

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192264** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.22

(22) Дата подачи заявки
2020.02.16

(51) Int. Cl. *C07K 14/74* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)
C12N 5/0735 (2010.01)

(54) УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ДОНОРСКИЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ

(31) 16/277,913; 16/596,697

(32) 2019.02.15; 2019.10.08

(33) US

(86) PCT/US2020/018467

(87) WO 2020/168317 2020.08.20

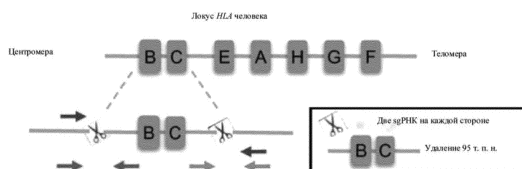
(88) 2020.10.29

(71) Заявитель:
**ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОУС ОФ
ГАРВАРД КОЛЛЕДЖ (US)**

(72) Изобретатель:
**Мейсснер Торстен Б., Феррейра
Леонардо М.р., Строминджер Джек Л.,
Коуан Чад А. (US)**

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

(57) В изобретении описаны универсальные донорские стволовые клетки и соответствующие способы их применения и производства. Описанные в изобретении универсальные донорские стволовые клетки пригодны для преодоления иммунного отторжения в терапии трансплантации на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения универсальные донорские стволовые клетки, описанные в данном документе, имеют модулированную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и одного или более толерогенных факторов.



A1

202192264

202192264

A1

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ДОНОРСКИЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка представляет собой продолжение заявки США № 16/596697, поданной 8 октября 2019 г., которая является продолжением заявки США № 16/277913, поданной 15 февраля 2019 г., в которой заявляется преимущество предварительной заявки США № 62/631393, поданной 15 февраля 2018 г. Все рекомендации вышеуказанных заявок включены в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Виды терапии с применением клеток, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека для трансплантации, могут революционизировать способы лечения заболеваний. Основным препятствием для их клинического применения является отторжение аллогенных клеток иммунной системой реципиента. Стратегии, направленные на преодоление этого иммунного барьера, включают создание банка клеток с определенными гаплотипами HLA (Nakajima et al., 2007; Taylor et al., 2005) и создание пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Однако многочисленные ограничения (de Rham and Villard, 2014; Tapia and Scholer, 2016) запрещают более широкое применение этих подходов и подчеркивают необходимость в «готовых к применению» клеточных препаратах, которые можно легко вводить любому нуждающемуся в этом пациенту.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описаны эффективные стратегии преодоления иммунного отторжения в трансплантационной терапии на основе клеток путем создания универсальных линий донорских стволовых клеток.

В данном документе описаны стволовые клетки, имеющие модулированную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и одного или более толерогенных факторов по сравнению со стволовыми клетками дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I выбраны из группы, состоящей из HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых аспектах модулированная экспрессия одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I включает пониженную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I удалены из генома клетки, тем самым модулируя экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II выбраны из группы, состоящей из HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR. В некоторых аспектах модулированная экспрессия одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II включает сниженную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более инделей были введены в СПТА, тем самым модулируя экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетка не экспрессирует HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых аспектах, клетка представляет собой HLA-A^{-/-}, HLA-B^{-/-}, HLA-C^{-/-}, и СІТА^{индел/индел} клетку.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-G, PD-L1 и CD47. В некоторых аспектах модулированная экспрессия одного или более толерогенных факторов включает повышенную экспрессию одного или более толерогенных факторов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более толерогенных факторов вставлен в локус «безопасная гавань» (англ.: safe harbor) *AAVS1*. В некоторых аспектах, HLA-G, PD-L1 и CD47 вставлены в локус «безопасная гавань» *AAVS1*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более толерогенных факторов ингибируют иммунное отторжение.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку. В некоторых аспектах, стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка является гипоиимуногенной. В некоторых аспектах, стволовая клетка представляет собой человеческую стволовую клетку.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка сохраняет плюрипотентность. В некоторых аспектах, стволовая клетка сохраняет потенциал дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовые клетки демонстрируют пониженный Т-клеточный ответ. В некоторых аспектах, стволовая клетка демонстрирует защиту от NK-клеточного ответа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка демонстрирует пониженное поглощение макрофагами.

Также в данном документе описаны стволовые клетки, которые не экспрессируют HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка представляет собой HLA-A^{-/-}, HLA-B^{-/-}, HLA-C^{-/-}, и СІТА^{индел/индел} клетку. В некоторых аспектах, стволовая клетка экспрессирует толерогенные факторы HLA-G, PD-L1 и CD47. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, толерогенные факторы вставлены в локус «безопасная гавань» *AAVS1*. В некоторых аспектах, толерогенные факторы ингибируют иммунное отторжение.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку. В некоторых аспектах, стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка является гипоиимуногенной.

В данном документе описаны способы получения гипоиимуногенной стволовой клетки, причем способ включает модуляцию экспрессии одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и одного или более толерогенных факторов стволовой клетки относительно стволовой клетки дикого типа, тем самым получая гипоиимуногенную стволовую клетку.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I выбраны из группы, состоящей из HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых аспектах модулированная экспрессия одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I включает пониженную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более человеческих лейкоцитарных

антигенов ГКГС-I удалены из генома стволовой клетки, тем самым модулируя экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II выбраны из группы, состоящей из HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR. В некоторых аспектах модулированная экспрессия одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II включает пониженную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более инделей были введены в СИТА, тем самым модулируя экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II.

В некоторых аспектах, гипоиимуногенная стволовая клетка не экспрессирует HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, гипоиимуногенная стволовая клетка представляет собой HLA-A^{-/-}, HLA-B^{-/-}, HLA-C^{-/-}, и СИТА^{индел/индел} клетку.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-G, PD-L1 и CD47. В некоторых аспектах модулированная экспрессия одного или более толерогенных факторов включает повышенную экспрессию одного или более толерогенных факторов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более толерогенных факторов вставлен в локус «безопасная гавань» *AAVS1*. В некоторых аспектах, HLA-G, PD-L1 и CD47 вставлены в локус «безопасная гавань» *AAVS1*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, один или более толерогенных факторов ингибируют иммунное отторжение.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, гипоиимуногенная стволовая клетка сохраняет плюрипотентность. В некоторых аспектах, гипоиимуногенная стволовая клетка сохраняет потенциал дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, гипоиимуногенная стволовая клетка демонстрирует пониженный Т-клеточный ответ. В некоторых аспектах, гипоиимуногенная стволовая клетка демонстрирует защиту от NK-клеточного ответа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, гипоиимуногенная стволовая клетка демонстрирует пониженное поглощение макрофагами.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и первой парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 1-2, тем самым редактируя ген HLA-A для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-A в стволовой клетке. В некоторых аспектах, стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и первой парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 3-4, тем самым редактируя ген HLA-B для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-B в стволовой клетке. В некоторых аспектах, стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и первой парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 5-6, тем самым редактируя ген HLA-C для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-C в стволовых клетках. В некоторых аспектах, стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и рибонуклеиновой кислотой, имеющей последовательность SEQ ID NO: 7, тем самым вводя индели в СИТА для понижения или устранения поверхностной экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II и/или активности в стволовой клетке.

В данном документе также описаны способы получения гипоиимуногенной стволовой клетки, причем способ включает модуляцию экспрессии одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и одного или более толерогенных факторов стволовой клетки относительно стволовой клетки дикого типа, таким образом получают гипоиимуногенную стволовую клетку, при этом стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и первой парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 1-2, тем самым редактируя ген HLA-A для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-A в стволовой клетке, при этом стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и второй парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 3-4, тем самым редактируя ген HLA-B для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-B в стволовой клетке, при этом стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и третьей парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 5-6, тем самым редактируя ген HLA-C для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-C в стволовой клетке, и при этом стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas и рибонуклеиновую кислоту, имеющую последовательность SEQ ID NO: 7, тем самым вводя индели в СИТА для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II в стволовой клетке.

Также в данном документе описаны способы трансплантации по меньшей мере одной гипоиимуногенной стволовой клетки пациенту, при этом гипоиимуногенная стволовая клетка имеет модулированную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и одного или более толерогенных факторов относительно стволовой клетки дикого типа.

Также в данном документе описаны стволовые клетки. Стволовые клетки могут иметь пониженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II по сравнению со стволовой клеткой дикого типа и повышенную экспрессию толерогенного фактора по сравнению со стволовой клеткой дикого типа, при этом человеческие лейкоцитарные антигены ГКГС-I представляют собой HLA-A, HLA-B и HLA-C, при этом человеческие лейкоцитарные антигены ГКГС-II представляют собой HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR, а толерогенный фактор представляет собой CD47.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, пониженная экспрессия человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I включает делеции человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I по меньшей мере из одного аллеля клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пониженная экспрессия человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II включает один или более инделей, вводимых в СИТА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка дополнительно имеет пониженную экспрессию СИТА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, толерогенный фактор вставлен в локус «безопасная гавань» по меньшей мере одного аллеля клетки.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка не экспрессирует HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка не экспрессирует HLA-DP, HLA-DQ, и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стволовая клетка не экспрессирует СИТА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, толерогенный фактор дополнительно содержит HLA-G и/или PD-L1.

В данном документе описаны стволовые клетки, которые не экспрессируют HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR и экспрессируют CD47. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетка представляет собой СИТАиндел/индел, HLA-A-/-, HLA-B-/-, и HLA-C-/- стволовую клетку.

Также в данном документе описаны способы получения гипоиммуногенных стволовых клеток. Способы могут включать снижение экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II стволовой клетки и усиление экспрессии толерогенного фактора стволовой клетки, тем самым получая гипоиммуногенную стволовую клетку, при этом человеческие лейкоцитарные антигены ГКГС-I представляют собой HLA-A, HLA-B и HLA-C, при этом человеческие лейкоцитарные антигены ГКГС-II представляют собой HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR, а толерогенный фактор представляет собой CD47.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, понижение экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I включает в себя делеции человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I по меньшей мере из одного аллеля стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения понижение экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II включает в себя введение одной или более вставок в СИТА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, способы дополнительно включают снижение экспрессии СИТА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, усиление экспрессии толерогенного фактора включает в себя встраивание толерогенного фактора в локус «безопасная гавань» по меньшей мере одного аллеля стволовой клетки.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, толерогенный фактор дополнительно включает PD-L1 и/или HLA-G. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, гипоиммуногенная стволовая клетка не экспрессирует HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, гипоиммуногенная стволовая клетка не экспрессирует HLA-DP, HLA-DQ, и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, гипоиммуногенная стволовая клетка не экспрессирует СИТА.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один цветной графический материал. Копии данного патента или патентной заявки с цветными графическими материалами будут предоставлены Ведомством по запросу и при уплате необходимой пошлины.

Фиг. 1A-1J демонстрируют, что редактирование генома устраняет экспрессию полиморфных HLA-A/B/C и HLA класса II и обеспечивает экспрессию иммуномодулирующих факторов из локуса «безопасная гавань» *AAVS1*. Фиг. 1A схематически представляет стратегию нокаута HLA-B и HLA-C CRISPR/Cas9. Каждая пара ножниц представляет две sgRNA. Фиолетовые, красные и зеленые стрелки указывают на праймеры, применяемые для скрининга ПЦР. Фиг. 1B представляет схематическое представление стратегии нокаута HLA-A. Каждая пара ножниц представляет одну sgRNA. Желтые стрелки показывают праймеры, применяемые для скрининга ПЦР. Фиг. 1C представляет контурные графики FACS, демонстрирующие успешное удаление HLA-A/B/C в HUES8. Клетки дикого типа (ДТ) или клетки с нокаутом HLA-A/B/C (КО) обрабатывали ИФН- γ в течение 48 часов перед окрашиванием указанными антителами. Фиг. 1D демонстрирует стратегию нацеливания локуса *СИТА*. Синие стрелки указывают на праймеры, применяемые для ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. Фиг. 1E демонстрирует среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) HLA-DR в дифференцированных CD144⁺ ЕС ДТ и КО. Фиг. 1F представляет схематическое описание генотипов клеточных линий ДТ, КО, KI-PHC и KIPC. Фиг. 1G демонстрирует стратегию нокина

иммуномодулирующих молекул. Ножницы представляют собой sgРНК, нацеленную на локус *AAVS1*. Черные и серые стрелки указывают на праймеры, применяемые для скрининга ПЦР. Фиг. 1Н демонстрирует экспрессию PD-L1 и HLA-G в клетках KI-РНС. Фиг. 1I демонстрирует экспрессию CD47 и в клетках KI-РНС. СИФ относительно клеток ДТ указаны справа от гистограмм. Фиг. 1J демонстрирует экспрессию PD-L1 и CD47 в клетках KI-PC.

Фиг. 2А-2Е демонстрируют, что клеточные линии КО и KI сохраняют плюрипотентность и способность к дифференцировке. Фиг. 2А демонстрирует иммунофлуоресценцию, указывающую на то, что маркеры плюрипотентности экспрессируются плюрипотентными стволовыми клетками ДТ, КО, KI-РНС и KI-PC человека (hPSC - human pluripotent stem cell). Шкала 200 мкм. Фиг. 2В демонстрирует что кПЦР в реальном времени была проведена для исследования трехлинейных маркеров после того, как hPSC ДТ, КО, KI-РНС и KI-PC были дифференцированы в три указанных зародышевых листка. Относительная количественная оценка была нормализована для каждого уровня гена в немодифицированных hPSC. Фиг. 2С демонстрирует G-бэндинг хромосом в клеточных линиях КО, KI-РНС и KI-PC, демонстрирующих нормальные кариотипы после последовательных циклов геномной инженерии. Фиг. 2D представляет таблицу, показывающую основанный на ПЦР анализ экзонных нецелевых сайтов в сконструированных линиях hPSC. Фиг. 2Е демонстрирует результаты секвенирования захваченной мишеней, демонстрирующие % прочтений с измененной последовательностью на нецелевых сайтах в ДТ и сконструированных линиях hPSC. Черный кружок, сайт SNP/полиморфизм (PM); красный кружок, отредактированный нецелевой сайт; синий кружок, целевой сайт СИТА в качестве положительного контроля.

Фиг. 3А-3D демонстрируют снижение активности Т-клеток против клеточных линий КО и KI-РНС *in vitro*. Фиг. 3А представляет диаграммы рассеяния, показывающие процент пролиферирующих Т-клеток в CD3⁺ (левая вставка, n = 8 доноров), CD4⁺ (средняя вставка, n=6 доноров), и CD8⁺ популяций Т-клеток (правая вставка, n=6 доноров) при совместном культивировании в течение 5 дней с ЕС ДТ, КО или KI. Только культивированные отдельно Т-клетки применяли в качестве отрицательного контроля; Т-клетки, активированные шариками CD3/CD28, служили положительными контролями. Парный односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Данные представляют собой средние значения $\pm$ СОС; *p<0,05; **p<0,01. Фиг. 3В представляет диаграммы рассеяния, показывающие процент CD69⁺ (верхняя вставка) и CD25⁺ клеток (нижняя вставка) в CD3⁺ (левая вставка), CD4⁺ (средняя вставка), и CD8⁺ популяций Т-клеток (правая вставка) после пятидневного совместного культивирования с ЕС ДТ, КО или KI (n = 11 доноров на всех диаграммах). Использовали те же отрицательный и положительный контроли, что и в А. Парный односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Данные представляют собой средние значения $\pm$ СОС; *p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. Фиг. 3С представляет гистограммы концентрации ИФН- γ (левая вставка) и ИЛ-10 (правая вставка) в среде после совместного культивирования ЕС ДТ, КО или KI с CD3⁺ Т-клетками от одного репрезентативного донора. Спонтанное высвобождение только из Т-клеток использовали в качестве отрицательных контролей. Обычный односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Данные представляют собой средние значения $\pm$ станд. откл.; **p<0,01; ***p<0,001. Фиг. 3D представляет гистограмму, представляющую процент цитотоксичности Т-лимфоцитов против ЕС ДТ, КО и KI (n = 6 доноров). Был проведен анализ высвобождения ЛДГ и рассчитан процент цитотоксичности Т-клеток от каждого донора. Парный односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Данные представляют собой средние значения $\pm$ СОС; *p<0,05; **p<0,01.

Фиг. 4А-4Е демонстрируют снижение Т-клеточного ответа против клеточных линий КО и КИ *in vivo*. Фиг. 4А представляет схематическое описание предварительной сенсibilизации аллогенных CD8⁺ Т-клеток и рабочий процесс анализа вторичного Т-клеточного ответа *in vivo*. Фиг. 4В демонстрирует процент увеличения объема тератомы на 5 или 7 день после инъекции Т-клеток по сравнению с днем 0. Генотип тератомы: ДТ (n = 9), КО (n = 7), КИ-РНС (n = 6) и КИ-РС (n = 7). Обычный односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Данные представляют собой средние значения $\pm$ СОС; *p<0,05. Фиг. 4С демонстрирует процент увеличения объема тератомы в день 0 инъекции Т-клеток по сравнению с 2 днями до инъекции. Генотип тератомы: ДТ (n = 9), КО (n = 7), КИ-РНС (n = 6) и КИ-РС (n = 7). Фиг. 4D демонстрирует относительную экспрессию мРНК hCD8 (левая вставка) и ИЛ-2 (правая вставка) в тератомах ДТ (n = 8), КО (n = 7), КИ-РНС (n = 6) и КИ-РС (n = 7) собирали на 8 день после инъекции Т-клеток. Экспрессия была нормализована до RPLP0. Обычный односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Данные представляют собой средние значения $\pm$ СОС; *p<0,05; **p<0,01. Фиг. 4Е демонстрирует репрезентативное окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) тератом ДТ, КО, КИ-РНС и КИ-РС, собранных на 8 день после инъекции Т-клеток. Черные стрелки указывают места инфильтрации Т-лимфоцитов. Шкала 100 мкм.

Фиг. 5А-5D демонстрируют, что линии клеток КИ защищены от ответов НК-клеток и макрофагов. Фиг. 5А представляет диаграмму рассеяния дегрануляции НК-клеток против VSMC ДТ, КО или КИ-РНС (n = 7 доноров). Процент дегранулирующих НК-клеток был нанесен как % CD107a-экспрессирующих клеток CD56⁺ для каждого донора. Культивированные отдельно НК-клетки использовали в качестве отрицательного контроля; НК-клетки, обработанные РМА/иономицином, служили положительным контролем. Парный односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Данные представляют собой средние значения $\pm$ СОС; **p<0,01. Фиг. 5В представляет гистограмма, представляющая процент цитотоксичности НК против VSMC ДТ, КО и КИ-РНС от одного репрезентативного донора при указанных соотношениях эффектор/мишень (Е/Т) (n = 3 повтора). Выполняли анализ высвобождения ЛДГ и рассчитывали % цитотоксичности НК как специфический лизис VSMC, убитых НК-клетками, относительно максимального лизиса клеток. Непарный односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Данные представляют собой средние значения $\pm$ станд. откл.; *p<0,05; ***p<0,001. Фиг. 5С представляет интервальные графики (англ.: time-lapse plots) для анализа фагоцитоза макрофагов (n = 5 доноров моноцитов). Помеченные pHrodo-красным VSMC указанных генотипов, которые были предварительно обработаны (правая вставка) или не обработаны (левая вставка) стауроспорином (STS), совместно инкубированы с макрофагами, полученными из моноцитов, в течение 6 часов. Изображения получали каждые 20 минут с применением системы визуализации живых клеток Celldiscover 7. Была проанализирована общая интегральная интенсивность флуоресценции pHrodo + фагосом на изображение. Данные представляют собой средние значения $\pm$ СОС. Фиг. 5D представляет диаграммы рассеяния анализа фагоцитоза макрофагов при совместной инкубации в течение 4 часов (n = 9 доноров моноцитов, три независимых эксперимента). Условия эксперимента были такими же, как на Фиг. 5С. Парный односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Данные представляют собой средние значения $\pm$ СОС; *p<0,05; **p<0,01. VSMC = клетки гладких мышц сосудов; НК = естественные клетки-киллеры.

Фиг. 6А-6Н демонстрируют, что редактирование генома устраняет экспрессию полиморфных HLA-A/-B/-C и HLA класса II и обеспечивает экспрессию иммуномодулирующих факторов из локуса «безопасная гавань» *AAVS1*. Фиг. 6А демонстрирует ПЦР-подтверждение нокаута HLA-B/-C с применением праймеров,

продemonстрированных на Фиг. 1А. Фиг. 6В демонстрирует ПЦР-подтверждение нокаута HLA-A с применением праймеров, продemonстрированных на Фиг. 1В. Фиг. 6С демонстрирует продукты ПЦР с применением праймеров, фланкирующих сайт разрезания *CITTA*. Фиг. 6D демонстрирует что секвенирование по Сэнгеру показывает, что в клеточной линии КО 1 п.о. (показано красным) была вставлена в один аллель *CITTA* и 12 п.о. (показана штрихами) были удалены из другого аллеля. Фиг. 6Е демонстрирует экспрессию CD144 в дифференцированных эндотелиальных клетках (ЕС) ДТ и КО. Фиг. 6F демонстрирует рабочий процесс создания клеточных линий ES КО и KI. Фиг. 6G демонстрирует ПЦР-подтверждение «нокина» конструкций KI-PHC/KI-PC с применением праймеров, показанных на Фиг. 1G.

Фиг. 7А-7Н демонстрируют, что редактирование генома устраняет экспрессию полиморфных HLA-A/-B/-C и HLA класса II и обеспечивает экспрессию иммуномодулирующих факторов из локуса «безопасная гавань» *AAVS1*. Фиг. 7А демонстрирует экспрессию CD47 в ES-клетках ДТ и KI-PC. СИФ относительно клеток ДТ приведены справа от гистограмм. Фиг. 7В демонстрирует экспрессию HLA-A2 в ES-клетках ДТ, KI-PHC и KI-PC после обработки ИФН-γ, подтверждая удаление классических молекул HLA класса Ia в клеточных линиях KI. Фиг. 7С демонстрирует экспрессию CD144 в дифференцированных ЕС ДТ, KI-PHC и KI-PC. Фиг. 7D демонстрирует HLA-DR среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ), подтверждающая удаление HLA класса II в дифференцированных ЕС KI-PHC и KI-PC. Экспрессию HLA-DR анализировали на CD144⁺ клетках. Фиг. 7Е демонстрирует экспрессию CD140b в дифференцированных VSMC ДТ, КО, KI-PHC и KI-PC. Фиг. 7F представляет контурные графики, демонстрирующие экспрессию PD-L1 и HLA-G в дифференцированных VSMC ДТ и KI-PHC (верхняя левая вставка). Экспрессия CD47 в дифференцированных VSMC ДТ и KI-PHC (верхняя правая вставка). Контурные графики, демонстрирующие экспрессию PD-L1 и CD47 в дифференцированных VSMC ДТ и KI-PC (нижняя левая вставка). Экспрессия CD47 в дифференцированных VSMC ДТ и KI-PC (нижняя правая вставка). Фиг. 7G демонстрирует экспрессию HLA-E в дифференцированных VSMC ДТ, B2M^{-/-}, КО, и KI-PHC при стимуляции ИФН-γ. Серый, изотип; цветные, антитела. Фиг. 7Н демонстрирует относительную экспрессию мРНК HLA-E в дифференцированных VSMC ДТ, B2M^{-/-}, КО, и KI-PHC при стимуляции ИФН-γ или без нее.

Фиг. 8 представляет хроматограммы для секвенирования предсказанных экзонных нецелевых участков в геномодифицированных линиях hPSC и в родительских клетках ДТ.

