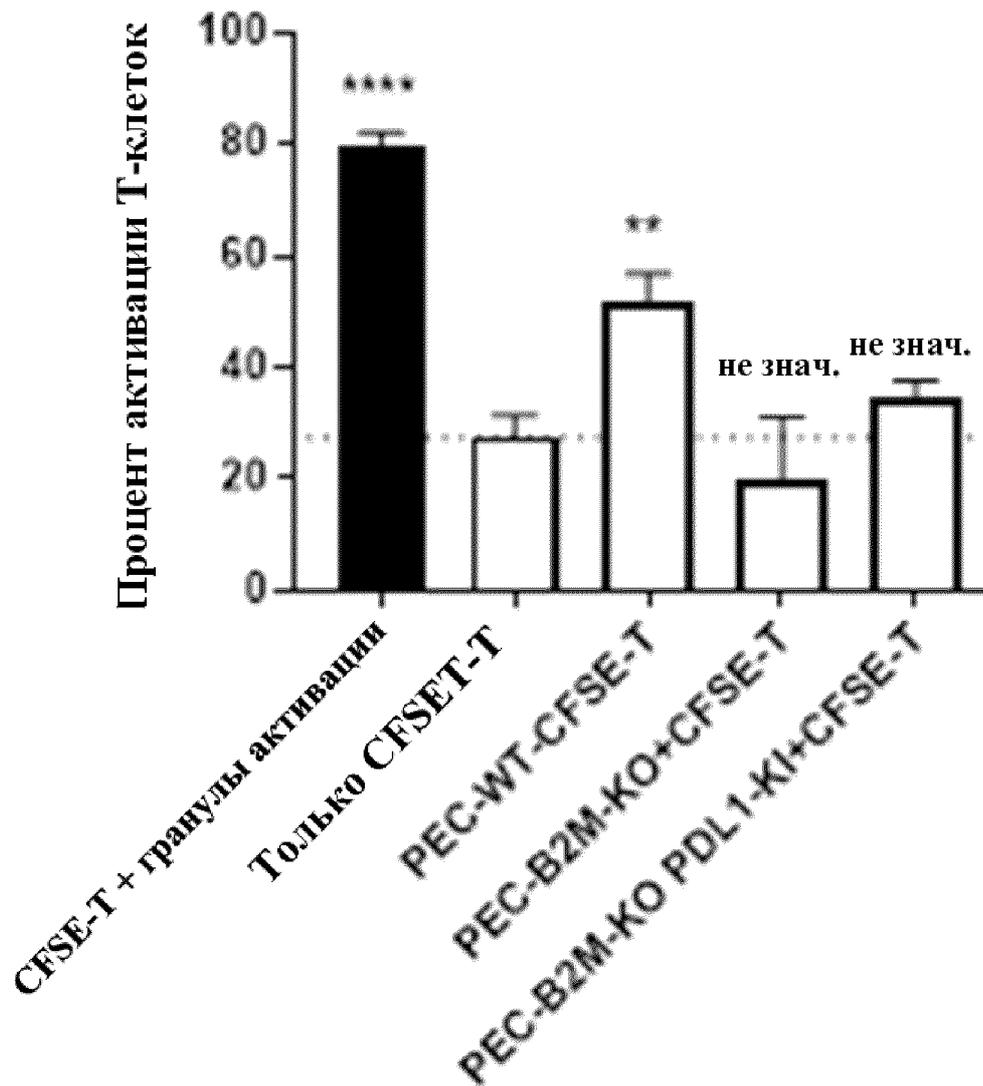
ФИГ. 24В

РЕС-В2М КО



ФИГ. 24С

Активация Т-клеток



ФИГ. 24D