Фиг. 9 демонстрирует проверку последовательности из NGS, показывающую редактирование нецелевых сайтов в сконструированных линиях hPSC, а также SNP/полиморфные сайты, наблюдаемые в сконструированных линиях, а также в клетках ДТ.

Фиг. 10А-10D демонстрируют снижение активности Т-клеток против клеточных линий КО и KI-PHC. Фиг. 10А демонстрирует стратегию гейтирования, используемую в анализах пролиферации и активации Т-клеток. Фиг. 10В представляет анализ пролиферации Т-клеток одного репрезентативного донора с применением ЕС ДТ, КО и KI-PHC в качестве клеток-мишеней. CD3⁺ (верхняя вставка), CD4⁺ (средняя вставка) и CD8⁺ (нижняя вставка). Только культивированные отдельно Т-клетки применяли в качестве отрицательного контроля; Т-клетки, обработанные шариками CD3/CD28, служили положительными контролями. Фиг. 10С демонстрирует индуцируемую доксициклином экспрессию PD-L1 в VSMC ДТ. Фиг. 10D представляет диаграмму рассеяния процента пролиферирующих Т-клеток в популяциях CD3⁺ (левая вставка), CD4⁺ (средняя вставка), и CD8⁺ (правая вставка), совместно культивируемых в течение 7 дней с VSMC с или без доксициклин-индуцированной экспрессии PD-L1 (n = 4 донора). Т-клетки с пониженным сигналом CFSE были количественно определены как пролиферирующие клетки. Только культивированные отдельно Т-клетки служили в качестве отрицательного контроля; Т-клетки, активированные шариками

CD3/CD28, использовали в качестве положительного контроля. Парный двусторонний t-тест; данные представляют собой средние значения $\pm$ СОС; * $p < 0,05$; н.з., не имеет значения.

Фиг. 11А-11Е демонстрируют, что линии клеток К1 защищены от ответов НК-клеток и макрофагов. Фиг. 11А демонстрирует экспрессию CD69 и PD-1, исследованную в до и после примирования одного репрезентативного донора CD8⁺ Т донора. Фиг. 11В представляет стратегию гейтирования для анализа дегрануляции НК-клеток. Фиг. 11С представляет контурные графики FACS для анализа дегрануляции НК-клеток для одного репрезентативного донора. Фиг. 11D демонстрирует СИФ CD47, подтверждающую устранение экспрессии CD47 в дифференцированных VSMC CD47^{-/-}. Фиг. 11Е представляет флуоресцентные изображения, демонстрирующие поглощенные VSMC, предварительно помеченные pHrodo-красным, после 4-часовой совместной инкубации с макрофагами от одного репрезентативного донора. VSMC либо предварительно обрабатывали стауропорином, либо не обрабатывали. Изображения представляют собой наложения светлого поля и красного канала, а флуоресцирующие фагосомы выделяются после маскирования с помощью программного обеспечения для анализа изображений ZEN. Шкала, 200 мкм.

Фиг. 12А-12С демонстрируют преодоление барьера HLA. Фиг. 12А представляет схематическое изображение энхансом ГКГС класса II и класса I. Нацеливаясь на СИТА, главный регулятор экспрессии ГКГС класса II, предотвращает экспрессию ГКГС класса II. Промоторы генов ГКГС класса I являются более сложными, и, таким образом, делеция NLRC5, гомологов СИТА, регулирующих экспрессию ГКГС класса I, приводит только к уменьшению экспрессии ГКГС класса I. Фиг. 12В демонстрирует уменьшение индуцированной ИФН- γ экспрессии ГКГС класса I в NLRC5^{-/-}-СИТА-/hPSC. ДТ или указанные клетки КО HUES9 стимулировали ИФН- γ в течение 48 часов и затем окрашивали на экспрессию ГКГС класса I, зарегистрированную с помощью FACS. Делеция вспомогательной цепи B2M полностью предотвращает поверхностную экспрессию ГКГС класса I, но делает эти клетки восприимчивыми к уничтожению НК-клеток. Фиг. 12С демонстрирует стратегию нацеливания для выборочного удаления полиморфных генов HLA HLA-A/B/C из генома hPSC. Предоставляются схематические изображения стратегии нацеливания. Также продемонстрировано ПЦР-подтверждение соответствующих делеций в геноме HUES8.

Фиг. 13А-13Е демонстрируют стратегию нокина (KI) толерогенных факторов в локусе «безопасная гавань». Фиг. 13А-13В представляют схематическое изображение конструктора KI. Фиг. 13С демонстрирует подтверждение потери экспрессии HLA класса I в двух клонах KI (C8 и C12). Фиг. 13D демонстрирует успешную сверхэкспрессию PD-L1 и CD47 в HLA-дефицитных клонах KI C8 и C12 из локуса «безопасная гавань» AAVS1. Фиг. 13Е демонстрирует, что конечной целью является обратное конструирование иммуномодулирующей активности человеческих трофобластов (PD-L1, HLA-G, CD47 высокий), которые вызывают толерантность к полуаллогенному плоду (50 % родительского и, следовательно, чужеродного происхождения) во время беременности.

Фиг. 14А-14В демонстрируют функциональные иммуно-молчащие клетки для трансплантации. Фиг. 14А демонстрирует подтверждение экспрессии HLA в модифицированной hPSC (HUES8). Потеря экспрессии ГКГС класса I была подтверждена с помощью FACS в двух независимых клонах HLA-A/B/C-/ СИТА-/КО - D1 и F2. Наблюдалась аналогичная морфология эндотелиальных клеток (ЕС), происходящих из клона КО. Индуцированная ИФН- γ экспрессия ГКГС класса II в ЕС указанных генотипов демонстрирует потерю HLA класса II в клонах HLA-A/B/C-/ СИТА-/КО. Фиг. 14В демонстрирует анализ пролиферации Т-клеток (верхняя вставка) и анализ дегрануляции НК-клеток (нижняя вставка). Для анализа пролиферации Т-клеток (верхняя вставка) клон Т-клеток, меченный CFSE, использовали для оценки пролиферации Т-клеток против ЕС, полученных из HUES9 указанных генотипов. Потеря сигнала CFSE пропорциональна пролиферации Т-

клеток, опосредованной иммуностимулирующей активности этих клеток. В то время как ЕС ДТ вызывает заметную пролиферацию Т-клеток в течение 7-дневного периода, пролиферация Т-клеток понижена в присутствии двух независимых клонов NLRC5-/-СИТА-/-КО и отсутствует при совместной инкубации с B2M-/- СИТА-/-КО ЕС. Для анализа дегрануляции NK-клеток (нижняя вставка) HLA-дефицитная VSMC (D1, F2) запускает усиленную дегрануляцию NK-клеток по сравнению с клетками ДТ. РМА/иономицин или HLA-дефицитные клетки 221 использовали в качестве положительного контроля для дегрануляции NK. NC = отрицательный контроль, только NK-клетки.

Фиг. 15A-15B демонстрируют получение доклинических данных. Фиг. 15A демонстрирует улучшенное приживание иммунных молчащих плюрипотентных стволовых клеток человека у гуманизированных мышей. Мышам NSG, восстановленным с помощью иммунной системы человека (BLT), трансплантировали ES-клетки указанного генотипа и позволяли образовать тератому. Через 4-6 недель после трансплантации размер и консистенция тератомы оценивали слепым методом. В то время как тератома ДТ демонстрирует признаки отторжения, рост NLRC5-/-СИТА-/- и B2M-/-СИТА-/- стволовых клеток менее ограничен, что позволяет предположить, что они являются защищенными иммунитетом. Фиг. 15B демонстрирует что введение индуцибельного переключателя уничтожения каспазой 9 (iCasp9) может привести к удалению клеток после обработки димеризатором CID. Изображение выключателя уничтожения iCasp9 (слева). Титрование дозы димеризатора CID и временная динамика транзитно трансфицированных клеток 293T (справа). В конце концов, переключатель уничтожения iCasp9 будет интегрирован в локус «безопасная гавань» для модифицированных иммунных молчащих стволовых клеток.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В изобретениях в данном документе описаны используют технологии редактирования генома (например, системы CRISPR/Cas или TALEN) для понижения или устранения экспрессии критических генов иммунного ответа или, в некоторых случаях, вставки факторов, индуцирующих толерантность, в стволовых клетках, что делает их и дифференцированные клетки полученные из них гипои иммуногенными и менее подверженными иммунному отторжению субъектом, которому трансплантируются такие клетки.

Используемый в данном документе для характеристики клетки термин «гипои иммуногенная» обычно означает, что такая клетка менее склонна к иммунному отторжению субъектом, которому такие клетки трансплантируются. Например, относительно неизменной клетки дикого типа такая гипои иммуногенная клетка может составлять около 2,5 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97,5 %, 99 % или более или менее подвержены иммунному отторжению субъектом, которому трансплантируются такие клетки. В некоторых аспектах технологии редактирования генома (например, системы CRISPR/Cas или TALEN) применяются для модуляции (например, понижения или устранения) экспрессии генов ГКГС-I и ГКГС-II.

В некоторых вариантах осуществления, изобретения, описанные в данном документе, относятся к стволовым клеткам, геном которых был изменен для понижения или удаления критических компонентов экспрессии HLA. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, описанные в данном документе, относятся к стволовым клеткам, геном которых был изменен для вставки одного или более факторов, индуцирующих толерантность. Данное изобретение предполагает изменение полинуклеотидных последовательностей-мишеней любым способом, доступным квалифицированному специалисту в данной области техники, например, с применением системы TALEN, ZFN или CRISPR/Cas. В таких системах CRISPR/Cas могут использоваться различные белки Cas (Haft et al. PLoS Comput Biol. 2005;1(6)e60). В

некоторых вариантах осуществления данного изобретения, система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа I. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа II. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа V. Следует понимать, что хотя примеры способов, в которых используются CRISPR/Cas (например, Cas9 и Cpf1) и TALEN, подробно описаны в данном документе, изобретение не ограничивается применением этих способов/систем. В данном документе могут быть применены другие способы нацеливания полинуклеотидных последовательностей для понижения или устранения экспрессии в клетках-мишенях, известные специалистам в данной области техники.

Данные изобретения предполагают изменение, например, модификацию или расщепление, полинуклеотидных последовательностей-мишеней в клетке для любой цели, но, в частности, такое, что экспрессия или активность кодируемого продукта понижена или устранена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидная последовательность-мишень в клетке (например, ES-клетках или ИПСК) изменяется с образованием мутантной клетки. Как применяется в данном документе, «мутантная клетка» обычно относится к клетке с результирующим генотипом, который отличается от ее исходного генотипа или клетки дикого типа. В некоторых случаях, «мутантная клетка» проявляет мутантный фенотип, например, когда нормально функционирующий стволовой ген изменяется с применением систем CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидная последовательность-мишень в клетке изменяется для коррекции или исправления генетической мутации (например, для восстановления нормального фенотипа клетки). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидная последовательность-мишень в клетке изменяется, чтобы вызвать генетическую мутацию (например, чтобы нарушить функцию гена или геномного элемента).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение представляет собой индел. Как применяется в данном документе, «индел» относится к мутации, возникшей в результате вставки, делеции или их комбинации. Как будет понятно специалистам в данной области техники, индел в кодирующем участке геномной последовательности приведет к мутации сдвига рамки считывания, если длина инделя не кратна трем. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение представляет собой точечную мутацию. Как применяется в данном документе, «точечная мутация» относится к замене, которая заменяет один из нуклеотидов. Систему CRISPR/Cas можно применять для индукции инделя любой длины или точечной мутации в полинуклеотидной последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение приводит к нокауту полинуклеотидной последовательности-мишени или ее части. Например, нокаутирование полинуклеотидной последовательности-мишени в клетке может быть выполнено *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo* как для терапевтических, так и для исследовательских целей. Нокаут полинуклеотидной последовательности-мишени в клетке может быть пригоден для лечения или предотвращения нарушения, связанного с экспрессией полинуклеотидной последовательности-мишени (например, нокаутирование мутантного аллеля в клетке *ex vivo* и введение субъекту клеток, содержащих нокаутированный мутантный аллель).

Как применяется в данном документе, «нокаут» включает делецию всей или части полинуклеотидной последовательности-мишени способом, который препятствует функции полинуклеотидной последовательности-мишени или продукта ее экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение приводит к понижению экспрессии полинуклеотидной последовательности-мишени. Термины «снижение», «пониженный», «понижение» и «снижение» используются в данном документе, как правило, для обозначения снижения на

статистически значимую величину. Однако, во избежание сомнений, «сниженный», «пониженный», «понижение», «снижение» включает уменьшение, по меньшей мере, на 10 % по сравнению с эталонным уровнем, например, снижение на по меньшей мере около 20 %, или на по меньшей мере около 30 %, или на по меньшей мере около 40 %, или на по меньшей мере около 50 %, или на по меньшей мере около 60 %, или на по меньшей мере около 70 %, или на по меньшей мере около 80 %, или на по меньшей мере около 90 %, или до и включая снижение на 100 % (т.е. уровень отсутствия по сравнению с эталонным образцом) или любое снижение на между 10–100 % по сравнению с эталонным уровнем.

Термины «увеличенный», «увеличение», «усиление» или «активирование» все применяются в данном документе, чтобы в общем означать увеличение на статически значимую величину; во избежание каких-либо сомнений, термины «увеличенный», «увеличение», «усиление» или «активирование» означают увеличение по меньшей мере на 10 % по сравнению с эталонным уровнем, например, увеличение на по меньшей мере около 20 %, или на по меньшей мере около 30 %, или на по меньшей мере около 40 %, или на по меньшей мере около 50 %, или на по меньшей мере около 60 %, или на по меньшей мере около 70 %, или на по меньшей мере около 80 %, или на по меньшей мере около 90 % или до и включая увеличение на 100 % или любое увеличение на между 10-100 % по сравнению с эталонным уровнем, или на по меньшей мере около в 2 раза, или на по меньшей мере около в 3 раза, или на по меньшей мере около в 4 раза, или на по меньшей мере около в 5 раз или на по меньшей мере около в 10 раз, или любое увеличение между 2 до 10 раз или более по сравнению с эталонным уровнем.

Термин «статистически значимый» или «значительно» относятся к статистической значимости и обычно означает два стандартных отклонения (2 станд. откл.) ниже нормальной или более низкой концентрации маркера. Термин относится к статистическим свидетельствам того, что существует разница. Она определяется как вероятность принятия решения об отклонении нулевой гипотезы, когда нулевая гипотеза действительно верна. Решение часто принимается с применением р-значения.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение представляет собой гомозиготное изменение. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение представляет собой гетерозиготное изменение.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение приводит к корректировке полинуклеотидной последовательности-мишени с нежелательной последовательности на желаемую последовательность. Системы CRISPR/Cas можно применять для исправления любого типа мутации или ошибки в полинуклеотидной последовательности-мишени. Например, системы CRISPR/Cas можно применять для вставки нуклеотидной последовательности, которая отсутствует в полинуклеотидной последовательности-мишени из-за делеции. Системы CRISPR/Cas также можно применять для делеции или вырезания нуклеотидной последовательности из полинуклеотидной последовательности-мишени из-за инсерционной мутации. В некоторых случаях, системы CRISPR/Cas можно применять для замены неправильной нуклеотидной последовательности правильной нуклеотидной последовательностью (например, для восстановления функции полинуклеотидной последовательности-мишени, которая нарушена из-за потери мутации функции).

Системы CRISPR/Cas могут изменять полинуклеотиды-мишени с удивительно высокой эффективностью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, эффективность изменения составляет по меньшей мере около 5 %. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, эффективность изменения составляет по меньшей мере около 10 %. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, эффективность изменения составляет от около 10 % до около 80 %. В некоторых

вариантах осуществления данного изобретения, эффективность изменения составляет от около 30 % до около 80 %. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, эффективность изменения составляет от около 50 % до около 80 %. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, эффективность изменения составляет более чем или равную около 80 %. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, эффективность изменения составляет более чем или равную около 85 %. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, эффективность изменения составляет более чем или равную около 90 %, около 91 %, около 92 %, около 93 %, около 94 %, около 95 %, около 96 %, около 97 %, около 98 % или около 99 %. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, эффективность изменения составляет равную около 100 %.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидной последовательности-мишени представляет собой геномную последовательность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидной последовательности-мишени представляет собой геномную последовательность человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидной последовательности-мишени представляет собой геномную последовательность млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидной последовательности-мишени представляет собой геномную последовательность позвоночных.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, системы CRISPR/Cas включают белок Cas или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Cas, и по меньшей мере от одной до двух рибонуклеиновых кислот (например, гРНК), которые способны направлять белок Cas к мотиву-мишени полинуклеотидной последовательности-мишени и гибридизоваться с ней. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, системы CRISPR/Cas включают белок Cas или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Cas, и одну рибонуклеиновую кислоту, или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот (например, гРНК), которые способны направлять белок Cas к мотиву-мишени полинуклеотидной последовательности-мишени и гибридизоваться с ней. В данном контексте «белок» и «полипептид» используются взаимозаменяемо для обозначения ряда аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями (т.е. полимера аминокислот), и включают модифицированные аминокислоты (например, фосфорилированные, гликозилированные, гликозольированные, др.) и аналоги аминокислот. Иллюстративные полипептиды или белки включают генные продукты, встречающиеся в природе белки, гомологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas содержит одну или более аминокислотных замен или модификаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одна или более аминокислотных замен включают консервативную аминокислотную замену. В некоторых случаях, замены и/или модификации могут предотвращать или понижать протеолитическую деградацию и/или увеличивать период полужизни полипептида в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas может содержать замену пептидной связи (например, мочевины, тиомочевины, карбамат, сульфонилмочевина и т.д.). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas может содержать встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas может содержать альтернативную аминокислоту (например, D-аминокислоты, бета-аминокислоты, гомоцистеин, фосфосерин и т.д.). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas может содержать модификацию, чтобы включать фрагмент (например, ПЭГилирование, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, блокирование концов и т. д.).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает коровый белок Cas. Иллюстративные коровые белки Cas включают, но не ограничиваются ими, Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 и Cas9. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает белок Cas подтипа *E. coli* (также известный как CASS2). Иллюстративные белки Cas подтипа *E. coli* включают, но не ограничиваются ими, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4 и Cas5e. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает белок Cas подтипа *Ypest* (также известный как CASS3). Иллюстративные белки Cas подтипа *Ypest* включают, но не ограничиваются ими, Csy1, Csy2, Csy3 и Csy4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает белок Cas подтипа *Nmen1* (также известный как CASS4). Иллюстративные белки Cas подтипа *Nmen1* включают, но не ограничиваются ими, Csn1 и Csn2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает белок Cas подтипа *Dvulg* (также известный как CASS1). Иллюстративные белки Cas подтипа *Dvulg* включают, но не ограничиваются ими, Csd1, Csd2 и Cas5d. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает белок Cas подтипа *Tneap* (также известный как CASS7). Иллюстративные белки Cas подтипа *Tneap* включают, но не ограничиваются ими, Cst1, Cst2, Cas5t. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает белок Cas подтипа *Hmag1*. Иллюстративные белки Cas подтипа *Hmag1* включают, но не ограничиваются ими, Csh1, Csh2, Cas5h. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает белок Cas подтипа *Apern* (также известный как CASS5). Иллюстративные белки Cas подтипа *Apern* включают, но не ограничиваются ими, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5 и Cas5a. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает белок Cas подтипа *Mtube* (также известный как CASS6). Иллюстративные белки Cas подтипа *Mtube* включают, но не ограничиваются ими, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4 и Csm5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas включает белок Cas модуля RAMP. Иллюстративный модуль RAMP белков Cas включают, но не ограничиваются ими, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5 и Cmr6.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas представляет собой белок Cas9 или его функциональную часть. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas представляет собой Cas9 из любого вида бактерий или их функциональной части. Белок Cas9 является членом систем CRISPR типа II, которые обычно включают транскодируемую малую РНК (*tracrRNA*), эндогенную рибонуклеазу 3 (*rnc*) и белок Cas. Белок Cas 9 (также известный как CRISPR-ассоциированная эндонуклеаза Cas9/Csn1) представляет собой полипептид, содержащий 1368 аминокислот. Cas 9 содержит 2 эндонуклеазных домена, включая RuvC-подобный домен (остатки 7-22, 759-766 и 982-989), который расщепляет ДНК-мишень, не комплементарную *sgRNA*, и домен нуклеазы HNH (остатки 810-872), которые расщепляют ДНК-мишень, комплементарную *sgRNA*.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas представляет собой белок Cpf1 или его функциональную часть. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas представляет собой Cpf1 из любого вида бактерий или их функциональной части. Белок Cpf1 представляет собой член систем CRISPR типа V. Белок Cpf1 представляет собой полипептид, содержащий около 1300 аминокислот. Cpf1 содержит RuvC-подобный эндонуклеазный домен. Cpf1 расщепляет ДНК-мишень в шахматном порядке с применением одного домена рибонуклеазы. Двухцепочечный разрыв ДНК в шахматном порядке приводит к 5'-липкому концу ДНК из 4 или 5 нуклеотидов.

Как применяется в данном документе термин «функциональная часть» относится к части пептида, которая сохраняет свою способность образовывать комплекс по меньшей мере с одной рибонуклеиновой кислотой (например, гидовая РНК (*gRNA*)) и расщеплять полинуклеотидную последовательность-мишень. В

некоторых вариантах осуществления данного изобретения, функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cas9, выбранных из группы, состоящей из ДНК-связывающего домена, по меньшей мере, одного РНК-связывающего домена, геликазного домена и эндонуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cpf1, выбранных из группы, состоящей из ДНК-связывающего домена, по меньшей мере, одного РНК-связывающего домена, геликазного домена и эндонуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, функциональные домены образуют комплекс.

Следует понимать, что данное изобретение предусматривает различные пути приведения в контакт полинуклеотидной последовательности-мишени с белком Cas (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, экзогенный белок Cas может быть введен в клетку в полипептидной форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белки Cas могут быть конъюгированы или слиты с проникающим в клетки полипептидом или проникающим в клетки пептидом. Как применяется в данном документе, «проникающий в клетку полипептид» и «проникающий в клетку пептид» относятся к полипептиду или пептиду, соответственно, которые облегчают захват молекулы клеткой. Проникающие в клетки полипептиды могут содержать обнаруживаемую метку.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белки Cas могут быть конъюгированы или слиты с заряженным белком (например, который несет положительный, отрицательный или общий нейтральный электрический заряд). Такая связь может быть ковалентной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas может быть слит с суперположительно заряженным GFP для значительного увеличения способности белка Cas проникать в клетку (Cronican et al. ACS Chem Biol.2010; 5(8):747-52). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas может быть слит с доменом трансдукции белка (PTD), чтобы облегчить его проникновение в клетку. Иллюстративные PTD включают Tat, олигоаргинин и пенетратин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas содержит полипептид Cas, слитый с проникающим в клетки пептидом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas содержит полипептид Cas, слитый с PTD.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas можно ввести в клетку, содержащую полинуклеотидную последовательность-мишень в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas (например, Cas9 или Cpf1). Процесс введения нуклеиновых кислот в клетки может осуществляться любым подходящим методом. Подходящие методы включают трансфекцию, опосредованную фосфатом кальция или липидами, электропорацию и трансдукцию или инфекцию с применением вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, нуклеиновая кислота содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, нуклеиновая кислота содержит модифицированную ДНК, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, нуклеиновая кислота содержит мРНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, нуклеиновая кислота содержит модифицированную мРНК, как описано в данном документе (например, синтетическая модифицированная мРНК).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, нуклеиновые кислоты, кодирующие белок Cas, и нуклеиновые кислоты, кодирующие по меньшей мере одну до двух рибонуклеиновых кислот, вводятся в клетку посредством вирусной трансдукции (например, лентивирусной трансдукции).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas образует комплекс с одной — двумя рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок

Cas образует комплекс с двумя рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas образует комплекс с одной рибонуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, белок Cas кодируется модифицированной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе (например, синтетической модифицированной мРНК).

Способы по данному изобретению предполагают применение любой рибонуклеиновой кислоты, которая способна направлять белок Cas и гибридизоваться с мотивом-мишенью полинуклеотидной последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, по меньшей мере одна из рибонуклеиновых кислот содержит tracrRNA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, по меньшей мере одна из рибонуклеиновых кислот содержит CRISPR RNA (crRNA). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одна рибонуклеиновая кислота содержит гидовую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизуется с мотивом-мишенью полинуклеотидной последовательности-мишени в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота содержит гидовую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизуется с мотивом-мишенью полинуклеотидной последовательности-мишени в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, обе из одной до двух рибонуклеиновых кислот содержат гидовую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизуется с мотивом-мишенью полинуклеотидной последовательности-мишени в клетке. Рибонуклеиновые кислоты по данному изобретению могут быть выбраны для гибридизации со множеством различных мотивов-мишеней, в зависимости от конкретной используемой системы CRISPR/Cas и последовательности полинуклеотида-мишени, что будет понятно специалистам в данной области техники. Чтобы минимизировать гибридизацию с последовательностями нуклеиновых кислот, отличными от полинуклеотидной последовательности-мишени также можно выбрать от одной до двух рибонуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, от одной до двух рибонуклеиновых кислот гибридизуются с мотивом-мишенью, который содержит по меньшей мере два несовпадения по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, от одной до двух рибонуклеиновых кислот гибридизуются с мотивом-мишенью, который содержит по меньшей мере одно несовпадение по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, от одной до двух рибонуклеиновых кислот предназначены для гибридизации с мотивом-мишенью, непосредственно примыкающим к мотиву дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемому белком Cas. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, каждый из одного до двух рибонуклеиновых кислот предназначены для гибридизации с мотивами-мишенями, непосредственно примыкающим к мотивам дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемым белком Cas, фланкирующим мутантный аллель, расположенный между мотивами-мишенями.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, по меньшей мере одна из одной — двух рибонуклеиновых кислот содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей рибонуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1-7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей рибонуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1-7.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, по меньшей мере одна из одной — двух рибонуклеиновых кислот содержит последовательность с несовпадением одного нуклеотида последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей рибонуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1-7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, по меньшей мере одна

рибонуклеиновая кислота содержит последовательность с несовпадением одного нуклеотида последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей рибонуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1-7.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, каждая из одной до двух рибонуклеиновых кислот содержит гидовые РНК, которая направляет белок Cas и гибридизуется с мотивом-мишенью полинуклеотидной последовательности-мишени в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизуются с последовательностями на одной и той же цепи последовательности полинуклеотида-мишени. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизуются с последовательностями на противоположных цепях последовательности полинуклеотида-мишени. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) не комплементарны и/или не гибридизуются с последовательностями на противоположных цепях последовательности полинуклеотида-мишени. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизуются с перекрывающимися мотивами-мишенями полинуклеотидной последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизуются для компенсации мотивов-мишеней полинуклеотидной последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, мотив-мишень представляет собой последовательность ДНК из 17–23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, мотив-мишень имеет длину не менее 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, мотив-мишень представляет собой последовательность ДНК из 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, от одной до двух рибонуклеиновых кислот гибридизуются с мотивом-мишенью, который содержит по меньшей мере два несовпадения по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, от одной до двух рибонуклеиновых кислот гибридизуются с мотивом-мишенью, который содержит по меньшей мере одно несовпадение по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. Специалисты в данной области техники поймут, что различные методы могут быть применены для выбора подходящих мотивов-мишеней для минимизации нецелевых эффектов (например, биоинформатики анализ). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, от одной до двух рибонуклеиновых кислот предназначены для гибридизации с мотивом-мишенью, непосредственно примыкающим к мотиву дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемому белком Cas. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, каждый из одного до двух рибонуклеиновых кислот предназначены для гибридизации с мотивами-мишенями, непосредственно примыкающим к мотивам дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемым белком Cas, фланкирующим мутантный аллель, расположенный между мотивами-мишенями.

В некоторых аспектах полинуклеотидная последовательность-мишень в клетке изменяется для понижения или устранения экспрессии и/или активности одного или более критических генов иммунного ответа в клетке с применением системы генетического редактирования (например, TALEN, ZFN, CRISPR/Cas и т. д.). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, данное описание относится к тому, что полинуклеотидной последовательности-мишени в клетке изменена для удаления непрерывного участка

геномной ДНК (например, делеция одного или более критических генов иммунного ответа) из одного или обоих аллелей клетки (например, с применением системы CRISPR/Cas). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидная последовательность-мишень в клетке изменяется для вставки генетической мутации в один или оба аллеля клетки (например, с применением системы CRISPR/Cas). В других вариантах осуществления данного изобретения универсальные стволовые клетки, описанные в данном документе, могут быть предметом подходов к комплементарному редактированию генома (например, с применением системы CRISPR/Cas), посредством чего такие стволовые клетки модифицируются для удаления как непрерывных участков геномной ДНК (например, критических генов иммунного ответа) от одного или обоих аллелей клетки, а также для вставки одного или более факторов, индуцирующих толерантность, таких как HLA-G, CD47 и/или PD-L1, в один или оба аллеля клетки для локального подавления иммунной системы и улучшения приживания трансплантата.

Описанные в данном документе универсальные стволовые клетки могут применяться, например, для диагностики, мониторинга, лечения и/или излечения наличия или прогрессирования заболевания или патологического состояния у субъекта (например, диабета 1 типа или рассеянного склероза). Как применяется в данном документе, «субъект» означает человека или животное. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект представляет собой подростка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, субъект обрабатывается *in vivo*, *in vitro* и/или *in utero*. В некоторых аспектах субъект, нуждающийся в лечении в соответствии с описанными в данном документе способами, имеет патологическое состояние или подозревается или находится в группе повышенного риска развития такого патологического состояния. В некоторых аспектах субъекту трансплантируют универсальные стволовые клетки.

В данном документе представлены новые клетки, композиции и способы, которые можно использовать для борьбы с таким основанным на HLA иммунным отторжением трансплантированных клеток.

Удаление генов ГКГС класса I и ГКГС класса II

В некоторых аспектах, описанные в данном документе изобретения относятся к геномным модификациям одной или более полинуклеотидных последовательностей-мишеней генома стволовых клеток, которые регулируют экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и/или ГКГС-II. В некоторых аспектах, система генетического редактирования применяется для модификации одной или более полинуклеотидных последовательностей-мишеней. В некоторых аспектах, система CRISPR/Cas применяется для удаления одной или более полинуклеотидных последовательностей-мишеней и/или введения инделей в одну или более полинуклеотидных последовательностей-мишеней.

Эффективное удаление барьера HLA может быть достигнуто путем прямого воздействия на полиморфные аллели HLA (HLA-A, -B, -C) и/или делеции компонентов энхансосома ГКГС, таких как СИТА, которые имеют решающее значение для экспрессии HLA.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, нарушается экспрессия HLA. В некоторых аспектах, экспрессия HLA нарушает нацеливание на отдельные HLA (например, нокаут экспрессии HLA-A, HLA-B и/или HLA-C) и/или нацеливание на регуляторы транскрипции экспрессии HLA (например, СИТА). В некоторых аспектах одновременно может быть нацеливание на несколько HLA. Например, HLA-B и HLA-C находятся рядом и могут быть нацелены одновременно. В некоторых аспектах делеция 95 т.п.о. генома стволовых клеток с применением CRISPR/Cas может нокаутировать HLA-B и HLA-

С, а также промоторы двух генов. В некоторых аспектах делеция 13 т.п.о. генома стволовых клеток с применением CRISPR/Cas нокаутирует HLA-A, а также промотор гена.

В некоторых аспектах, описанные в данном документе стволовые клетки не экспрессируют один или более лейкоцитарных антигенов человека (например, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и/или HLA-DR), соответствующих ГКГС-I и/или ГКГС-II и, таким образом, характеризуются как гипои иммуногенные. Например, в некоторых аспектах описанные в данном документе стволовые клетки были модифицированы таким образом, что стволовые клетки или полученные из них дифференцированные стволовые клетки не экспрессируют или демонстрируют пониженную экспрессию одной или более из следующих молекул ГКГС-I: HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых аспектах, один или более из HLA-A, HLA-B и HLA-C могут быть «нокаутированы» в клетке. Клетка, которая имеет нокаутированный ген HLA-A, ген HLA-B и/или ген HLA-C, может демонстрировать пониженную или устраненную экспрессию каждого нокаутированного гена. В некоторых аспектах описанные в данном документе стволовые клетки были модифицированы таким образом, что стволовые клетки или полученные из них дифференцированные стволовые клетки не экспрессируют или демонстрируют пониженную экспрессию одной или более из следующих молекул ГКГС-II: HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR. В некоторых аспектах, один или более инделей вставлены в регулятор транскрипции экспрессии HLA класса II (например, СИТА). Клетка, которая имеет вставки, вставленные в СИТА (например, нацеленные на экзон 1), может демонстрировать пониженную или устраненную экспрессию HLA-DP, HLA-DQ и/или HLA-DR.

В некоторых аспектах, данное описание относится к стволовой клетке (например, гипои иммуногенную стволовую клетку) или ее популяции, имеющей геном, в котором ген HLA-A был отредактирован для делеции непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул ГКГС класса I в клетке или ее популяции. Непрерывный участок геномной ДНК может быть удален путем приведения в контакт клетки или ее популяции с белком Cas или нуклеиновой кислотой, кодирующей белок Cas, и по меньшей мере одной рибонуклеиновой кислотой или по меньшей мере одной парой рибонуклеиновых кислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-2.

В некоторых аспектах, данное описание относится к способу изменения последовательности-мишени HLA-A в клетке, включающий приведение в контакт последовательности HLA-A с белком (Cas), ассоциированным с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами, и по меньшей мере одной рибонуклеиновой кислотой или по меньшей мере одной парой рибонуклеиновых кислот, в которых рибонуклеиновые кислоты направляют белок Cas и гибридизуются с мотивом-мишенью полинуклеотидной последовательности-мишени HLA-A, при этом полинуклеотидная последовательность-мишень HLA-A расщепляется, и при этом по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-2.

В некоторых аспектах, данное описание относится к стволовой клетке (например, гипои иммуногенную стволовую клетку) или ее популяции, имеющей геном, в котором ген HLA-B отредактирован для делеции непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул ГКГС класса I в клетке или ее популяции. Непрерывный участок геномной ДНК может быть удален путем приведения в контакт клетки или ее популяции с белком Cas или нуклеиновой кислотой, кодирующей белок Cas, и по меньшей мере одной рибонуклеиновой кислотой или по меньшей мере одной парой рибонуклеиновых кислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-4.

В некоторых аспектах, данное описание относится к способу изменения последовательности-мишени HLA-B в клетке, включающий приведение в контакт последовательности HLA-B с белком (Cas),

ассоциированным с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами, и по меньшей мере одной рибонуклеиновой кислотой или по меньшей мере одной парой рибонуклеиновых кислот, в которых рибонуклеиновые кислоты направляют белок Cas и гибридизуются с мотивом-мишенью полинуклеотидной последовательности-мишени HLA-B, при этом полинуклеотидная последовательность-мишень HLA-B расщепляется, и при этом по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-4.

В некоторых аспектах, данное описание относится к стволовой клетке (например, гипоиimmunогенную стволовую клетку) или ее популяции, имеющей геном, в котором ген HLA-C отредактирован для делеции непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул ГКГС класса I в клетке или ее популяции. Непрерывный участок геномной ДНК может быть удален путем приведения в контакт клетки или ее популяции с белком Cas или нуклеиновой кислотой, кодирующей белок Cas, и по меньшей мере одной рибонуклеиновой кислотой или по меньшей мере одной парой рибонуклеиновых кислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5-6.

В некоторых аспектах, данное описание относится к способу изменения последовательности-мишени HLA-C в клетке, включающий приведение в контакт последовательности HLA-C с белком (Cas), ассоциированным с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами, и по меньшей мере одной рибонуклеиновой кислотой или по меньшей мере одной парой рибонуклеиновых кислот, в которых рибонуклеиновые кислоты направляют белок Cas и гибридизуются с мотивом-мишенью полинуклеотидной последовательности-мишени HLA-C, при этом полинуклеотидная последовательность-мишень HLA-C расщепляется, и при этом по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5-6.

В некоторых аспектах, данное описание относится к стволовой клетке (например, гипоиimmunогенную стволовую клетку) или ее популяции, имеющей геном, в котором ген трансактиватора класса II (СИТА) был отредактирован для введения одного или более инделей в экзон 1, тем самым уменьшая или устраняя поверхностную экспрессию молекул ГКГС класса II (например, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR) в клетке или ее популяции. Один или более инделей могут быть введены путем приведения в контакт клетки или ее популяции с белком Cas или нуклеиновой кислотой, кодирующей белок Cas, и рибонуклеиновой кислотой, состоящей из SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах экзон 1 СИТА нацелен на рибонуклеиновую кислоту, состоящую из SEQ ID NO: 7, и по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-2.

В определенных аспектах данное описание предоставляет способ введения одной или более инделей в клетку, включающий приведение в контакт последовательности СИТА (например, экзона 1 СИТА) с белком Cas или нуклеиновой кислотой, кодирующей белок Cas, и рибонуклеиновой кислотой, при этом рибонуклеиновая кислота направляет белок Cas и гибридизуется с мотивом-мишенью полинуклеотидной последовательности-мишени СИТА, при этом один или более инделей введены в экзон 1 полинуклеотидной последовательности СИТА, и при этом рибонуклеиновая кислота имеет последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах экзон 1 СИТА нацелен на рибонуклеиновую кислоту, состоящую из SEQ ID NO: 7, и по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-2.

Вставка толерогенных факторов

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или более толерогенных факторов могут быть вставлены или повторно вставлены в линии стволовых клеток, с отредактированным геномом, для создания иммунно-привилегированных универсальных донорских стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения универсальные стволовые клетки, описанные в данном документе, были дополнительно модифицированы для экспрессии одного или более толерогенных факторов. Иллюстративные толерогенные факторы включают, не ограничиваясь ими, один или более из HLA-G, PD-L1 и CD47. Экспрессия таких толерогенных факторов может подавлять иммунное отторжение.

Авторы данного изобретения применяли системы редактирования генома, такие как управляемая CRISPR/Cas система направляемой гомологией репарации (HDR), для облегчения вставки толерогенных факторов в локус «безопасная гавань», такого как локус *AAVS1*, для активного ингибирования иммунного отторжения. В некоторых аспектах донорская плаزمида содержит каскету экспрессии HLA-G. В некоторых аспектах донорская плазмида содержит каскету экспрессии PD-L1. В некоторых аспектах донорская плазмида содержит каскету экспрессии CD47. В некоторых аспектах донорская плазмида содержит каскету экспрессии PD-L1, HLA-G и CD47. В некоторых аспектах донорская плазмида содержит каскету экспрессии PD-L1 и CD47. Донорская плазмида, содержащая каскету экспрессии, может нацеливаться на локус *AAVS1* стволовой клетки (например, гипои иммуногенной стволовой клетки). В некоторых аспектах донорская плазмида нацелена на локус *AAVS1* гипои иммуногенной стволовой клетки с помощью рибонуклеиновой кислоты, при этом рибонуклеиновая кислота имеет последовательность SEQ ID NO: 8.

В некоторых аспектах данное описание относится к стволовой клетке (например, гипои иммуногенную стволовую клетку) или ее популяции, имеющей геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии HLA-G. В некоторых аспектах, данное описание относится к способу изменения генома стволовых клеток для экспрессии HLA-G. В некоторых аспектах по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот может применяться для облегчения вставки HLA-G в линию стволовых клеток.

В некоторых аспектах данное описание относится к стволовой клетке (например, гипои иммуногенную стволовую клетку) или ее популяции, имеющей геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии PD-L1. В некоторых аспектах, данное описание относится к способу изменения генома стволовых клеток для экспрессии PD-L1. В некоторых аспектах по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот может применяться для облегчения вставки PD-L1 в линию стволовых клеток.

В некоторых аспектах данное описание относится к стволовой клетке (например, гипои иммуногенную стволовую клетку) или ее популяции, имеющей геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии CD-47. В некоторых аспектах, данное описание относится к способу изменения генома стволовых клеток для экспрессии CD-47. В некоторых аспектах по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот может применяться для облегчения вставки CD-47 в линию стволовых клеток.

В некоторых аспектах данное описание относится к гипои иммуногенной стволовой клетке (например, стволовой клетке, модифицированной для устранения экспрессии HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR) или его популяции, имеющей геном, в котором геном стволовых клеток был модифицирован для экспрессии PD-L1, HLA-G и CD47. В некоторых аспектах, данное описание относится к способу изменения генома стволовых клеток для экспрессии PD-L1, HLA-G и CD47.

В некоторых аспектах данное описание относится к гипоиимуногенной стволовой клетке (например, стволовой клетке, модифицированной для устранения экспрессии HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR) или его популяции, имеющей геном, в котором геном стволовых клеток был модифицирован для экспрессии PD-L1 и CD47. В некоторых аспектах, данное описание относится к способу изменения генома стволовых клеток для экспрессии PD-L1 и CD47.

Универсальные стволовые клетки

В определенных аспектах описанные в данном документе изобретения относятся к универсальным стволовым клеткам. Универсальные стволовые клетки могут содержать пониженную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и повышенную или сверхэкспрессию одного или более толерогенных факторов. В некоторых аспектах универсальными стволовыми клетками являются HLA-A^{-/-}, HLA-B^{-/-}, HLA-C^{-/-}, и СПТА^{индел/индел} клетки, которые демонстрируют повышенную экспрессию HLA-G, PD-L1 и CD47.

В некоторых аспектах стволовые клетки (например, универсальные стволовые клетки), описанные в данном документе, обладают одним или более свойствами. Например, стволовые клетки сохраняют способность к дифференцировке, демонстрируют пониженный ответ Т-клеток, проявляют защиту от ответа НК-клеток и демонстрируют пониженное поглощение макрофагами.

Универсальные стволовые клетки могут сохранять плюрипотентность, выполнять дифференцировку по трем линиям и сохранять нормальный кариотип. Например, универсальные стволовые клетки могут сохранять экспрессию одного или более из NANOG, OCT4, SSEA3 и TRA-1-60. В некоторых аспектах универсальные стволовые клетки дифференцируются в три зародышевых листка (например, эктодерму, мезодерму и энтодерму) и поддерживают экспрессию всех маркеров клонов.

В некоторых аспектах универсальные стволовые клетки демонстрируют пониженные Т-клеточные адаптивные иммунные ответы. Например, Т-клетки (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки) демонстрируют пониженное примирование и активацию против универсальных стволовых клеток. Кроме того, Т-клетки демонстрируют пониженную секрецию цитокинов против универсальных стволовых клеток. Пониженная экспрессия молекул HLA-I и HLA-II может привести к снижению примирования CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток против универсальных клеток. В некоторых аспектах экспрессия PD-L1 дополнительно подавляет активацию CD8⁺ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, универсальные стволовые клетки защищены от отторжения, опосредованного НК-клетками. Универсальные стволовые клетки могут быть защищены от опосредованного НК-клетками отторжения в результате экспрессии HLA-G. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения универсальные стволовые клетки демонстрируют пониженное поглощение макрофагами. Сверхэкспрессия CD47 и/или экспрессия PD-L1 в универсальных клетках может минимизировать или ингибировать поглощение универсальных клеток макрофагами.

Некоторые определения

Если здесь не определено иное, научные и технические термины, используемые в связи с данной заявкой, имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число.

Как применяется в данном документе термин «содержащий» или «содержит» используется в отношении композиций, способов, наборов и их соответствующего компонента(-ов), которые являются существенными для изобретения, но открытыми для включения неопределенных элементов, существенных или нет.

Как применяется в данном документе термин «состоящий по существу из» относится к тем элементам, которые требуются для данного варианта осуществления. Этот термин допускает наличие дополнительных элементов, которые существенно не влияют на основную и новую или функциональную характеристику(-и) этого варианта осуществления данного изобретения.

Термин «состоящий из» относится к композициям, способам, наборам и их соответствующим компонентам, как описано в данном документе, которые исключают любой элемент, не упомянутый в этом описании варианта осуществления данного изобретения.

За исключением рабочих примеров или если указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакции, используемые в данном документе, следует понимать как измененные во всех случаях термином «около». Термин «около», когда он используется в связи с процентами, может означать $\pm 1\%$.

Используемые в данном документе формы единственного включают также формы множественного числа, если контекст явно не предписывает иное. Точно так же слово «или» предназначено для включения «и», если контекст явно не предписывает иное. Кроме того, следует понимать, что все размеры оснований или размеров аминокислот и все значения молекулярной массы или молекулярной массы, приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными и представлены для описания. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании этого описания, подходящие способы и материалы описаны ниже. Термин «содержит» означает «включает». Аббревиатура «например» происходит от латинского *exempli gratia* и используется в данном документе для обозначения неограничивающего примера. Таким образом, сокращение «например» является синонимом термина «например».

Все принципы заявки PCT/US2016/031551, поданной 9 мая 2016 г., включены в данный документ посредством ссылки. Все другие указанные патенты и публикации явно включены в данный документ посредством ссылки с целью описания и описания, например, методологий, описанных в таких публикациях, которые могут быть использованы в связи с описанием. Эти публикации предоставляются исключительно для их описания до даты подачи данной заявки. Ничто в этом отношении не следует истолковывать как признание того, что изобретатели не имеют права датировать такое описание задним числом на основании предшествующего изобретения или по любой другой причине. Все заявления относительно даты или представления относительно содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не являются признанием в отношении правильности дат или содержания этих документов.

В той степени, в которой это уже не указано, специалистам в данной области техники будет понятно, что любой из различных вариантов осуществления данного изобретения, описанных и проиллюстрированных в данном документе, может быть дополнительно модифицирован для включения функций, показанных в любом из других вариантов осуществления данного изобретения, описанных в данном документе.

Следующий пример иллюстрирует некоторые варианты осуществления данного изобретения и аспекты изобретения. Для специалистов в соответствующей области техники будет очевидно, что различные модификации, добавления, замены и т.п. могут быть выполнены без изменения сущности или объема изобретения, и такие модификации и вариации входят в объем изобретения, как определено в формуле

изобретения, которая следуют ниже. Следующие ниже примеры никоим образом не ограничивают изобретение.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ПРИМЕРЫ

Виды терапии с применением клеток, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека для трансплантации, могут революционизировать способы лечения заболеваний. Основным препятствием для их клинического применения является отторжение аллогенных клеток иммунной системой реципиента. Стратегии, направленные на преодоление этого иммунного барьера, включают создание банков клеток с определенными гаплотипами HLA (Nakajima et al., 2007; Taylor et al., 2005) и создание пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Однако многочисленные ограничения (de Rham and Villard, 2014; Tapia and Scholer, 2016) запрещают более широкое применение этих подходов и подчеркивают необходимость в «готовых к применению» клеточных препаратах, которые можно легко вводить любому нуждающемуся в этом пациенту. В качестве первого шага для создания такого универсального препарата стволовых клеток удаление HLA класса I необходимо для предотвращения презентации клеточных пептидов цитотоксическим CD8⁺ Т-клеткам, учитывая, что молекулы HLA класса I экспрессируются практически во всех ядродержащих клетках. Более того, необходимо учитывать удаление HLA класса II, поскольку они также являются высокополиморфными и могут присутствовать в определенных типах донорских клеток, происходящих от hPSC, в частности, в профессиональных антигенпредставляющих клетках (АПК) и эндотелиальных клетках (EC) при стимуляции ИФН- γ (Ting and Trowsdale, 2002). Недавно мощность системы редактирования генома CRISPR/Cas9 предоставила инструмент для вмешательства в экспрессию HLA класса I в hPSC или гематopoэтических клетках, нокаутировав вспомогательную цепь бета-2-микроглобулина (B2M) (Mandal et al., 2014; Mattapally et al., 2018; Meissner et al., 2014; Riobobos et al., 2013; Wang et al., 2015), а также для устранения экспрессии HLA класса II путем воздействия на его главный регулятор транскрипции, CIITA (Chen et al., 2015; Mattapally et al., 2018). Однако делеция B2M также предотвращает поверхностную экспрессию неполиморфных неклассических молекул HLA класса Ib HLA-E и HLA-G, которые необходимы для поддержания толерантности NK-клеток (Ferreira et al., 2017; Lee et al., 1998b). Более того, было обнаружено, что B2M-дефицитные клетки все еще отторгаются аллогенными CD8⁺ Т-клетками (Glas et al., 1992). Следовательно, индивидуальная делеция генов HLA-A/-B/-C может представлять более благоприятную стратегию для защиты донорских клеток от цитотоксичности, опосредованной CD8⁺ Т-клетками, без потери защитной функции HLA класса Ib.

Другие подходы, которые были исследованы для создания «готовых к применению» клеточных препаратов, включают экспрессию коингибирующих молекул и блокирование костимулирующих сигналов, необходимых для полной активации Т-клеток за пределами взаимодействия с HLA-Т-клеточным рецептором (TCR). Например, эктопическая экспрессия ингибиторов контрольных точек Т-клеток PD-L1 и CTLA-4Ig, как было показано, защищает стволовые клетки от отторжения в модели гуманизированных мышей (Rong et al., 2014). Тем не менее, этот подход оставил HLA-барьер нетронутым, что может привести к сверхострому отторжению трансплантированных клеток, преципитированных уже существующими анти-HLA антителами (Iniotaki-Theodoraki, 2001; Masson et al., 2007). Более того, CTLA-4Ig может также нарушать гомеостаз и функцию регуляторных Т-клеток (Трег), что может поставить под угрозу возникновения функционирующей иммунной толерантности (Bour-Jordan et al., 2004; Salomon and Bluestone, 2001).

Врожденные иммунные клетки, такие как NK-клетки и макрофаги, играют важную роль в инициации адаптивных иммунных ответов во многих контекстах, включая хроническое отторжение трансплантата.

Основная проблема, связанная с делецией B2M, заключается в том, что эта стратегия делает донорские клетки уязвимыми для опосредованного NK-клетками уничтожения из-за «missing self» (Raulet, 2006). Недавно Gornalusse et al. экспрессировали конструктор слияния B2M-HLA-E в B2M-дефицитных клетках для преодоления лизиса, опосредованного NK-клетками (Gornalusse et al., 2017). Однако этот подход не касается NK-клеток, лишенных NKG2A, ингибиторного рецептора для HLA-E, чья реактивность все еще может вызывать беспокойство (Braud et al., 1998a; Pegram et al., 2011). Следовательно, HLA-G, лиганд, ингибирующий NK-клетки, экспрессируемый в трансплацентарном барьере во время беременности, который действует через множество ингибирующих рецепторов (Ferreira et al., 2017; Pazmany et al., 1996), может быть лучшим кандидатом для полного преодоления ответов NK-клеток. Более того, макрофаги, которые способствуют отторжению трансплантированных клеток, могут контролироваться экспрессией CD47, сигнала «не ешь меня» (англ.: «don't-eat-me» signal), который предотвращает поглощение клеток макрофагами (Chhabra et al., 2016; Jaiswal et al., 2009; Majeti et al., 2009). Однако этот подход еще не исследован для защиты от поглощения макрофагами hPSC и их дифференцированных производных. Кроме того, еще предстоит предложить убедительную стратегию воздействия как на адаптивный, так и на врожденный иммунитет.

Здесь показано, что систему CRISPR/Cas9 можно использовать для выборочного вырезания генов, кодирующих полиморфных членов HLA класса I, HLA-A/-B/-C, из генома hPSC. Более того, его способность к мультиплексированию позволяет одновременно устранять экспрессию гена HLA класса II, используя одиночную гидовую РНК, нацеленную на *CITA*. Полученные полиморфные HLA-дефицитные «иммунно-непрозрачные» клетки были дополнительно модифицированы для экспрессии иммуномодулирующих факторов PD-L1, HLA-G и CD47, которые нацелены на иммунный надзор со стороны Т-клеток, NK-клеток и макрофагов, соответственно, с дальнейшим подавлением аллоиммунных ответов *in vitro* и *in vivo*. Комбинирование этих и других генетических модификаций может в конечном итоге привести к универсальным «готовым к применению» клеточным препаратам, подходящим для трансплантации любому пациенту.

Результаты

Редактирование генома устраняет экспрессию полиморфных HLA-A/-B/-C и HLA класса II

Учитывая, что гены HLA-A, HLA-B и HLA-C человека ГКГС класса I являются высоко гомологичными, создание специфичных коротких гидовых РНК (sgРНК), нацеленных на кодирующие участки каждого гена, с применением системы редактирования генома CRISPR/Cas9 оказалось сложной задачей. Таким образом, применялась стратегия мультиплексирования с двумя направляющими молекулами, нацеленная на некодирующие участки, прилегающие к этим генам, для одновременного вырезания всех трех из генома линии hPSC (HUES8). В локусе HLA HLA-B и HLA-C являются смежными, тогда как HLA-A располагается ближе к теломере. Чтобы одновременно нокаутировать соседние гены HLA-B и HLA-C, две sgРНК были сконструированы в каждом сайте, против хода транскрипции от HLA-B и по ходу транскрипции от HLA-C (Фиг. 1A). Предсказанная делеция 95 т.п.о. также включает промоторы двух генов, определенных как H3K27Ac-положительные области в UCSC Genome Browser. Чтобы нокаутировать весь ген HLA-A, одна sgРНК была сконструирована против хода транскрипции, а другая sgРНК по ходу транскрипции от HLA-A (Фиг. 1B). Согласно UCSC Genome Browser, предсказанная делеция 13 т.п.о. включает промотор HLA-A. Обе делеции были подтверждены ПЦР-ампликонами, охватывающими предсказанные сайты разрезания Cas9 (Фиг. 6A-6B). Удаление белков HLA-A/-B/-C в конечном нокаутированном по HLA клоне (KO), подтверждали проточной цитометрией (Фиг. 1C).

Нацеливание на СИТА, главный регулятор экспрессии HLA класса II, представляет собой хорошо задокументированную стратегию совместного устранения экспрессии трех высокополиморфных аллелей HLA класса II, HLA-DP/-DQ/-DR (Krawczyk and Reith, 2006; Reith and Mach, 2001). Ранее сообщалось о sgPHK, нацеленной на экзон 1 СИТА с высокой эффективностью разрезания (Фиг. 1D) (Ding et al., 2013). Эту sgPHK использовали в комбинации с sgPHK, нацеленными на ген HLA-A. Пару праймеров ПЦР, фланкирующих сайт расщепления в первом экзоне СИТА, применяли для амплификации участка, охватывающего сайт разрезания. ПЦР-ампликоны секвенировали по Сэнгеру для идентификации сдвигов двухаллельной рамки считывания (Фиг. 6C-6D). Чтобы продемонстрировать, что нацеливание на СИТА приводит к потере экспрессии HLA класса II, hPSC как ДТ, так и КО были дифференцированы в эндотелиальные клетки (EC) с применением ранее опубликованного протокола (Patsch et al., 2015). Следует отметить, что дифференцированные EC ДТ и КО экспрессировали эквивалентные уровни маркера EC CD144 (VE-кадгерин), что указывает на то, что на эффективность дифференцировки полученных клеток не повлияло редактирование генома (Фиг. 6E). Важно отметить, что индукция экспрессии HLA-DR при стимуляции ИФН- γ была устранена в EC КО (Фиг. 1E). Клон КО hPSC с генотипом HLA-A/-HLA-B/-HLA-C/- СИТАиндел/индел был создан в соответствии с рабочим процессом, изображенным на Фиг. 6F. Взятые вместе, результаты демонстрируют, что мультиплексное редактирование генома CRISPR/Cas9 позволяет комбинированное и высокоспецифичное устранение экспрессии полиморфных генов HLA класса I и II в hPSC.

Нокин иммуномодулирующих факторов в нокаутную по HLA клеточную линию

Было высказано предположение, что удаление полиморфных молекул HLA класса Ia и класса II устранит опосредованное Т-клетками адаптивное иммунное отторжение. Однако клетки с нокаутом по HLA, вероятно, по-прежнему будут восприимчивы к клеткам врожденного иммунитета, участвующим в аллоиммунном ответе, таким как NK-клетки и макрофаги, что побуждает исследовать эффект введения иммуномодулирующих факторов на основе следующих причин: 1) в то время как неполоморфный ген HLA-E останется нетронутым, его поверхностная экспрессия, вероятно, будет серьезно нарушена удалением полиморфных генов HLA класса I, поскольку преобладающие пептиды, презентированные HLA-E, являются лидерными пептидами, полученными из других молекул класса I (Braud et al., 1998b). Таким образом, неспособность экспрессировать какой-либо HLA класса I, отличный от HLA-E, может сделать донорские клетки уязвимыми для лизиса, опосредованного NK-клетками. Чтобы защитить сконструированные клетки от NK-клеток, пытались ввести HLA-G в нокаутированные по HLA клетки. 2) Макрофаги привлекаются цитокинами, секретируемыми в месте приживания, и притягиваются для фагоцитоза чужеродных клеток путем связывания антител. Хорошо задокументировано, что уровень CD47, который связывается с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) на поверхности макрофагов, действуя как сигнал «не ешь меня», значительно увеличивается в некоторых типах опухолей и помогает им избежать поглощения макрофагами (Betancur et al., 2017; Jaiswal et al., 2009; Willingham et al., 2012; Zhao et al., 2016). Следовательно, было желательно достичь сверхэкспрессии CD47 в нокаутированных по HLA клетках. 3) HLA-G может представлять классические пептиды, полученные из внутриклеточных белков, Т-клеткам (Diehl et al., 1996), которые потенциально могут повторно подвергнуть клеточные линии иммунному надзору CD8⁺ Т-клетками. Кроме того, $\gamma\delta$ Т-клетки могут напрямую распознавать антигены и инициировать цитотоксический ответ (Vantourout and Hayday, 2013). Чтобы противодействовать любому остаточному ответу Т-клеток, было решено подвергнуть нокину PD-L1, ингибитор контрольной точки Т-клеток, который задействует рецептор PD-1 на активированных Т-клетках, напрямую подавляя активность Т-клеток (Riley, 2009). Более того,

экспрессия PD-L1 может также способствовать защите трансплантированных клеток от отторжения врожденным иммунитетом путем ингибирования PD-1+ NK-клеток (Beldi-Ferchiou et al., 2016; Della Chiesa et al., 2016) и PD-1+ макрофагов (Gordon et al., 2017).

Чтобы избежать случайной интеграции и позиционных эффектов на экспрессию трансгенов, пытались осуществить нокин иммуномодулирующих факторов в локусе «безопасная гавань» *AAVS1* (Sadelain et al., 2011). Были сконструированы две донорские плазмиды, одна содержала кассету экспрессии PD-L1; HLA-G; CD47, а другая, содержала кассету экспрессии PD-L1; CD47, обе содержали управляемые промотором CAGGS, фланкированным плечами, гомологичными локусу *AAVS1* (Фиг. 1G). Донорские плазмиды подвергали электропорации вместе с sgPНК, нацеленной на локус *AAVS1* в клоне HLA-A/-HLA-B/-HLA-C/-СПТАиндел/индел. Интеграцию кассет экспрессии в локус *AAVS1* подтверждали с помощью ПЦР (Фиг. 6G). Два клона были выделены в соответствии с рабочим процессом, показанным на Фиг. 6F и проанализированы способом проточной цитометрии; один, названный KI-PHC, который экспрессировал PD-L1, HLA-G, но не значительно сверхэкспрессировал CD47, по сравнению с клетками ДТ (Фиг. 1H-1I), и второй, названный KI-PC, который экспрессировал PD-L1 и демонстрировал повышенный уровень CD47 (Фиг. 1J и Фиг. 7A). Уровни поверхностного HLA-A2 проверяли с помощью проточной цитометрии в обоих клонах KI и подтверждали удаление HLA класса Ia (Фиг. 7B). KI-PHC и KI-PC hPSC были дифференцированы в CD144+ EC (Фиг. 7C), и никакой экспрессии HLA-DR не наблюдали с помощью проточной цитометрии после стимуляции ИФН- γ (Фиг. 7D). Таким образом, иммуномодулирующие факторы были успешно вставлены в локус «безопасная гавань» *AAVS1* клеток без HLA классов Ia и II. В целом были созданы три сконструированные линии hPSC: KO, KI-PHC и KI-PC (Фиг. 1F).

Затем были предприняты попытки подтвердить экспрессию трансгена, а также экспрессию HLA-E в производных сконструированных линиях hPSC. С этой целью сконструированные hPSC были дифференцированы в клетки гладких мышц сосудов (VSMC). VSMC ДТ, KO, KI-PHC и KI-PC экспрессировали эквивалентные уровни VSMC маркера CD140b (PDGFRB), подтверждая сходную эффективность дифференцировки (Фиг. 7E). В VSMC KI-PHC наблюдалась субпопуляция с умеренно более высокой экспрессией PD-L1 и HLA-G по сравнению с VSMC ДТ, и основная популяция демонстрировала значительно повышенные уровни PD-L1 и HLA-G (Фиг. 7F). Однако повышенной экспрессии CD47 в VSMC KI-PHC не наблюдалось (Фиг. 7F), что могло быть результатом неполной экспрессии из нацеливающей кассеты, где все три генных продукта связаны с помощью 2A-пептида (Фиг. 1G). Аналогичным образом наблюдалась небольшая субпопуляция с умеренно более высоким уровнем и основная популяция с сильно повышенными уровнями PD-L1 и CD47 в VSMC KI-PC по сравнению с VSMC ДТ (Фиг. 7F).

Когда VSMC ДТ стимулировали ИФН- γ , они резко усиливали поверхностную экспрессию HLA-E. Напротив, уровни белка HLA-E на поверхности клетки были значительно понижены в VSMC KO (Фиг. 7G), что не было связано с нарушением экспрессии гена HLA-E в VSMC KO (Фиг. 7H). Неожиданно, поверхностная экспрессия HLA-E VSMC KI-PHC не восстанавливалась экспрессией HLA-G (Фиг. 7G). Тем не менее, поверхностная миграция HLA-G не была нарушена в VSMC KI-PHC (Фиг. 7F), что дало дополнительный стимул для введения этого толерогенного фактора в сконструированные клеточные продукты, чтобы компенсировать снижение поверхностной экспрессии HLA-E в фоне HLA-A/-B/-C null.

Клеточные линии KO и KI сохраняют плюрипотентность и потенциал дифференцировки

Чтобы оценить, сохраняют ли сконструированные линии hPSC плюрипотентность, экспрессию NANOG, OCT4, SSEA3, SSEA4 и TRA-1-60 оценивали с помощью иммунофлуоресценции на hPSC KO, KI-

PHC и KI-PC, и было установлено, что она эквивалентна немодифицированным hPSC (Фиг. 2A). Кроме того, hPSC KO, KI-PHC и KI-PC были дифференцированы в три зародышевых листка. кПЦР в реальном времени проводили для изучения экспрессии маркеров эктодермы, мезодермы и энтодермы и сравнивали с тремя зародышевыми листками, полученными из немодифицированных hPSC. Было обнаружено, что все проанализированные маркеры клонов экспрессируются в соответствующих клетках зародышевого листка (Фиг. 2B). Кроме того, hPSC KO, KI-PHC и KI-PC демонстрировали нормальный кариотип (Фиг. 2C). Таким образом, несмотря на многочисленные раунды генетической модификации, эти сконструированные линии hPSC сохраняют плюрипотентность, проводят дифференцировку по трем линиям и сохраняют нормальный кариотип.

Для анализа потенциальных нецелевых эффектов sgPHK, используемых для конструирования линий hPSC, 21 верхний ранжированный *in silico* экзонный нецелевой сайт был амплифицирован с помощью ПЦР из сконструированных линий hPSC, а также из родительских hPSC ДТ. Секвенирование продуктов ПЦР по Сэнгеру не выявило каких-либо нежелательных изменений на этих сайтах, за исключением псевдогена HLA-H (HFE), который показал идеальное совпадение с sgPHK выше HLA-A, используемой для удаления HLA-A из генома (Фиг. 2D и Фиг. 8). Более подробно, секвенирование захваченной мишени было выполнено для всех 648 предсказанных нецелевых сайтов для восьми sgPHK, используемых в этом исследовании. После обогащения с помощью специально разработанных PHK-приманок для каждого предсказанного нецелевого сайта обогащенные фрагменты ДНК секвенировали при помощи секвенирования следующего поколения (NGS). Считывания последовательностей каждой клеточной линии выравнивали и сравнивали с эталонной геномной последовательностью hg38, и рассчитывали процент считываний с измененными последовательностями. В результате, помимо 12 идентифицированных природных SNP/полиморфных сайтов, HLA-H (HFE) был подтвержден как нецелевой во всех трех клеточных линиях. Более того, интронный нецелевой сайт был обнаружен в TRAF3 во всех трех клеточных линиях в результате нацеливания на HLA-C, а также интронный нецелевой сайт в CPNE5 в клеточной линии KI-PC в результате sgPHK *AAVSI* (Фиг. 2E и Фиг. 9). В целом, хотя были обнаружены три нецелевых события, сконструированные линии hPSC сохранили плюрипотентность и способность дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, а также в VSMC и EC с эффективностью дифференцировки, аналогичной их аналогам ДТ.

Пониженный Т-клеточный ответ против клеточных линий KO и KI

Учитывая, что удаление полиморфной экспрессии HLA класса Ia, как ожидается, устранил опосредованные Т-клетками адаптивные иммунные ответы, затем была предпринята попытка исследовать активность Т-клеток в совместных культурах с сконструированными клеточными линиями. В дополнение к клеткам KO, клетки KI-PHC также использовались для выяснения того, будет ли экспрессия ингибитора контрольной точки Т-клеток PD-L1 дополнительно подавлять активность Т-клеток. Были проведены четыре отдельных иммуноанализа Т-клеток *in vitro*: анализы пролиферации, активации, секреции цитокинов и уничтожения Т-клеток. Поскольку экспрессия HLA I в hPSC невысока (de Almeida et al., 2013; Drukker et al., 2002), сконструированные hPSC, а также hPSC дикого типа были дифференцированы в EC, которые экспрессируют как HLA I, так и HLA II после стимуляции ИФН- γ , или в VSMC, которые экспрессируют только HLA I, перед их использованием в соответствующих иммуноанализах.

Для анализов пролиферации Т-клеток EC ДТ, KO и KI-PHC предварительно обрабатывали ИФН- γ в течение 48 часов и затем совместно культивировали с мечеными CFSE аллогенными CD3+ Т-клетками в течение пяти дней. Затем Т-клетки окрашивали на CD3/4/8 и анализировали на разведение сигнала CFSE с

помощью проточной цитометрии в качестве считывания пролиферации Т-клеток в различных субпопуляциях Т-клеток (Фиг. 10А). Графики FACS одного репрезентативного донора Т-клеток показаны на Фиг. 10В. Как и предполагалось, процент общих пролиферирующих Т-клеток (CD3+) снижался при инкубации с ЕС КО (4,17 % $\pm$ 0,89 % СОС) или ЕС KI-PHC (3,87 % $\pm$ 0,73 % СОС) по сравнению с ЕС ДТ (8,29 % $\pm$ 1,23 % СОС) (Фиг. 3А, левая панель). CD4+ Т-клетки следовали аналогичной схеме: ЕС дикого типа (5,03 % $\pm$ 0,89 % СОС) индуцируют большую пролиферацию CD4+ Т-клеток, чем ЕС КО (3,58 % $\pm$ 0,86 % СОС) или ЕС KI-PHC (3,49 % $\pm$ 0,83 % СОС) (Фиг. 3А, средняя вставка). Более того, цитотоксические CD8+ Т-клетки демонстрировали значительно сниженную пролиферацию при совместном культивировании с ЕС КО (7,71 % $\pm$ 1,89 % СОС) или ЕС KI-PHC (5,95 % $\pm$ 1,48 % СОС) по сравнению с ЕС ДТ (14,32 % $\pm$ 2,39 % СОС) (Фиг. 3А, правая вставка). Важно отметить, что по сравнению с совместными культурами с ЕС КО, CD8+ Т-клетки пролиферировали значительно меньше в присутствии ЕС KI-PHC (Фиг. 3А, правая вставка), что указывает на то, что активация CD8+ Т-клеток подавлялась еще больше за счет сверхэкспрессии PD-L1 на нулевом фоне HLA. Для дальнейшего изучения подавляющей роли PD-L1 во время ответов различных субпопуляций Т-клеток была создана индуцибельная линия hPSC, экспрессирующая PD-L1, и СОС в ЕС перед проведением анализа пролиферации Т-клеток. Было обнаружено, что пролиферация только CD8+, а не CD4+, Т-клеток была понижена в присутствии ЕС, экспрессирующих PD-L1, по сравнению с ЕС ДТ, что свидетельствует о специфическом ингибирующем эффекте PD-L1 на субпопуляцию CD8+ Т-клеток (Фиг. 10С-10D).

Используя ту же совместную культуру Т-клеток с ЕС в качестве клеток-мишеней, исследовали экспрессию маркеров активации Т-клеток CD25 и CD69 (Фиг. 3В). Было обнаружено снижение процентного содержания CD25+ и CD69+ Т-клеток (CD3+) в совместных культурах с ЕС KI-PHC (4,91 % $\pm$ 0,74 % СОС; 5,04 % $\pm$ 1,24 % СОС) или ЕС КО (5,12 % $\pm$ 0,77 % СОС; 5,40 % $\pm$ 1,29 % СОС) по сравнению с Т-клетками, совместно инкубированными с ЕС дикого типа (6,43 % $\pm$ 0,71 % СОС; 9,30 % $\pm$ 1,51 % СОС) (Фиг. 3В). Такие же тенденции наблюдались в популяциях CD4+ и CD8+ клеток (Фиг. 3В). Также было обнаружено, что при совместном культивировании с ЕС ДТ, более высокий процент CD25+ клеток наблюдался в популяции CD4+ клеток, тогда как более высокий процент CD69+ клеток наблюдался в популяции CD8+ клеток. Однако значительного понижения экспрессии маркеров активации в Т-клетках против ЕС KI-PHC по сравнению с ЕС КО не наблюдалось.

Затем исследовали уровни эффекторных цитокинов Т-клеток ИФН- γ и ИЛ-10, секретируемых в среду в течение пятидневного совместного культивирования Т-клеток-ЕС. По сравнению с уровнями ИФН- γ и ИЛ-10, наблюдаемыми в среде после воздействия ЕС ДТ (4747 $\pm$ 556,1 стандартное отклонение; 54,56 $\pm$ 17,22 станд. откл.), уровни обоих цитокинов были ниже в среде, когда Т-клетки подвергались воздействию любого из них (3214 $\pm$ 180,5 станд. откл.; 5,09 $\pm$ 0,16 станд. откл.) или ЕС KI-PHC (2635 $\pm$ 132,9 SD; 3,56 $\pm$ 0,63 станд. откл.), что указывает на понижение секреции цитокинов Т-клетками против линий клеток КО или KI-PHC (Фиг. 3С).

Для количественной оценки уничтожения Т-клеток была измерена лактатдегидрогеназа (ЛДГ), высвобождаемая из VSMC, как суррогат цитотоксичности Т-клеток. В этом случае ожидалось, что только CD8+ Т-клетки будут активированы взаимодействием HLA I-TCR, учитывая, что VSMC экспрессируют только HLA I. Было обнаружено, что цитотоксичность CD8+ Т-клеток против VSMC KI-PHC (15,31 % $\pm$ 4,52 % СОС) был самым низким по сравнению с КО (18,86 % $\pm$ 4,34 % СОС) и ДТ (37,65 % $\pm$ 7,64 % СОС) VSMC (Фиг. 3D). Это наблюдение предполагает, что цитотоксичность CD8+ Т-клеток подавлялась еще больше с помощью PD-L1 в VSMC KI-PHC, что согласуется с результатами анализа пролиферации CD8+ Т-клеток. В совокупности наблюдения в иммуноанализе Т-клеток демонстрируют снижение примирования CD4+ и CD8+

Т-клеток против клеточных линий КО и KI-PHC в результате удаления молекул HLA I и II. Активация CD8+ Т-клеток дополнительно подавлялась экспрессией PD-L1 в клеточной линии KIPHC.

Для оценки Т-клеточных ответов *in vivo*, hPSC ДТ и сконструированные hPSC подкожно трансплантировали мышам с иммунодефицитом и позволяли образовывать тератомы в течение 4-6 недель. Затем предварительно сенсibilизированные аллогенные CD8+ Т-клетки адаптивно переносили с помощью инъекции в хвостовую вену, и рост тератомы контролировали в течение дополнительных 8 дней (Фиг. 4А). Согласно измерениям по экспрессии CD69 и PD-1 CD8+ Т-клеток до и после примирования, Т-клетки, используемые для инъекции, были активированы (CD69+) и без признаков истощения (PD-1+) после сенсibilизации (Фиг. 11А). В соответствии с гипотезой о том, что отторгаться будут только клетки ДТ, тератомы ДТ показали более медленное увеличение объема по сравнению с тератомами КО через семь дней после инъекции CD8+ Т-клеток, что не было связано с более медленной скоростью роста самих тератом ДТ (Фиг. 4В-4С). Эти результаты предполагают, что тератомы КО были защищены от опосредованного Т-клетками отторжения. Более того, хотя и незначительно, но средний объем тератом KI-PHC и KI-PC также был больше, чем объем тератом ДТ через 7 дней после инфузии Т-клеток (Фиг. 4В). Кроме того, тератомы, происходящие как из линий клеток КО, так и KI, демонстрировали пониженную инфильтрацию Т-клеток, о чем свидетельствует кПЦР для маркеров эффекторных Т-клеток человека CD8 и ИЛ-2 (Фиг. 4D), а также гистология (Фиг. 4E). В совокупности эти наблюдения предполагают, что удаление полиморфных молекул HLA с клеточной поверхности трансплантированных клеток может эффективно блокировать опосредованное Т-клетками отторжение *in vivo*, что соответствует наблюдениям *in vitro*.

Линии клеток KI защищены от ответов NK-клеток и макрофагов

Из-за отсутствия молекул HLA Ia и нарушения поверхностной экспрессии HLA-E предполагалось, что hPSC КО и их производные будут уязвимы для лизиса, опосредованного NK-клетками, тогда как линия клеток KI-PHC должна быть защищена от опосредованного NK-клетками отторжения в результате экспрессии HLA-G. Чтобы проверить гипотезу, аллогенные NK-клетки были выделены от здоровых доноров и инкубированы совместно с VSMC ДТ, КО или KI-PHC. CD56+ NK-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на поверхностную экспрессию маркера дегрануляции CD107a в качестве считывания активации НК-клеток (Фиг. 11В). Следует отметить, что дегрануляция NK-клеток в присутствии КО VSMC не была значительно выше, чем с VSMC ДТ ($10,16 \pm 2,96$ % COC) (Фиг. 5А), что свидетельствует об отсутствии сигнала активации NK-клеток на VSMC, полученных из hPSC-. Однако в соответствии с гипотезой было обнаружено, что процент дегранулирующих CD107a+ NK-клеток в совместной культуре с VSMC KI-PHC ($5,43 \pm 0,95$ % COC) был значительно ниже, чем в присутствии VSMC КО ($13,51 \pm 2,51$ % COC) (Фиг. 5А), предполагая, что активность NK-клеток действительно ингибируется экспрессией HLA-G в VSMC KI-PHC. Графики FACS одного репрезентативного донора продемонстрированы на Фиг. 11С. ЛДГ, высвобождаемый апоптотическими VSMC после совместной инкубации с NK-клетками, также исследовали для количественной оценки цитотоксичности NK-клеток. В соответствии с дегрануляцией НК-клеток было замечено, что цитотоксичность NK-клеток снижалась, когда NK-клетки инкубировали с VSMC KI-PHC (Фиг. 5В).

Наконец, активность макрофагов исследовали с применением pH-чувствительного флуоресцентного красителя (pHrodo-красный), который излучает сигнал при фагоцитарном поглощении. Была выдвинута гипотеза, что сверхэкспрессия макрофагального сигнала CD47 «не ешь меня» ('don't-eat-me') в производных сконструированных клеточных линий hPSC будет снижать поглощение макрофагами. Учитывая, что не

наблюдалось значительного увеличения экспрессии CD47 в VSMC KI-PC (Фиг. 7F), в этих анализах использовали VSMC, дифференцированные от линии клеток KI-PC, которые показали намного более высокий уровень CD47, чем VSMC ДТ (Фиг. 7F). Кроме того, была получена линия клеток с нокаутом CD47 (CD47^{-/-}) в качестве положительного контроля для поглощения макрофагами и подтверждена потеря экспрессии CD47 на поверхности клеток с помощью проточной цитометрии (Фиг. 11D). Меченные pHrodo-красным VSMC, дифференцированные от клеток ДТ, CD47^{-/-} и KI-PC, либо обрабатывали стауроспорином (STS) для индукции апоптоза, либо оставляли без обработки, а затем инкубировали с выделенными аллогенными макрофагами от здоровых доноров. Появление красного сигнала, индикатора VSMC, которые были поглощены макрофагами, отслеживали с помощью визуализации живых клеток и количественно определяли интенсивность флуоресценции. Следует отметить, что с обработкой STS или без нее, VSMC KI-PC показали значительно меньшее поглощение макрофагами по сравнению с CD47^{-/-} VSMC или VSMC ДТ (Фиг. 5C-5D и Фиг. 11E). Эти данные демонстрируют, что сверхэкспрессия CD47 действительно может минимизировать поглощение макрофагами сконструированных VSMC, полученных из hPSC, хотя нельзя исключить вклад PD-L1 в ингибирование поглощения макрофагами, который также был экспрессирован VSMC KI-PC (Фиг. 7F).

Обсуждение

В этом исследовании мультиплексное редактирование генома CRISPR/Cas9 применялось для нокаута высокополиморфных генов HLA-A/-B/-C и успешно предотвращало экспрессию генов HLA класса II, воздействуя на ген СИТА в hPSC. Кроме того, для введения иммуномодулирующих факторов PD-L1, HLA-G и CD47 в локус *AAVS1* применяли управляемую CRISPR/Cas9 направляемую гомологией репарацию (HDR). Было обнаружено, что сконструированные производные hPSC вызывали значительно меньшую иммунную активацию и уничтожение Т-клетками и NK-клетками и демонстрировали минимальное поглощение макрофагами.

В подходе для устранения экспрессии HLA класса Ia полиморфные гены HLA класса Ia, HLA-A/-B/-C были специально вырезаны, в то время как гены *B2M* и неpolиморфные гены HLA класса Ib HLA-E, -F и -G остались интактными. Хотя полученная делеция 95 т.п.о. содержит не только гены HLA-B/-C, но также MIR6891 и четыре псевдогена, не наблюдалось изменений скорости роста или эффективности дифференцировки в клеточных линиях KO или KI. Интересно, что по неизвестным причинам поверхностная экспрессия HLA-E не восстанавливалась за счет экспрессии HLA-G в клетках KI-PC, что противоречило предыдущему сообщению о том, что лидерный пептид из HLA-G достаточен для промотирования поверхностной миграции HLA-E (Lee et al., 1998a).

Линия hPSC с нокаутом HLA (KO) была создана путем редактирования генома с использованием семи различных sgPHK, а hPSC KI-PC и KI-PC были клонами, полученными из линии KO и отредактированными с помощью дополнительной sgPHK, нацеленной на локус *AAVS1*. Из 648 предсказанных нецелевых сайтов для восьми использованных sgPHK, только одно экзонное нецелевое событие наблюдалось в транскрибируемом псевдогене *HLA-H*, в результате одной из sgPHK, используемых для удаления *HLA-A* из генома. В случае трансляции наблюдаемая делеция 2 п.о., обнаруженная в обоих аллелях, приведет к мутации, вызывающей сдвиг рамки считывания. Несмотря на то, что мутации в *HLA-H* были связаны с наследственным гемохроматозом, редким нарушением накопления железа (Feder et al., 1996), наблюдаемая мутация HLA-H (HFE) не влияла на скорость роста или эффективность дифференцировки типов клеток, протестированных в этом исследовании. Следует отметить, что этого нецелевого события можно было бы избежать либо путем конструирования другой sgPHK, либо путем отбора клонов, которые не несут эту конкретную нецелевую

мутацию путем генотипирования локуса *HLA-H*. Более того, использование sgRNA/Cas9 рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP) для нацеливания, которое допускает более транзientное редактирование, чем подходы на основе плазмид (Roth et al., 2018), должно снизить количество нецелевых событий на клеточную линию и, таким образом, применяться в будущем.

Как и ожидалось, устранение экспрессии полиморфного HLA в hPSC и их производных, таких как ЕС и VSMC, привело к снижению ответов Т-клеток *in vitro* и *in vivo*. Интересное наблюдение из анализов Т-клеток заключается в том, что сверхэкспрессия ингибитора контрольной точки PD-L1 оказывала значительное влияние только на пролиферацию и цитотоксичность CD8⁺ Т-клеток. Это может иметь несколько возможных объяснений: 1) уровни рецептора PD-L1, PD-1, выше на CD8⁺ Т-клетках, чем на CD4⁺ Т-клетках. 2) CD8⁺ Т-клетки представляют собой тип клеток, наиболее чувствительных к воздействию клеток-мишеней в анализах и, следовательно, также будут экспрессировать более высокие уровни негативного регулятора PD-1. Следует отметить, что оба объяснения не исключают друг друга, поскольку сила активации Т-клеток и экспрессия PD-1 связаны отрицательной обратной связью (Riley, 2009). Более того, было отмечено, что только один PD-L1 оказывал влияние на пролиферацию CD8⁺ Т-клеток даже в отсутствие HLA, предполагая, что PD-L1 может действовать как толерогенный фактор даже в отсутствие продуктивного взаимодействия HLA-TCR. Кроме того, в анализах активации Т-клеток и секреции цитокинов, по сравнению с отрицательным контролем, фоновая активность Т-клеток наблюдалась даже в совместном культивировании с линией клеток KIPHC. Это может быть связано с экспериментальной установкой, учитывая, что клетки-мишени могут секретировать факторы, способствующие активации Т-клеток, независимо от присутствия HLA.

Хотя острое отторжение трансплантата в основном опосредовано Т-клетками, роль других иммунных клеток, таких как макрофаги, NK-клетки и В-клетки, также необходимо учитывать в отношении приживления и долгосрочного выживания терапевтических клеток. Анализы NK-клеток позволяют предположить, что экспрессия HLA-G способна контролировать активность NK-клеток. Более того, сверхэкспрессия CD47 эффективно снижает поглощение макрофагами. Тем не менее, как недавно сообщалось, PD-L1, который совместно экспрессируется в обеих линиях клеток KI, также может влиять на активность PD-1⁺ NK-клеток (Beldi-Ferchou et al., 2016; Della Chiesa et al., 2016) и PD-1⁺ макрофагов (Gordon et al., 2017), которые могут вносить вклад в наблюдаемые фенотипы. Что касается долгосрочного приживления трансплантата, в частности, антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) NK-клетками и активации комплемента, опосредованной аллоантителами, необходимо рассматривать как основные факторы хронического отторжения трансплантата (Baldwin et al., 2016; Djamali et al., 2014; Michaels et al., 2003). Можно предположить, что введение дополнительных факторов, которые, как известно, ингибируют АЗКЦ и активацию комплемента, таких как CD59 (Meri et al., 1990), может способствовать длительному приживлению. В конечном итоге эксперименты, *in vivo* помогут выяснить степень защиты, которую модифицированные клетки могут иметь после трансплантации. Тем не менее, хотя существуют различные модели гуманизированных мышей, они ограничены в воспроизведении полного иммунного ответа человека. Таким образом, может потребоваться разработка улучшенных моделей *in vivo* для тестирования трансплантации и отторжения клеток (Brehm et al., 2014; Li et al., 2018; Melkus et al., 2006; Rongvaux et al., 2014).

Преодоление иммунного барьера для трансплантации обеспечит новый захватывающий способ не только для преодоления аллобарьера, но и потенциально для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как диабет 1 типа (T1D) и рассеянный склероз, когда один конкретный тип клеток подвергается атаке собственной иммунной системы пациента и нуждается в замене. Таким образом, создание универсальных клеток, которые

можно безопасно трансплантировать любому человеку, обещает раскрыть весь потенциал регенеративной медицины.

Экспериментальные методики

Последовательности CRISPR gPHK

HLA-A против хода транскрипции: 5'-GCCGCCTCCCACTTGCGCT-3' (SEQ ID NO: 1)
 HLA-A по ходу транскрипции: 5'-CACATGCAGCCCCACGAGCCG-3' (SEQ ID NO: 2)
 HLA-B против хода транскрипции_1: 5'-ATCCCTAAATATGGTGTCCCT-3' (SEQ ID NO: 3)
 HLA-B против хода транскрипции_2: 5'-TCCCTAAATATGGTGTCCCT-3' (SEQ ID NO: 4)
 HLA-C по ходу транскрипции_1: 5'-GTGATCCGGGTATGGGCAGT-3' (SEQ ID NO: 5)
 HLA-C по ходу транскрипции_2: 5'-TGATCCGGGTATGGGCAGT-3' (SEQ ID NO: 6)
 СПТА: 5'-TCCATCTGGTCATAGAAG-3' (SEQ ID NO: 7)
 gPHK_AAVS1-T2: 5'-GGGGCCACTAGGGACAGGAT-3' (SEQ ID NO: 8)

Зонды/праймеры для ПЦР и кПЦР

Праймеры ПЦР, использованные на Фиг. 6:

Фиолетовый_F: 5'-CACTCAGAGCAAAGGTCAGATG-3' (SEQ ID NO: 9)
 Фиолетовый_R: 5'-AGACTTGAATCCATAAGCCCAA-3' (SEQ ID NO: 10)
 Красный_F: 5'-GACAAGTCTCGGAGATGGTTTT-3' (SEQ ID NO: 11)
 Красный_R: 5'-AGACTTGAATCCATAAGCCCAA-3' (SEQ ID NO: 12)
 Зеленый_F: 5'-CACTCAGAGCAAAGGTCAGATG-3' (SEQ ID NO: 13)
 Зеленый_R: 5'-TTTGTGTGTCAGCCAGACATAGG-3' (SEQ ID NO: 14)
 Желтый_F: 5'-CTGGTTATCTCCCCATTCTCTG-3' (SEQ ID NO: 15)
 Желтый_R: 5'-AAGCATTCCTGACCCTG-3' (SEQ ID NO: 16)
 Синий_F: 5'-GTCTTCCCTCCCAGGCAGCTCA-3' (SEQ ID NO: 17)
 Синий_R: 5'-TGAGGGGTGGGGGATACCGGA-3' (SEQ ID NO: 18)
 Черный_F: 5'-TCGACCTACTCTCTTCCGCA-3' (SEQ ID NO: 19)
 Черный_R: 5'-TAGGGGGCGTACTTGGCATA-3' (SEQ ID NO: 20)
 Серый_F: 5'-CCGTTCTCCTGTGGATTCGG-3' (SEQ ID NO: 21)
 Серый_R: 5'-TCTCTGGCTCCATCGTAAGC-3' (SEQ ID NO: 22)

Праймеры ПЦР, использованные на Фиг. 8:

HLA-F-AS1_F: 5'-GTCGCTTCAGTCAGGACACA-3' (SEQ ID NO: 23)
 HLA-F-AS1_R: 5'-GAAGGTGCTGTTTGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 24)
 ITGA6_F: 5'-CCTTCAACTTGGACACTCGGG-3' (SEQ ID NO: 25)
 ITGA6_R: 5'-CCACGGGCCAACTACTCC-3' (SEQ ID NO: 26)
 HEATR1_F: 5'-TTACCCAGTTCAATACTGAGCCA-3' (SEQ ID NO: 27)
 HEATR1_R: 5'-AGGGGTAAGCTGCAAATTCTT-3' (SEQ ID NO: 28)
 PTDSS2_F: 5'-GACCTCCACAGGGACTAGGT-3' (SEQ ID NO: 29)
 PTDSS2_R: 5'-TTTGAGTTGGTGCTCCCTC-3' (SEQ ID NO: 30)
 CTBS_F: 5'-GCCCTCATCGAGTGGTCAAA-3' (SEQ ID NO: 31)
 CTBS_R: 5'-CCGCTAGACCTGCTGCTATG-3' (SEQ ID NO: 32)
 ACSBG1_F: 5'-CTGGGTGTCAATGATGGCGT-3' (SEQ ID NO: 33)

ACSBG1_R: 5'-GCCACATCTAAAGGCAGTCG-3' (SEQ ID NO: 34)
AC078852.1_F: 5'-GTTTGTGGGTGCTGGTCAAC-3' (SEQ ID NO: 35)
AC078852.1_R: 5'-CTAGGCAACAGTGACAGGGG-3' (SEQ ID NO: 36)
HIPK4_F: 5'-GGACCATCATGTTCGAGACC-3' (SEQ ID NO: 37)
HIPK4_R: 5'-GACCTGGGAGTCACACGAAC-3' (SEQ ID NO: 38)
ACSBG1_F: 5'-CTGGGTGTCAATGATGGCGT-3' (SEQ ID NO: 39)
ACSBG1_R: 5'-GCCACATCTAAAGGCAGTCG-3' (SEQ ID NO: 40)
HIC2_F: 5'-AAGTGTTCGGTCTGCGAGAA-3' (SEQ ID NO: 41)
HIC2_R: 5'-GCTCTGCTTGGTACGGACTG-3' (SEQ ID NO: 42)
HLA-H_F: 5'-AGGTGATGTATGGCTGCGAC-3' (SEQ ID NO: 43)
HLA-H_R: 5'-TCCTTCCCGTTCTCCAGGTA-3' (SEQ ID NO: 44)
HLA-K_F: 5'-GGTATGAACAGCACGCCAAC-3' (SEQ ID NO: 45)
HLA-K_R: 5'-GCGTCTTGTGTTCCCTGGTA-3' (SEQ ID NO: 46)
HLA-G_F: 5'-ACCCTCTACCTGGGAGAACC-3' (SEQ ID NO: 47)
HLA-G_R: 5'-AGGCTCTCCTTTGTTTCAGCC-3' (SEQ ID NO: 48)
PYCRL_F: 5'-CCTAGCCACGTGTGACTCAA-3' (SEQ ID NO: 49)
PYCRL_R: 5'-TGCCGTCCCAGTAACCAATC-3' (SEQ ID NO: 50)
RAB11FIP4_F: 5'-CGAGGGAGGGCAAATTGAGT-3' (SEQ ID NO: 51)
RAB11FIP4_R: 5'-GAAGAAGGGACAAGGGGTGG-3' (SEQ ID NO: 52)
CHFR_F: 5'-GAGCTTTGATGGCAGAGTGTTA-3' (SEQ ID NO: 53)
CHFR_R: 5'-CTGGGAGCATGCATTTGTGAGA-3' (SEQ ID NO: 54)
PNCK_F: 5'-CTGTTGGCAGGTGAACCTCT-3' (SEQ ID NO: 55)
PNCK_R: 5'-CTGGGAAGGCTTGTCTCCTG-3' (SEQ ID NO: 56)
AMN_F: 5'-AGAGCTCAAGGTCCCAAGTG-3' (SEQ ID NO: 57)
AMN_R: 5'-GGGTAACCTCACTCGGAGGTC-3' (SEQ ID NO: 58)
FUT1_F: 5'-TGGATTTCCAGAACCCCATCC-3' (SEQ ID NO: 59)
FUT1_R: 5'-GGGAACTCTCCCTCTGGTCT-3' (SEQ ID NO: 60)
NPPA_F: 5'-GAGCTTCTGCATTGGTCCCT-3' (SEQ ID NO: 61)
NPPA_R: 5'-TCTGATCGATCTGCCCTCCT-3' (SEQ ID NO: 62)

Праймеры для кПЦР на основе SYBR:

AFP_F: 5'-AAATGCGTTTCTCGTTGCTT-3' (SEQ ID NO: 63)
AFP_R: 5'-GCCACAGGCCAATAGTTTGT-3' (SEQ ID NO: 64)
SOX17_F: 5'-CTCTGCCTCCTCCACGAA-3' (SEQ ID NO: 65)
SOX17_R: 5'-CAGAATCCAGACCTGCACAA-3' (SEQ ID NO: 66)
BRACHYURY_F: 5'-AATTGGTCCAGCCTTGAAT-3' (SEQ ID NO: 67)
BRACHYURY_R: 5'-CGTTGCTCACAGACCACA-3' (SEQ ID NO: 68)
FLK1_F: 5'-TGATCGGAAATGACACTGGA-3' (SEQ ID NO: 69)
FLK1_R: 5'-CACGACTCCATGTTGGTCAC-3' (SEQ ID NO: 70)
MAP2_F: 5'-CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGAGAGTG-3' (SEQ ID NO: 71)
MAP2_R: 5'-CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGTG-3' (SEQ ID NO: 72)
PAX6_F: 5'-GTCCATCTTTGCTTGGGAAA-3' (SEQ ID NO: 73)
PAX6_R: 5'-TAGCCAGGTTGCGAAGAAGT-3' (SEQ ID NO: 74)

Анализы экспрессии гена TaqMan:

HLA-E: Hs03045171_m1

CD8: Hs00233520_m1

IL-2: Hs00174114_m1

RPLP0 (внутренний контроль): Hs99999902_m1

FACS антитела α -HLA-A2 (PE-конъюгированный), клон BB7.2, Biolegend, кат. № 343305 α -HLA-ABC (PE-конъюгированный), клон W6/32, Biolegend, кат. № 311406 α -HLA-E (PE-конъюгированный), клон 3D12, Biolegend, кат. № 342603 α -HLA-G (PE-конъюгированный), клон MEM-G/9, Abcam, кат. № ab24384 α -HLA-DR (АПК-конъюгированный), клон MEM-12, ThermoFisher Scientific, кат. № MA1-10347 α -B2M (АПК-конъюгированный), клон 2M2, Biolegend кат. № 316311 α -PD-L1 (АПК-конъюгированный), клон 29E.2A3, Biolegend, кат. № 329708 α -PD-1 (АПК-конъюгированный), клон EH12.2H7, Biolegend, Cat #329908 α -CD3 (АПК-конъюгированный), клон UCHT1, Biolegend, кат. № 300412 α -CD3 (Pacific Blue™-конъюгированный), клон UCHT1, Biolegend, кат. № 300418 α -CD4 (PE/Cy7-конъюгированный), клон RPA-T4, Biolegend, кат. № 300511 α -CD8 (PE-конъюгированный), клон SK1, Biolegend, кат. № 344705 α -CD25 (Alexa Fluor® 700-конъюгированный), клон M-A251, Biolegend, кат. № 356117 α -CD47 (PE-конъюгированный), клон CC2C6, Biolegend, кат. № 323108 α -CD56 (PE-конъюгированный), клон HCD56, Biolegend, кат. № 318306 α -CD69 (Alexa Fluor® 647-конъюгированный), клон FN50, Biolegend, кат. № 310918 α -CD107a (АПК-конъюгированный), клон H4A3, Biolegend, кат. № 328620 α -CD144 (PE-конъюгированный), клон 55-7H1, BD Biosciences, кат. № 560410*Изотипы*

Изотип 1: мышинный IgG2b, к-изотипический контроль (АПК-конъюгированный), Biolegend, кат. № 400322

Изотип 2: мышинный IgG2b, к-изотипический контроль (PE-конъюгированный), Biolegend, кат. № 401208

Изотип 3: мышинный IgG2a, к-изотипический контроль (PE-конъюгированный), Biolegend, кат. № 400214

Иммунофлуоресцентные антитела α -OCT4, Abcam, кат. № ab19857 α -NANOG, Abcam кат. № ab21624 α -SSEA3, Millipore, кат. № MAB4303 α -SSEA4, Millipore, кат. № MAB4304 α -TRA-1-60, Millipore, кат. № MAB4360

Вторичные антитела осла против кроличьего IgG (H+L), конъюгат Alexa Fluor® 488, Life Technologies, кат. № A-21206

Вторичные антитела мыши против кроличьего IgG (H+L), конъюгат Alexa Fluor® 488, Life Technologies, кат. № A-21202

Козье антитело против тяжелой цепи IgM мыши, конъюгат Alexa Fluor® 555, Life Technologies, кат. № A-21426

Культура человеческих ES-клеток, электропорация и отбор по чувствительности к лекарственному средству

Клетки HUES8 (Cowan et al., 2004) выращивали на планшетах с предварительно нанесенным покрытием Geltrex (Life Technologies) и культивировали в mTeSR1 (StemCell Technologies) с добавлением пенициллина/стрептомицина. Для пассирования клетки диссоциировали реагентом для деликатной диссоциации клеток (StemCell Technologies) в течение 5-10 мин и помещали в свежую среду с добавлением RevitaCell™ (ThermoFisher Scientific). Для электропорации, как описано ранее (Peters et al., 2013), клетки HUES8 диссоциировали на одиночные клетки, и 10 миллионов клеток подвергали электропорации с 50 мкг pCas9_GFP (Addgene, №44719) и в общей сложности 50 мкг плазмиды гРНК для нокаута гена. Для нокина гена в локусе AAVS1 клетки электропорировали с помощью 50 мкг pCas9_GFP, 25 мкг gRNA_AAVS1-T2 (Addgene, №41818) и 40 мкг двухцепочечной донорской плазмиды. Для нокаута гена, клетки собирали через 48 часов после электропорации. GFP-экспрессирующие клетки были обогащены FACS (FACSAria II, BD Biosciences) и повторно высеяны на 10-см планшеты для культивирования тканей из расчета 15000 клеток/планшет в свежей среде с добавлением RevitaCell™, чтобы обеспечить образование колоний единичных клеток. Альтернативно, для нокина гена, клетки через 48 часов после электропорации отбирали с помощью бластицидина (ThermoFisher Scientific) в концентрации 2 мкг/мл в течение 5 дней. Затем вручную собирали и размножали колонии клеток.

Редактирование генома CRISPR/Cas9

Пятьсот пар оснований каждого участка против хода транскрипции или по ходу транскрипции от HLA-A/B/C амплифицировали из клеток HUES8 или HEK293T и секвенировали по Сэнгеру (Genewiz). Последовательность, консервативная между двумя клеточными линиями, была выбрана в качестве эталонной последовательности, и sgРНК были разработаны с применением инструмента проектирования CRISPR, разработанного лабораторией Фэн Чжан в MIT (доступно на: crispr.mit.edu) и CCTop (Stemmer et al., 2015). Были отобраны ранжированные sgРНК и клонированы в вектор экспрессии гРНК (Addgene #41824). Затем плазмиды гРНК трансфицировали в клетки HEK293T, экстрагировали геномную ДНК и анализировали ампликоны ПЦР, покрывающие участок разреза, с помощью TIDE (доступного по адресу: tide.nki.nl) для определения эффективности на мишени. Для редактирования генома в клетках HUES8 использовали одиночные гидовые РНК с наивысшей активностью в отношении мишени. Чтобы построить донорскую плазмиду с нокином, ORF PD-L1, HLA-G и CD47 были индивидуально клонированы и соединены последовательностью 2A с применением Gibson Assembly® (New England BioLabs). Кассеты 3-в-1 затем вставляли в плазмиду AAVS1-Blasticidine-CAG-Flpe-ERT2 (Addgene, №68461) между сайтами рестрикции Sal I и Mlu I, после того как Flpe-ERT2 был вырезан. Детали редактирования генома человеческих ESC были описаны ранее (Peters et al., 2013).

Получение нокаутной (KO) по HLA клеточной линии

Вкратце, чтобы нокаутировать соседние гены *HLA-B/-C*, всего четыре sgРНК совместно электропорировали вместе с плазмидой экспрессии Cas9 в HUES8 дикого типа (ДТ). Праймеры, показанные на Фиг. 6А затем применяли для скрининга клонов с гомозиготным нокаутом (эффективность *HLA-B/-C*^{-/-}: 1,56 %). Также наблюдались клоны с гетерозиготным нокаутом (эффективность *HLA-B/-C*^{+/-}: 7,8 %). Гомозиготные клоны дополнительно проверяли на устранение экспрессии мРНК *HLA-B/-C* с помощью ПЦР в реальном времени, и нормальные кариотипы подтверждали анализом кариотипа человека nCounter (данные не показаны). Наконец, был выбран один кариотипически нормальный клон для дальнейшего нацеливания на гены *HLA-A* и *СІТА* за одну электропорацию. ПЦР с праймерами, показанными на Фиг. 6В и проточную цитометрию с применением антитела α -HLA-A2 проводили для скрининга нокаутированных по *HLA-A* клонов. Праймеры, показанные на Фиг. 6Е и секвенирование по Сэнгеру проводили для идентификации клонов, нокаутированных по *СІТА*. В результате после первого раунда нацеливания на *HLA-A/СІТА* наблюдались только гетерозиготные клоны (*HLA-A*^{+/-}*СІТА*^{+/-индел}) (эффективность *HLA-A*^{+/-}: 3,68 %). Таким образом, еще один раунд электропорации с применением sgРНК *HLA-A/СІТА* был применен к одному кариотипически нормальному гетерозиготному клону, и были использованы те же стратегии скрининга. Наконец, был создан один гомозиготный клон (*HLA-A*^{-/-}*СІТА*^{индел/индел}) однако анализ методом FACS показал, что этот клон был смешанным клоном, который все еще содержал 1 % клеток *HLA-A*⁺. После субклонирования был получен чистый гомозиготный клон (Нокаутный по *HLA*, КО).

Кариотипирование

Г-бэндинг кариотипа было выполнено с помощью Cell Line Genetics.

Направленная дифференциация на три слоя зародышей

Клеточные линии ДТ и HuES8 с измененными генами дифференцировали на эктодерму, мезодерму и энтодерму в соответствии с протоколами на основе монослоя набора STEMdiff™ для трилинейной дифференциации (StemCell Technologies).

Дифференциация на эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки сосудов

Эндотелиальные клетки человека (EC) и клетки гладких мышц сосудов (VSMC) были дифференцированы в соответствии с опубликованными протоколами (Patsch et al., 2015). Вкратце, для дифференцировки EC, ESC помещали в среду N2B27 с добавлением 8 мкМ CHIR99021 (Cayman Chemical) и 25 нг/мл BMP4 (Peprotech) в течение 3 дней для индукции латеральной мезодермы. Затем среду заменяли на StemPro-34 с добавлением 200 нг/мл VEGF (Peprotech) и 2 мкМ форсколина (Abcam) в течение 2 дней для индукции EC. Затем клетки обогащали CD144⁺ клетками, используя разделение клеток MACS (Miltenyi Biotec). CD144⁺ клетки высевали на планшеты, покрытые фибронектином (Corning), в EBM™-2 с добавлением EGM-2 BulletKit™ (Lonza) для дальнейшей дифференцировки в течение по меньшей мере 7 дней. Для дифференцировки VSMC, ESC помещали в ту же среду на 3 дня, что и для дифференцировки EC. На 4 и 5 сутки среду заменили на N2B27 с добавлением 12,5 нг/мл PDGF-BB (Peprotech) и 12,5 нг/мл активина А (Cell Guidance Systems). Начиная с 6 дня клетки диссоциировали и высевали на покрытые желатином чашки в среде 231 с добавлением добавки для роста гладких мышц (ThermoFisher Scientific) для дальнейшей дифференцировки.

Выделение и культивирование первичных иммунных клеток человека

Кровь была взята от здоровых, не идентифицированных доноров (лейкопаки) в Центре переливания крови Джексона при Массачусетской больнице общего профиля, Бостон. Первичные Т-клетки человека, NK-клетки или CD14⁺ моноциты выделяли с помощью наборов для отрицательной селекции (коктейль для обогащения человеческих Т-клеток RosetteSep™, коктейль для обогащения человеческих NK-клеток RosetteSep™ и коктейль для обогащения человеческих моноцитов RosetteSep™, StemCell Technologies), соответственно. Выделенные Т-клетки культивировали в среде X-VIVO 10 (Lonza) с добавлением 5 % сыворотки человеческого АВ (Valley Biomedical), 5 % фетальной бычьей сыворотки, 1 % пенициллина/стрептомицина, GlutaMAX, незаменимых аминокислот MEM (ThermoFisher Scientific) и 20 Ед/мл ИЛ-2 (Peprotech). Выделенные NK-клетки культивировали в RPMI 1640 с L-глутамином (Corning) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки и 1 % пенициллина/стрептомицина. Выделенные моноциты дифференцировали в макрофаги в RPMI 1640 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, 1 % пенициллина/стрептомицина и 25-50 нг/мл М-CSF (Peprotech).

Проточная цитометрия

PBS, содержащий 1 % фетальной бычьей сыворотки (FBS), использовали в качестве промывочного буфера и буфера для окрашивания; PBS, содержащий 4 % FBS, использовали в качестве блокирующего буфера. В случае ЕС и VSMC, к блокирующему буферу добавляли реагент, блокирующий FcR (Miltenyi Biotec), в разведении 1:1000. Вкратце, иммунные клетки или другие диссоциированных одиночные клетки промывали один раз и блокировали блокирующим буфером на льду в течение 20 минут. Клетки окрашивали антителами на льду в течение 30-60 мин и дважды промывали перед анализом на FACSCalibur™ или LSR II (BD Biosciences). Данные были нанесены на график с применением программного обеспечения FlowJo (BD).

In Vitro анализ пролиферации Т-клеток

При использовании VSMC, клетки сначала обрабатывали митомицином (Fisher Scientific). Сто тысяч ЕС или VSMC помещали на 24-луночные планшеты и обрабатывали ИФН-γ (100 нг/мл) в течение 48 часов перед анализом. В день 0 совместной инкубации выделенные CD3⁺ Т-клетки метили с помощью CellTrace™ CFSE (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Прилипшие ЕС или VSMC дважды промывали PBS перед совместной инкубацией с 500 тысячами CFSE-меченных Т-клеток в среде для культивирования Т-клеток с добавлением 20 Ед/мл ИЛ-2 в течение 5 дней. Затем Т-клетки окрашивали антителами к CD3/4/8 перед анализом на LSR II на интенсивность CFSE. Т-клетки, культивированные в течение 5 дней без клеток-мишеней, использовали в качестве отрицательного контроля. Т-клетки, обработанные покрытыми активатором человеческих Т-клеток CD3/CD28 шариками Dynabeads™ (ThermoFisher Scientific) в течение 5 дней, служили положительным контролем.

In Vitro анализ активации Т-клеток и анализ секреции цитокинов

ЕС, происходящие из ESC, использовали в качестве клеток-мишеней. Условия совместного культивирования были такими же, как и в анализе пролиферации Т-клеток, за исключением того, что Т-клетки не были помечены. После 5-дневного совместного культивирования Т-клетки окрашивали на маркеры активации Т-клеток перед анализом на LSR II. Для количественного определения множественных секретируемых цитокинов супернатанты собирали и анализировали с помощью настроенной платформы MSD U-PLEX (Meso Scale Discovery) в соответствии с инструкциями производителя. Т-клетки или клетки-мишени, культивированные в течение 5 дней, использовали в качестве отрицательного контроля. Т-клетки, которые

активировали покрытыми активатором человеческих Т-клеток CD3/CD28 шариками Dynabeads™ (ThermoFisher Scientific) в течение 5 дней, служили положительным контролем. Фоновую активацию оценивали с применением Т-клеток, инкубированных с кондиционированной средой из ЕС или VSMC. Кондиционированную среду готовили, как описано выше.

In Vitro анализ уничтожения T/NK-клеток

VSMC, происходящие из ESC, использовали в качестве клеток-мишеней. Для анализа уничтожения Т-клеток условия совместной инкубации были такими же, как и для анализа активации Т-клеток. Для анализа уничтожения NK-клеток 40 тысяч VSMC и NK-клеток при указанных соотношениях эффектор/мишень совместно инкубировали в 200 мкл среды для NK-клеток в 96-луночной планшете с U-дном в течение 20 часов перед сбором супернатантов. После совместной инкубации супернатанты собирали и анализировали с помощью набора для анализа цитотоксичности Pierce™ ЛДГ (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Среду для Т-клеток или среду для NK-клеток (RPMI-10) использовали в качестве фонового контроля. Т/NK-клетки, культивируемые отдельно, или клетки-мишени, культивируемые отдельно, использовали в качестве контроля для спонтанного высвобождения ЛДГ. Лизированные клетки-мишени в конечной точке применяли для максимального высвобождения ЛДГ.

Предварительная сенсibilизация аллогенных CD8⁺ Т-клеток человека

Первичные CD8⁺ Т-клетки человека выделяли с применением коктейля для обогащения CD8⁺ Т-клеток человека RosetteSep™ (StemCell Technologies) и предварительно сенсibilизировали эмбрионными тельцами, полученными из HUES8, как описано ранее (Gornalusse et al., 2017). Вкратце, эмбрионные тельца индуцировали в суспензии в течение 5 дней с последующим культивированием прикрепленных клеток в течение еще 4 дней. Затем CD8⁺ Т-клетки культивировали совместно с прикрепленными клетками эмбрионного тела для предварительной сенсibilизации. Во время процесса избегали внеклеточного матрикса из ксеногенных ресурсов, такого как желатин, чтобы предотвратить неспецифическую активацию Т-клеток.

In Vivo анализ вторичного ответа Т-клеток

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с положениями Международного комитета по уходу и использованию животных Гарвардского университета. Рандомизация не использовалась. Все процедуры проводились в слепом режиме. Для образования тератом использовали иммунодефицитных самцов мышей SCID Beige (Taconic) в возрасте 8–10 недель. Два миллиона клеток HUES8 были инкапсулированы в стусток крови, и стусток крови вводили подкожно в каждый бок мышей SCID Beige. Размер тератомы измеряли штангенциркулем еженедельно после того, как тератома стала пальпироваться. Через четыре-шесть недель после трансплантации hESC один миллион предварительно сенсibilизированных аллогенных CD8⁺ Т-клеток человека вводили мышам через хвостовую вену. После инъекции Т-клеток размер тератомы измеряли на 2, 5 и 7 день; размер тератомы также измеряли за 2 дня до инъекции Т-клеток. На 8 день после инъекции тератомы собирали и анализировали с помощью кПЦР и окрашивания гематоксилином и эозином (H&E). Два аллогенных донора CD8⁺ Т-клеток использовали в одних и тех же экспериментальных условиях, и результаты были объединены в этом исследовании. Гистология была выполнена центром гистологии Гарвардского института стволовых клеток.

In Vitro анализ дегрануляции NK-клеток

Триста тысяч прикрепленных VSMC, полученных из ESC, высевали в 24-луночные планшеты за 24 часа до анализа. На следующий день VSMC промывали один раз PBS перед совместной инкубацией со 100 тысячами свежевыделенных NK-клеток в среде для NK-клеток, дополненной α -CD107a APC (Biolegend) и коктейлем из ингибиторов транспорта белка eBioscience™ (ThermoFisher Scientific). После добавления NK-клеток в лунки планшет вращали со скоростью 2000 об/мин в течение 5 минут для достижения достаточного контакта эффектор-мишень. После 20-часовой совместной инкубации NK-клетки окрашивали α -CD56 PE (Biolegend) перед анализом на FACSCalibur™ на экспрессию CD107a на клеточной поверхности. Культуры NK-клеток без клеток-мишеней, использовали в качестве отрицательного контроля. NK-клетки, обработанные коктейлем для активации клеток (без брэфельдина A), который включает PMA (форбол 12-мириостат-13-ацетат) и иономицин, использовали в качестве положительного контроля для дегрануляции.

In Vitro анализ фагоцитоза макрофагов

Моноциты выделяли из донорской крови путем отрицательной селекции с применением коктейля для обогащения человеческих моноцитов RosetteSep™ (StemCell Technologies). Моноциты помещали в бессывороточную среду для адгезии и созревания макрофагов в течение одной-трех недель в RPMI 1640 с добавлением 10 % FBS, 1 % пенициллина/стрептомицина и 25 нг/мл M-CSF (Peprotech). Макрофаги повторно высевали в 96-луночные μ -планшеты (там же) при плотности 100 тысяч/лунка за два дня до анализа. Для анализа дифференцированные VSMC предварительно обрабатывали 200 нМ стауропоорином (Sigma) в течение 1,5 часов для применения в обработанной STS группе. VSMC диссоциировали и метили pHrodo-красным (IncuCyte) в течение 1 ч при 37 °C. Тридцать тысяч меченых VSMC добавляли в каждую лунку, содержащую макрофаги, и совместно инкубированную культуру немедленно переносили на платформу для визуализации живых клеток Celldiscover 7 (Zeiss). Одно изображение на лунку испускания красной флуоресценции при фагоцитарном поглощении получали каждые 20 минут в течение 6 часов. Общую интегральную интенсивность (средняя интенсивность флуоресценции* общая площадь) анализировали для каждого изображения с применением программного обеспечения для визуализации ZEN (Zeiss). Частицы pHrodo-красным⁺ указывают на фагосомы внутри макрофагов, которые поглотили VSMC.

Создание клеточных линий CD47^{-/-} и B2M^{-/-} HUES8

Следующие четыре sgPHK CRISPR были использованы для нацеливания на первый кодирующий экзон CD47 в клетках HUES8.

5'-gGTCCTGCCTGTAAACGGCGG-3' (SEQ ID NO: 75)

5'-gGACCGCCGCGCGCGTCAC-3' (SEQ ID NO: 76)

5'-gCAGCAACAGCGCCGCTACC-3' (SEQ ID NO: 77)

5'-gTTCGCCCCCGCGGGCGTGT-3' (SEQ ID NO: 78)

Клетки окрашивали через 72 часа после электропорации анти-CD47 антителом (клон CC2C6), и отрицательные клетки CD47 выделяли с применением FACS Aria (BD). Колонии, происходящие из отдельных клеток, получали, как описано ранее (Peters et al., 2013), и впоследствии потеря экспрессии CD47 была подтверждена при помощи анализа методом FACS. Аналогичным образом была создана бета-2-микроглобулин (B2M)-дефицитная клеточная линия HUES 8 с применением следующей sgPHK:

5'-gCTACTCTCTTTTCTGGCC-3'. (SEQ ID NO: 79)

Лентивирусная трансдукция

Доксициклин-индуцируемый лентивирусный вектор Gateway (Invitrogen), содержащий ОРС для PD-L1, был сконструирован с помощью ПЦР-амплификации. Лентивирусы, экспрессирующие PD-L1, упаковывали путем трансфекции клеток HEK293T PD-L1-экспрессирующим вектором, и упаковывающих плазмид pMDL, pVSVG и pREV. Среду, содержащую лентивирусные частицы, собирали через 48 часов после трансфекции и использовали для трансдукции VSMC вместе с лентивирусными частицами, кодирующими доксициклин-связывающий трансаактиватор rtTA. Через 24 часа VSMC обрабатывали доксициклином (10 мкг/мл) для индукции экспрессии PD-L1, что подтверждали с помощью FACS. Оценку пролиферации Т-клеток против VSMC, сверхэкспрессирующих PD-L1, проводили, как описано выше, за исключением 7-дневной совместной инкубации и присутствия доксициклина на протяжении всей совместной инкубации. При добавлении доксициклина не наблюдалось никакого эффекта на пролиферацию Т-клеток.

Иммунофлуоресценция

PBS, содержащий 0,05 % Твин-20, был промывочным буфером между каждым этапом после фиксации клеток. Вкратце, клетки промывали PBS, фиксировали 4 % параформальдегидом и пропитывали 0,1 % Тритон X-100. Клетки блокировали 4 % ослиной сывороткой (Jackson ImmunoResearch Laboratories) при 4 °C в течение ночи и инкубировали с соответствующими первичными антителами, разведенными в блокирующем буфере, при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем клетки инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor® 488- или Alexa Fluor® 555 (Life Technologies). Клетки промывали и ядра окрашивали Hoechst. Изображения были визуализированы с помощью инвертированного микроскопа Nikon.

Выделение РНК, синтез кДНК и кПЦР

РНК экстрагировали с использованием реагента TRIzol (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Синтез кДНК осуществляли с применением набора для синтеза кДНК SuperScript VILO (ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Была проведена кПЦР на основе SYBR green или TaqMan, и относительная количественная оценка была проведена с применением системы QuantStudio 12k Flex (ThermoFisher Scientific), а затем рассчитана с помощью сравнительного метода Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) относительно экспрессии соответствующего внутреннего контроля.

Анализ нецелевых сайтов на основе секвенирования следующего поколения (NGS)

Нецелевые сайты были предсказаны с помощью CCTop (Stemmer et al., 2015). Дизайн приманки, обогащение геномной ДНК (подготовка библиотеки) и NGS были выполнены Arbor Biosciences с применением набора myBaits® для захвата выбираемых мишеней. Вкратце, для каждого из 648 предсказанных нецелевых сайтов были созданы пять РНК-приманок для каждого нецелевого сайта и размещены каждые ~26 п.о., покрывая окно 181-182 п.о. После экстракции геномной ДНК из ДТ, а также из трех сконструированных линий hPSC, приманки с биотинилированной РНК гибридизовали с соответствующей библиотекой денатурированной геномной ДНК. Впоследствии гибриды РНК-гДНК связывали с покрытыми стрептавидином шариками, а вещества, не связанные специфически, смывали. Остальные библиотеки гДНК были амплифицированы и секвенированы NGS спаренных концов с применением NovaSeq (Illumina).

События редактирования генома количественно оценивались с помощью CRISPRessoPooled из пакета CRISPResso (версия 1.0.13) с настройками по умолчанию, если не указано иное (Pinello et al., 2016).

Вкратце, для каждой из четырех библиотек были отобраны более 25 прочтений с минимальной оценкой одной пары оснований (phred33) и выровнены по окну ± 100 п.о. вокруг каждого нецелевого сайта гРНК в геноме человека (hg38). Сайты (≈ 3) с менее чем 5 выровненными прочтениями в любой из библиотек были отфильтрованы. Программа рассчитывала процент прочтений с измененными последовательностями (вставка, делеция и замена) по сравнению с hg38 на каждом нецелевом сайте из каждой библиотеки. Если % прочтений с измененной последовательностью был > 0 в ДТ, а также во всех трех сконструированных линиях, последовательности были дополнительно проверены. В случае, если последовательности всех трех сконструированных линий соответствовали последовательности ДТ, они были классифицированы как SNP/PM; однако в случае, если последовательности из сконструированных клеточных линий отклонялись от последовательности ДТ, они были идентифицированы как события редактирования. Полиморфизмы (PM) представляют собой небольшие делеции/вставки вместо однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), наблюдаемых уже в hPSC дикого типа, отклоняясь от hg38.

Статистический анализ

Были построены графики и проведен статистический анализ с использованием Prism 7 (Graphpad).

Ссылки

- Abrahimi, P., Chang, W.G., Kluger, M.S., Qyang, Y., Tellides, G., Saltzman, W.M., and Pober, J.S. (2015). Efficient gene disruption in cultured primary human endothelial cells by CRISPR/Cas9. *Circ Res* 117, 121-128.
- Baldwin, W.M., 3rd, Valujskikh, A., and Fairchild, R.L. (2016). Mechanisms of antibody-mediated acute and chronic rejection of kidney allografts. *Curr Opin Organ Transplant* 21, 7-14.
- Beldi-Ferchiou, A., Lambert, M., Dogniaux, S., Vely, F., Vivier, E., Olive, D., Dupuy, S., Levasseur, F., Zucman, D., Lebbe, C., *et al.* (2016). PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget* 7, 72961-72977.
- Betancur, P.A., Abraham, B.J., Yiu, Y.Y., Willingham, S.B., Khameneh, F., Zarnegar, M., Kuo, A.H., McKenna, K., Kojima, Y., Leeper, N.J., *et al.* (2017). A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer. *Nat Commun* 8, 14802.
- Bour-Jordan, H., Salomon, B.L., Thompson, H.L., Szot, G.L., Bernhard, M.R., and Bluestone, J.A. (2004). Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells. *J Clin Invest* 114, 979-987.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., *et al.* (1998a). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799.
- Braud, V.M., Allan, D.S., Wilson, D., and McMichael, A.J. (1998b). TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* 8, 1-10.
- Brehm, M.A., Wiles, M.V., Greiner, D.L., and Shultz, L.D. (2014). Generation of improved humanized mouse models for human infectious diseases. *J Immunol Methods* 410, 3-17.
- Chen, H., Li, Y., Lin, X., Cui, D., Cui, C., Li, H., and Xiao, L. (2015). Functional disruption of human leukocyte antigen II in human embryonic stem cell. *Biol Res* 48, 59.
- Chhabra, A., Ring, A.M., Weiskopf, K., Schnorr, P.J., Gordon, S., Le, A.C., Kwon, H.S., Ring, N.G., Volkmer, J., Ho, P.Y., *et al.* (2016). Hematopoietic stem cell transplantation in immunocompetent hosts without radiation or chemotherapy. *Sci Transl Med* 8, 351ra105.

Collins, T., Korman, A.J., Wake, C.T., Boss, J.M., Kappes, D.J., Fiers, W., Ault, K.A., Gimbrone, M.A., Jr., Strominger, J.L., and Pober, J.S. (1984). Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4917-4921.

Cowan, C.A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J.P., Wang, S., Morton, C.C., McMahon, A.P., Powers, D., *et al.* (2004). Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350, 1353-1356.

de Almeida, P.E., Ransohoff, J.D., Nahid, A., and Wu, J.C. (2013). Immunogenicity of pluripotent stem cells and their derivatives. *Circ Res* 112, 549-561.

de Rham, C., and Villard, J. (2014). Potential and limitation of HLA-based banking of human pluripotent stem cells for cell therapy. *J Immunol Res* 2014, 518135.

Della Chiesa, M., Pesce, S., Muccio, L., Carlomagno, S., Sivori, S., Moretta, A., and Marcenaro, E. (2016). Features of Memory-Like and PD-1(+) Human NK Cell Subsets. *Front Immunol* 7, 351.

Diehl, M., Munz, C., Keilholz, W., Stevanovic, S., Holmes, N., Loke, Y.W., and Rammensee, H.G. (1996). Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Curr Biol* 6, 305-314.

Ding, Q., Regan, S.N., Xia, Y., Oostrom, L.A., Cowan, C.A., and Musunuru, K. (2013). Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* 12, 393-394.

Djamali, A., Kaufman, D.B., Ellis, T.M., Zhong, W., Matas, A., and Samaniego, M. (2014). Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant* 14, 255-271.

Drukker, M., Katz, G., Urbach, A., Schuldiner, M., Markel, G., Itskovitz-Eldor, J., Reubinoff, B., Mandelboim, O., and Benvenisty, N. (2002). Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9864-9869.

Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr., Ellis, M.C., Fullan, A., *et al.* (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13, 399-408.

Ferreira, L.M.R., Meissner, T.B., Tilburgs, T., and Strominger, J.L. (2017). HLA-G: At the Interface of Maternal-Fetal Tolerance. *Trends Immunol* 38, 272-286.

Glas, R., Franksson, L., Ohlen, C., Hoglund, P., Koller, B., Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1992). Major histocompatibility complex class I-specific and -restricted killing of beta 2-microglobulin-deficient cells by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11381-11385.

Gordon, S.R., Maute, R.L., Dulken, B.W., Hutter, G., George, B.M., McCracken, M.N., Gupta, R., Tsai, J.M., Sinha, R., Corey, D., *et al.* (2017). PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* 545, 495-499.

Gornalusse, G.G., Hirata, R.K., Funk, S.E., Rioloobos, L., Lopes, V.S., Manske, G., Prunkard, D., Colunga, A.G., Hanafi, L.A., Clegg, D.O., *et al.* (2017). HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol* 35, 765-772.

Iniotaki-Theodoraki, A. (2001). The role of HLA class I and class II antibodies in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 6, 150-152.

Jaiswal, S., Jamieson, C.H., Pang, W.W., Park, C.Y., Chao, M.P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N., and Weissman, I.L. (2009). CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138, 271-285.

Krawczyk, M., and Reith, W. (2006). Regulation of MHC class II expression, a unique regulatory system identified by the study of a primary immunodeficiency disease. *Tissue Antigens* 67, 183-197.

Lee, N., Goodlett, D.R., Ishitani, A., Marquardt, H., and Geraghty, D.E. (1998a). HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 160, 4951-4960.

Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M., and Geraghty, D.E. (1998b). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5199-5204.

Li, Y., Masse-Ranson, G., Garcia, Z., Bruel, T., Kok, A., Strick-Marchand, H., Jouvion, G., Serafini, N., Lim, A.I., Dusseaux, M., et al. (2018). A human immune system mouse model with robust lymph node development. *Nat Methods* 15, 623-630.

Majeti, R., Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Pang, W.W., Jaiswal, S., Gibbs, K.D., Jr., van Rooijen, N., and Weissman, I.L. (2009). CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138, 286-299.

Mandal, P.K., Ferreira, L.M., Collins, R., Meissner, T.B., Boutwell, C.L., Friesen, M., Vrbanc, V., Garrison, B.S., Stortchevoi, A., Bryder, D., et al. (2014). Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 15, 643-652.

Masson, E., Stern, M., Chabod, J., Thevenin, C., Gonin, F., Rebibou, J.M., and Tiberghien, P. (2007). Hyperacute rejection after lung transplantation caused by undetected low-titer anti-HLA antibodies. *J Heart Lung Transplant* 26, 642-645.

Mattapally, S., Pawlik, K.M., Fast, V.G., Zumaquero, E., Lund, F.E., Randall, T.D., Townes, T.M., and Zhang, J. (2018). Human Leukocyte Antigen Class I and II Knockout Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells: Universal Donor for Cell Therapy. *J Am Heart Assoc* 7, e010239.

Meissner, T.B., Mandal, P.K., Ferreira, L.M., Rossi, D.J., and Cowan, C.A. (2014). Genome editing for human gene therapy. *Methods Enzymol* 546, 273-295.

Melkus, M.W., Estes, J.D., Padgett-Thomas, A., Gatlin, J., Denton, P.W., Othieno, F.A., Wege, A.K., Haase, A.T., and Garcia, J.V. (2006). Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat Med* 12, 1316-1322.

Meri, S., Morgan, B.P., Davies, A., Daniels, R.H., Olavesen, M.G., Waldmann, H., and Lachmann, P.J. (1990). Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* 71, 1-9.

Michaels, P.J., Fishbein, M.C., and Colvin, R.B. (2003). Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopathol* 25, 119-140.

Nakajima, F., Tokunaga, K., and Nakatsuji, N. (2007). Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem Cells* 25, 983-985.

Patsch, C., Challet-Meylan, L., Thoma, E.C., Urich, E., Heckel, T., O'Sullivan, J.F., Grainger, S.J., Kapp, F.G., Sun, L., Christensen, K., et al. (2015). Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* 17, 994-1003.

Pazmany, L., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D.M., Reyburn, H.T., and Strominger, J.L. (1996). Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science* 274, 792-795.

- Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K., and Kershaw, M.H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* 89, 216-224.
- Peters, D.T., Cowan, C.A., and Musunuru, K. (2013). Genome editing in human pluripotent stem cells. In *StemBook* (Cambridge (MA)).
- Pinello, L., Canver, M.C., Hoban, M.D., Orkin, S.H., Kohn, D.B., Bauer, D.E., and Yuan, G.C. (2016). Analyzing CRISPR genome-editing experiments with CRISPResso. *Nat Biotechnol* 34, 695-697.
- Raulet, D.H. (2006). Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin Immunol* 18, 145-150.
- Reith, W., and Mach, B. (2001). The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol* 19, 331-373.
- Riley, J.L. (2009). PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 229, 114-125.
- Riolobos, L., Hirata, R.K., Turtle, C.J., Wang, P.R., Gornalusse, G.G., Zavajlevski, M., Riddell, S.R., and Russell, D.W. (2013). HLA engineering of human pluripotent stem cells. *Mol Ther* 21, 1232-1241.
- Rong, Z., Wang, M., Hu, Z., Stradner, M., Zhu, S., Kong, H., Yi, H., Goldrath, A., Yang, Y.G., Xu, Y., et al. (2014). An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell Stem Cell* 14, 121-130.
- Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J., Strowig, T., Gearty, S.V., Teichmann, L.L., Saito, Y., Marches, F., Halene, S., Palucka, A.K., et al. (2014). Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol* 32, 364-372.
- Roth, T.L., Puig-Saus, C., Yu, R., Shifrut, E., Carnevale, J., Li, P.J., Hiatt, J., Saco, J., Krystofinski, P., Li, H., et al. (2018). Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature* 559, 405-409.
- Sadelain, M., Papapetrou, E.P., and Bushman, F.D. (2011). Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer* 12, 51-58.
- Salomon, B., and Bluestone, J.A. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19, 225-252.
- Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J., and Mateo, J.L. (2015). CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* 10, e0124633.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Tapia, N., and Scholer, H.R. (2016). Molecular Obstacles to Clinical Translation of iPSCs. *Cell Stem Cell* 19, 298-309.
- Taylor, C.J., Bolton, E.M., Pocock, S., Sharples, L.D., Pedersen, R.A., and Bradley, J.A. (2005). Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* 366, 2019-2025.
- Ting, J.P., and Trowsdale, J. (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl, S21-33.
- Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 13, 88-100.
- Wang, D., Quan, Y., Yan, Q., Morales, J.E., and Wetsel, R.A. (2015). Targeted Disruption of the beta2-Microglobulin Gene Minimizes the Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* 4, 1234-1245.

Willingham, S.B., Volkmer, J.P., Gentles, A.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S.S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J.D., et al. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6662-6667.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.

Zhao, H., Wang, J., Kong, X., Li, E., Liu, Y., Du, X., Kang, Z., Tang, Y., Kuang, Y., Yang, Z., et al. (2016). CD47 Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer. *Sci Rep* 6, 29719.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Формула изобретения заявляет:

1. Стволовая клетка, имеющая пониженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II по сравнению со стволовыми клетками дикого типа и повышенную экспрессию толерогенного фактора по сравнению со стволовыми клетками дикого типа,
при этом человеческие лейкоцитарные антигены ГКГС-I представляют собой HLA-A, HLA-B и HLA-C,
при этом человеческие лейкоцитарные антигены ГКГС-II представляют собой HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR, и
при этом толерогенный фактор представляет собой CD47.
2. Стволовая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что, пониженная экспрессия человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I включает делеции человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I по меньшей мере из одного аллеля клетки.
3. Стволовая клетка по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что пониженная экспрессия человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II включает один или более инделей, вводимых в СПТА.
4. Стволовая клетка по любому из пп. 1-3, дополнительно имеющая пониженную экспрессию СПТА.
5. Стволовая клетка по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что толерогенный фактор вставлен в локус «безопасная гавань» по меньшей мере одного аллеля клетки.
6. Стволовая клетка по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что стволовая клетка не экспрессирует HLA-A, HLA-B и HLA-C.
7. Стволовая клетка по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что стволовая клетка не экспрессирует HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR.
8. Стволовая клетка по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что стволовая клетка не экспрессирует СПТА.
9. Стволовая клетка по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что толерогенный фактор дополнительно включает HLA-G и/или PD-L1.
10. Стволовая клетка, которая не экспрессирует HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR и экспрессирует CD47.
11. Стволовая клетка по п. 10, отличающаяся тем, что клетка представляет собой СПТАиндел/индел, HLA-A-/-, HLA-B-/-, и HLA-C-/- стволовую клетку.

12. Способ получения гипои иммуногенной стволовой клетки, включающий снижение экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II стволовой клетки и усиление экспрессии толерогенного фактора стволовой клетки, тем самым получая гипои иммуногенную стволовую клетку, при этом человеческие лейкоцитарные антигены ГКГС-I представляют собой HLA-A, HLA-B и HLA-C, при этом человеческие лейкоцитарные антигены ГКГС-II представляют собой HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR, и при этом толерогенный фактор представляет собой CD47.
13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что снижение экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I включает делеции человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I по меньшей мере из одного аллеля стволовой клетки.
14. Способ по п. 12 или п. 13, отличающийся тем, что снижение экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II включает один или более инделей в СПТА.
15. Способ по любому из пп. 12-14, дополнительно включающий снижение экспрессии СПТА.
16. Способ по любому из пп. 12-15, отличающийся тем, что усиление экспрессии толерогенного фактора включает в себя встраивание толерогенного фактора в локус «безопасная гавань» по меньшей мере одного аллеля стволовой клетки.
17. Способ по любому из пп. 12-16, отличающийся тем, что толерогенный фактор дополнительно включает PD-L1 и/или HLA-G.
18. Способ по любому из пп. 12-17, отличающийся тем, что гипои иммуногенная стволовая клетка не экспрессирует HLA-A, HLA-B и HLA-C.
19. Способ по любому из пп. 12-18, отличающийся тем, что гипои иммуногенная стволовая клетка не экспрессирует HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR.
20. Способ по любому из пп. 12-19, отличающийся тем, что гипои иммуногенная стволовая клетка не экспрессирует СПТА.
21. Стволовая клетка, имеющая модулированную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и одного или более толерогенных факторов по сравнению со стволовыми клетками дикого типа.
22. Стволовая клетка по п. 21, отличающаяся тем, что один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I выбраны из группы, состоящей из HLA-A, HLA-B и HLA-C.

23. Стволовая клетка по п. 21 или п. 22, отличающаяся тем, что модулированная экспрессия одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I включает пониженную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I.
24. Стволовая клетка по любому из пп. 21-23, отличающаяся тем, что один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I удалены из генома клетки, тем самым модулируя экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I.
25. Стволовая клетка по любому из пп. 21-24, отличающаяся тем, что один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II выбраны из группы, состоящей из HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR.
26. Стволовая клетка по любому из пп. 21-25, отличающаяся тем, что модулированная экспрессия одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II включает пониженную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II.
27. Стволовая клетка по любому из пп. 21-26, отличающаяся тем, что один или более инделей были введены в СПТА, тем самым модулируя экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II.
28. Стволовая клетка по любому из пп. 21-27, отличающаяся тем, что клетка не экспрессирует HLA-A, HLA-B и HLA-C.
29. Стволовая клетка по любому из пп. 21-28, отличающаяся тем, что клетка представляет собой HLA-A^{-/-}, HLA-B^{-/-}, HLA-C^{-/-}, и СПТА ^{индел/индел} клетку.
30. Стволовая клетка по любому из пп. 21-29, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-G, PD-L1 и CD47.
31. Стволовая клетка по любому из пп. 21-30, отличающаяся тем, что модулированная экспрессия одного или более толерогенных факторов включает повышенную экспрессию одного или более толерогенных факторов.
32. Стволовая клетка по любому из пп. 21-31, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов вставлены в локус «безопасная гавань» *AAVS1*.
33. Стволовая клетка по любому из пп. 21-32, отличающаяся тем, что HLA-G, PD-L1 и CD47 вставлены в локус «безопасная гавань» *AAVS1*.
34. Стволовая клетка по любому из пп. 21-33, отличающаяся тем, что один или более толерогенных факторов ингибируют иммунное отторжение.

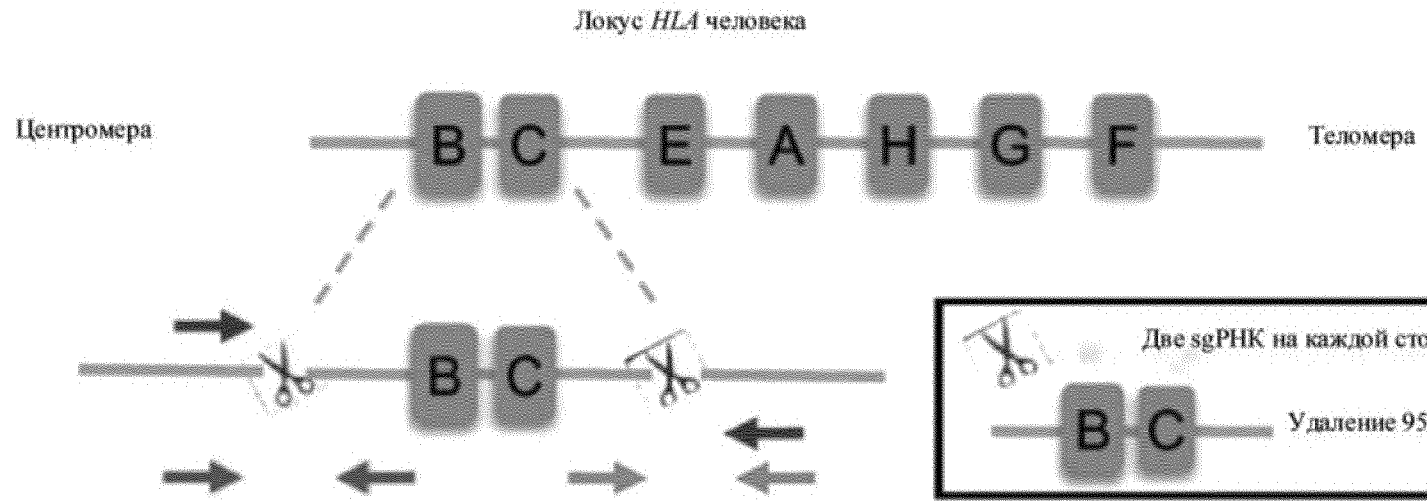
35. Стволовая клетка по любому из пп. 21-34, отличающаяся тем, что стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку.
36. Стволовая клетка по любому из пп. 21-34, отличающаяся тем, что стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.
37. Стволовая клетка по любому из пп. 21-34, отличающаяся тем, что стволовая клетка является гипоиimmunогенной.
38. Стволовая клетка по любому из пп. 21-34, отличающаяся тем, что стволовая клетка представляет собой стволовую клетку человека.
39. Стволовая клетка по любому из пп. 21-38, отличающаяся тем, что стволовая клетка сохраняет плюрипотентность.
40. Стволовая клетка по любому из пп. 21-39, отличающаяся тем, что стволовая клетка сохраняют способность к дифференцировке.
41. Стволовая клетка по любому из пп. 21-40, отличающаяся тем, что стволовая клетка демонстрирует пониженный Т-клеточный ответ.
42. Стволовая клетка по любому из пп. 21-41, отличающаяся тем, что стволовая клетка проявляет защиту от NK-клеточного ответа.
43. Стволовая клетка по любому из пп. 21-42, отличающаяся тем, что стволовая клетка демонстрирует пониженное поглощение макрофагами.
44. Стволовая клетка, которая не экспрессирует HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR.
45. Стволовая клетка по п. 44, отличающаяся тем, что стволовая клетка представляет собой HLA-A^{-/-}, HLA-B^{-/-}, HLA-C^{-/-}, и СИТА ^{инделл/инделл} клетку.
46. Стволовая клетка по п. 44 или п. 45, отличающаяся тем, что стволовая клетка экспрессирует толерогенные факторы HLA-G, PD-L1 и CD47.
47. Стволовая клетка по п. 46, отличающаяся тем, что толерогенные факторы вставлены в локус «безопасная гавань» *AAVS1*.
48. Стволовая клетка по п. 46 или п. 47, отличающаяся тем, что толерогенные факторы ингибируют иммунное отторжение.

49. Стволовая клетка по пп. 44-48, отличающаяся тем, что стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку.
50. Стволовая клетка по пп. 44-48, отличающаяся тем, что стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.
51. Стволовая клетка по пп. 44-48, отличающаяся тем, что стволовая клетка является гипои́ммуногенной.
52. Способ получения гипои́ммуногенной стволовой клетки, включающий модуляцию экспрессии одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и одного или более толерогенных факторов стволовой клетки относительно стволовой клетки дикого типа, тем самым получая гипои́ммуногенную стволовую клетку.
53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I выбраны из группы, состоящей из HLA-A, HLA-B и HLA-C.
54. Способ по п. 52 или п. 53, отличающийся тем, что модулированная экспрессия одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I включает пониженную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I.
55. Способ по любому из пп. 52-54, отличающийся тем, что один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I удалены из генома клетки, тем самым модулируя экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I.
56. Способ по любому из пп. 52-55, отличающийся тем, что один или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II выбраны из группы, состоящей из HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR.
57. Способ по любому из пп. 52-56, отличающийся тем, что модулированная экспрессия одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II включает пониженную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II.
58. Способ по любому из пп. 52-57, отличающийся тем, что один или более инделей были введены в СИТА, тем самым модулируя экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II.
59. Способ по любому из пп. 52-58, отличающийся тем, что гипои́ммуногенная стволовая клетка не экспрессирует HLA-A, HLA-B и HLA-C.
60. Способ по любому из пп. 52-59, отличающийся тем, что гипои́ммуногенная стволовая клетка представляет собой HLA-A^{-/-}, HLA-B^{-/-}, HLA-C^{-/-}, и СИТА ^{индел/индел} клетку.

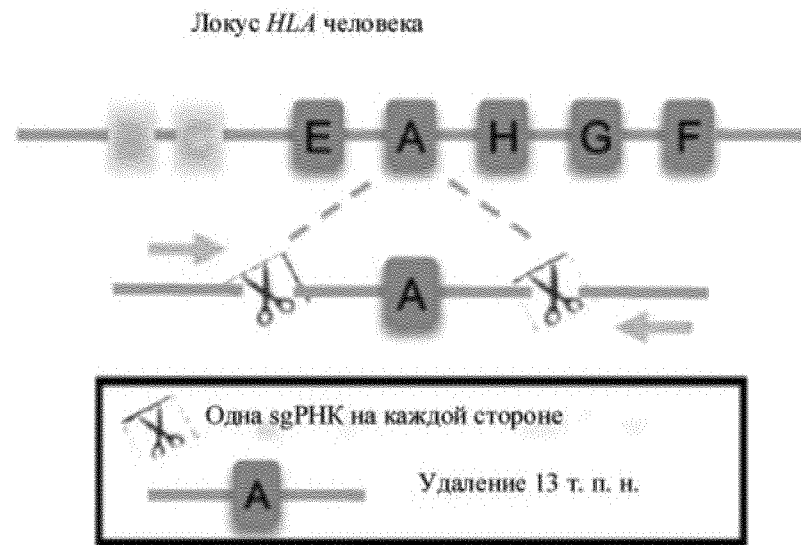
61. Способ по любому из пп. 52-60, отличающийся тем, что один или более толерогенных факторов выбраны из группы, состоящей из HLA-G, PD-L1 и CD47.
62. Способ по любому из пп. 52-61, отличающийся тем, что модулированная экспрессия одного или более толерогенных факторов включает повышенную экспрессию одного или более толерогенных факторов.
63. Способ по любому из пп. 52-62, отличающийся тем, что один или более толерогенных факторов вставлены в локус «безопасная гавань» *AAVS1*.
64. Способ по любому из пп. 52-63, отличающийся тем, что HLA-G, PD-L1 и CD47 вставлены в локус «безопасная гавань» *AAVS1*.
65. Способ по любому из пп. 52-64, отличающийся тем, что один или более толерогенных факторов ингибируют иммунное отторжение.
66. Способ по любому из пп. 52-65, отличающийся тем, что стволовая клетка сохраняет плюрипотентность.
67. Способ по любому из пп. 52-66, отличающийся тем, что гипоиимуногенная стволовая клетка сохраняет потенциал дифференцировки.
68. Способ по любому из пп. 52-67, отличающийся тем, что гипоиимуногенная стволовая клетка демонстрирует пониженный Т-клеточный ответ.
69. Способ по любому из пп. 52-68, отличающийся тем, что гипоиимуногенная стволовая клетка демонстрирует защиту от NK-клеточного ответа.
70. Способ по любому из пп. 52-69, отличающийся тем, что гипоиимуногенная стволовая клетка демонстрирует пониженное поглощение макрофагами.
71. Способ по п. 52, отличающийся тем, что стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и первой парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 1-2, тем самым редактируя ген HLA-A для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-A в стволовой клетке.
72. Способ по п. 52, отличающийся тем, что стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и первой парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 3-4, тем самым редактируя ген HLA-B для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-B в стволовой клетке.

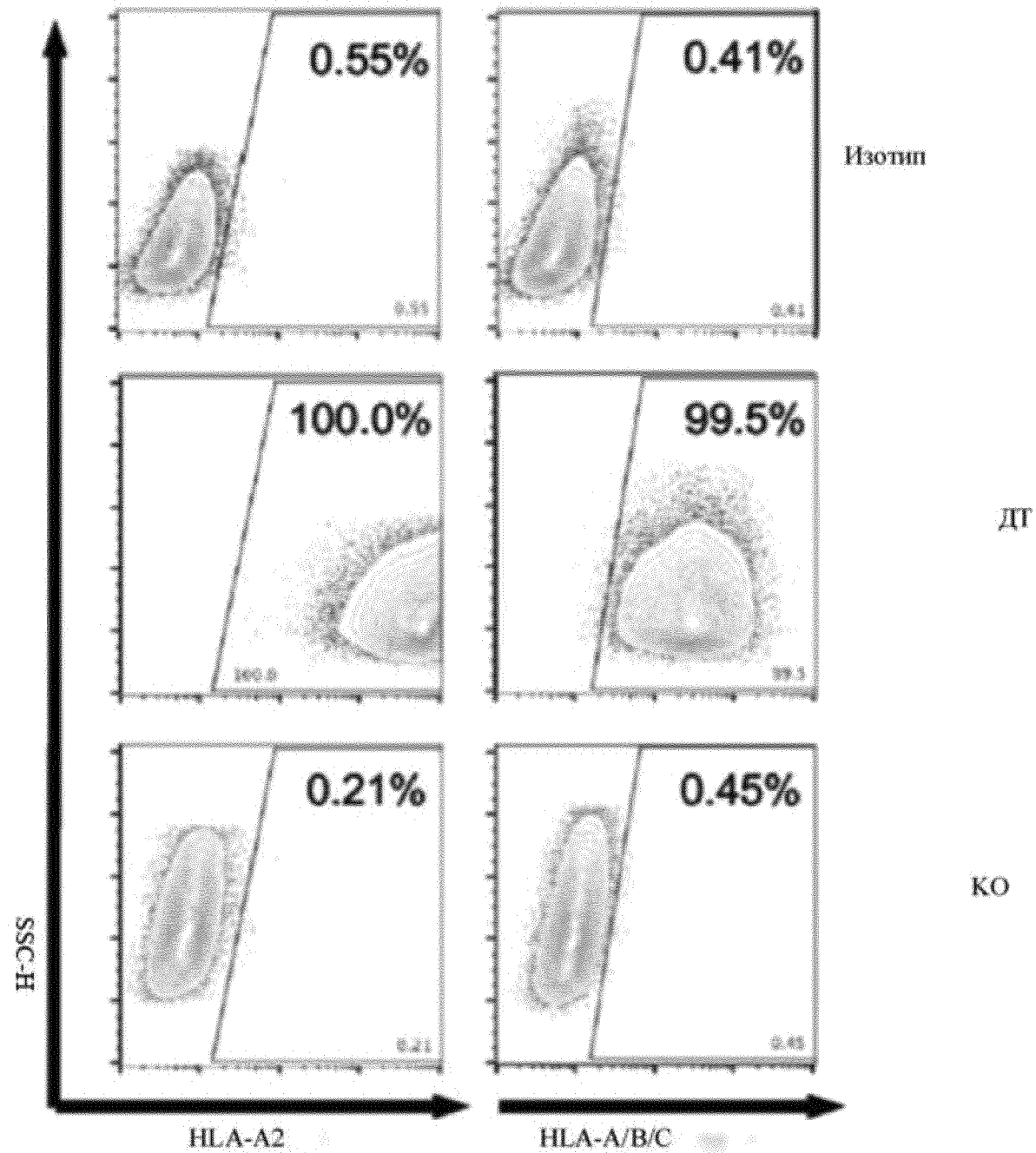
73. Способ по п. 52, отличающийся тем, что стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и первой парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 5-6, тем самым редактируя ген HLA-C для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-C в стволовых клетках.
74. Способ по п. 52, отличающийся тем, что стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и рибонуклеиновой кислотой, имеющей последовательность SEQ ID NO: 7, тем самым вводя индели в СІІТА для понижения или устранения поверхностной экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II и/или активности в стволовой клетке.
75. Способ получения гипои́ммуногенной стволовой клетки, включающий модуляцию экспрессии одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и одного или более толерогенных факторов стволовой клетки относительно стволовой клетки дикого типа, тем самым получая гипои́ммуногенную стволовую клетку,
- при этом стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и первой парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 1-2, тем самым редактируя ген HLA-A для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-A в стволовой клетке,
- при этом стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и второй парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 3-4, тем самым редактируя ген HLA-B для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-B в стволовой клетке,
- при этом стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и третьей парой рибонуклеиновых кислот, имеющих последовательности SEQ ID NO: 5-6, тем самым редактируя ген HLA-C для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности HLA-C в стволовой клетке, и
- при этом стволовая клетка приводится в контакт с белком Cas или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и рибонуклеиновой кислотой, имеющей последовательность SEQ ID NO: 7, тем самым вводя индели в СІІТА для понижения или устранения поверхностной экспрессии и/или активности человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-II в стволовой клетке.
76. Способ трансплантации по меньшей мере одной гипои́ммуногенной стволовой клетки пациенту, при этом гипои́ммуногенная стволовая клетка имеет модулированную экспрессию одного или более человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС-I и ГКГС-II и одного или более толерогенных факторов относительно стволовой клетки дикого типа.

ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

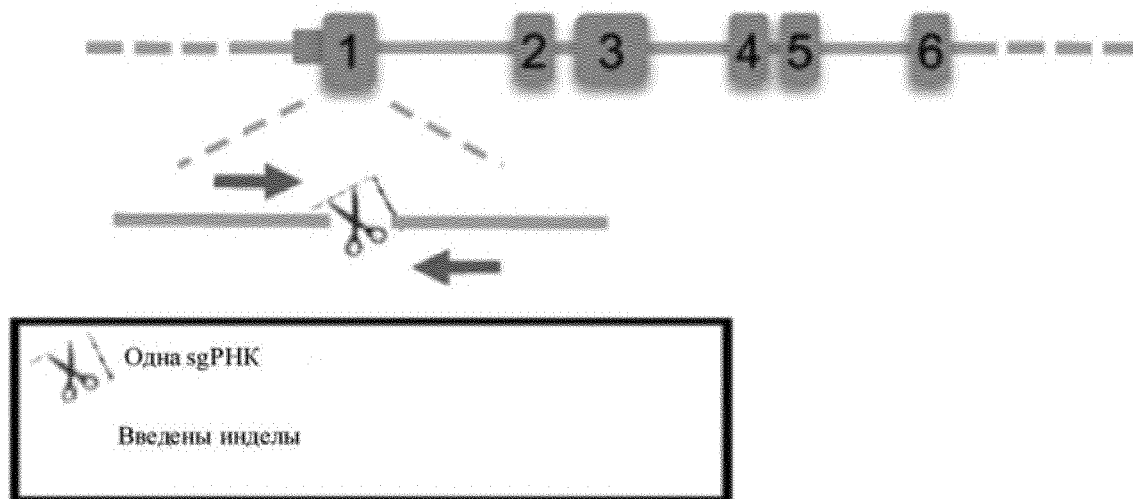




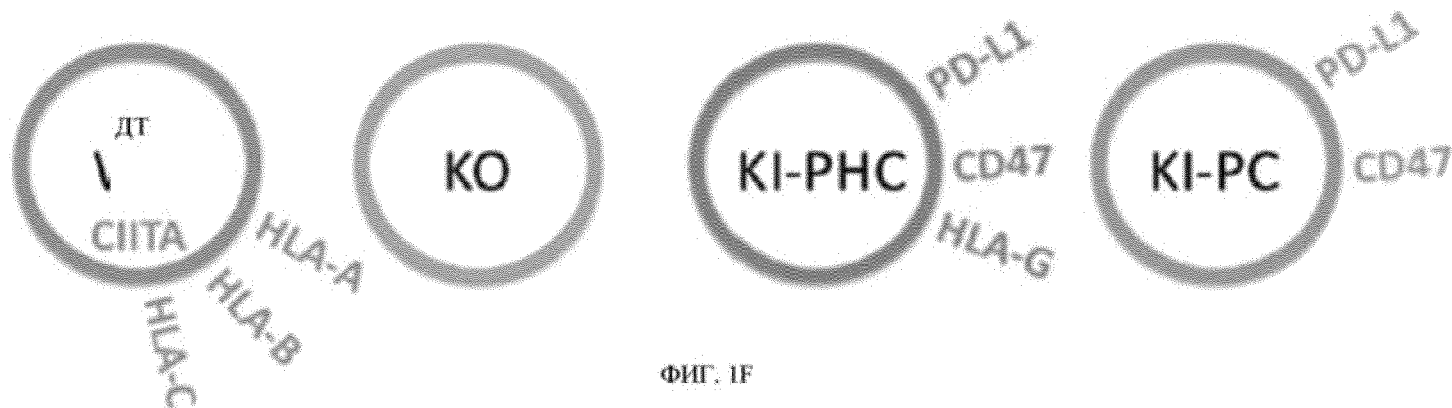
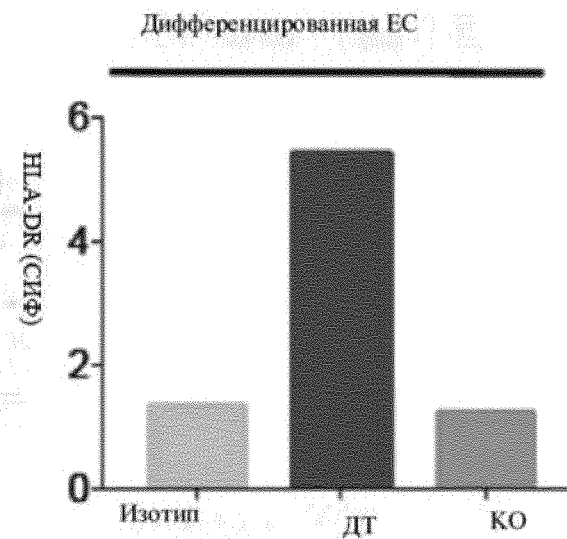
ФИГ. 1С

ФИГ. 1D

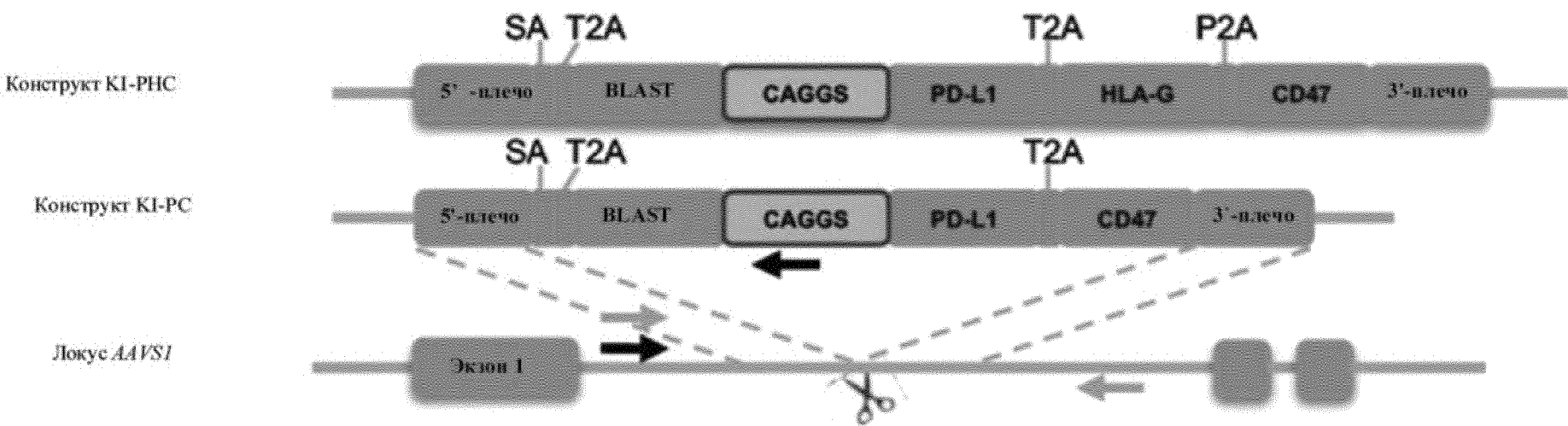
СИТА



ФИГ. 1E

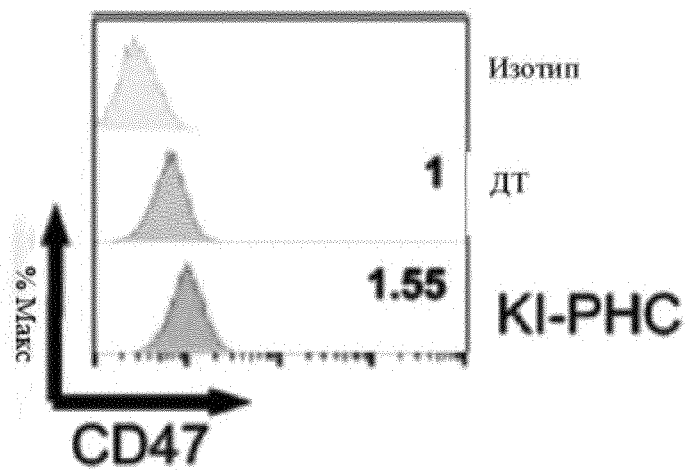
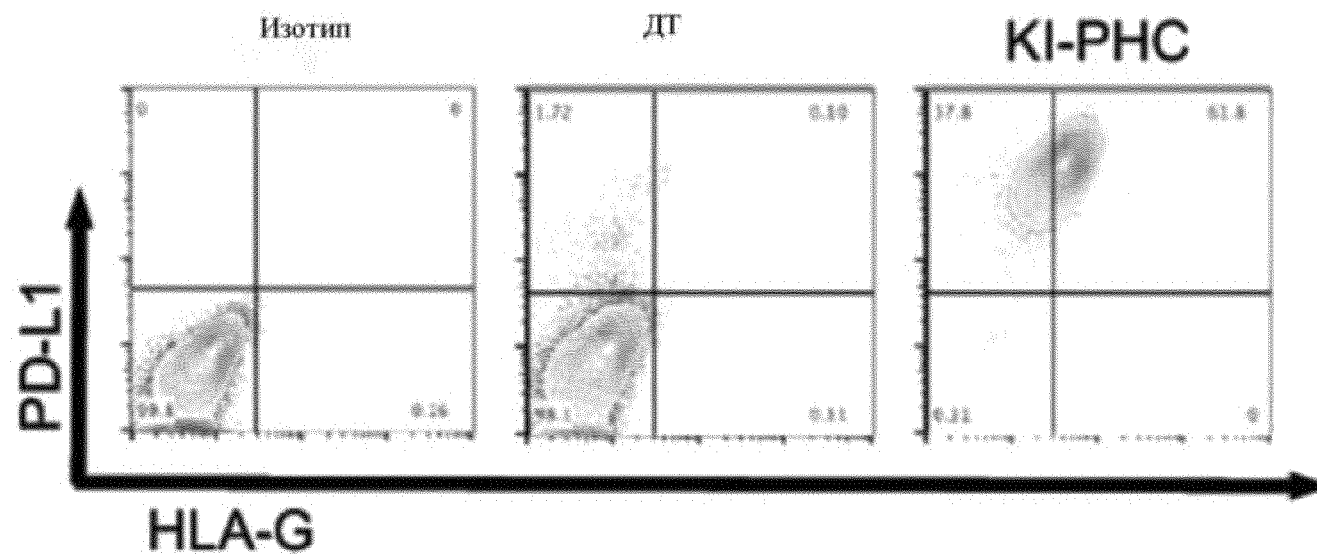


ФИГ. 1F

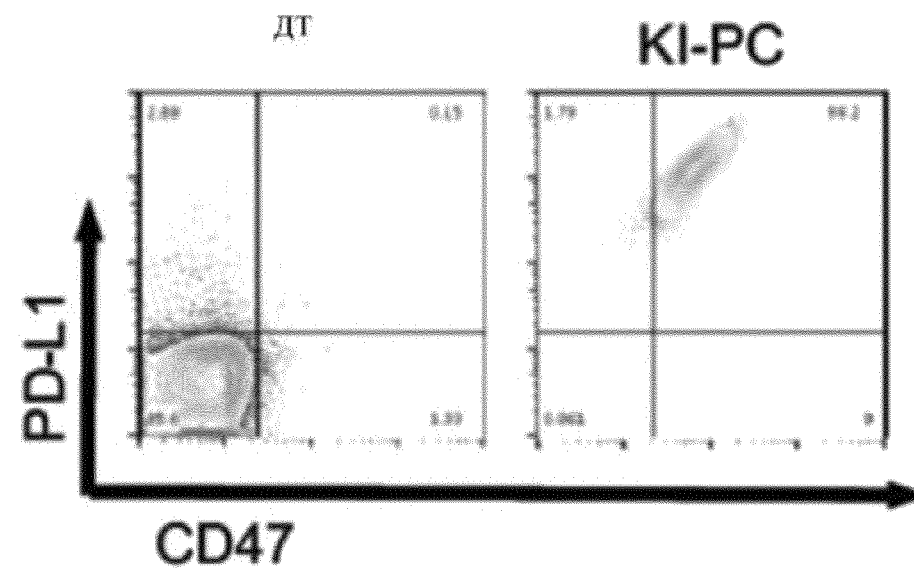


ФИГ. 1G

ФИГ. 1Н

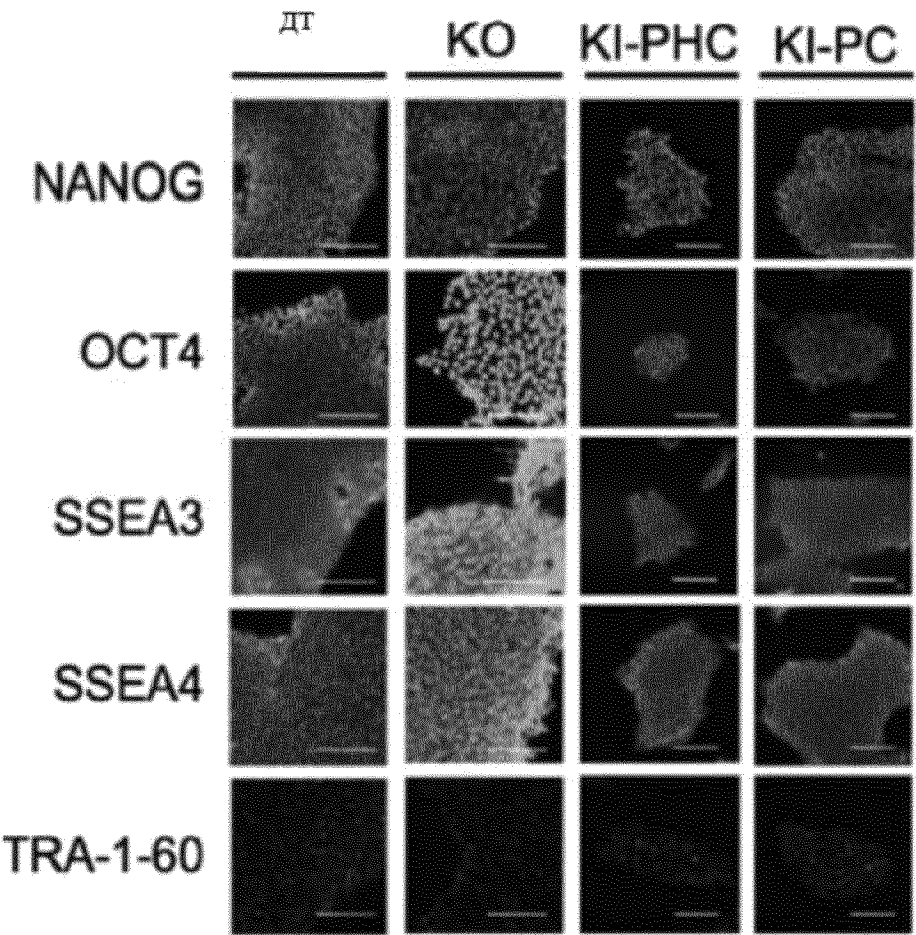


ФИГ. 1И

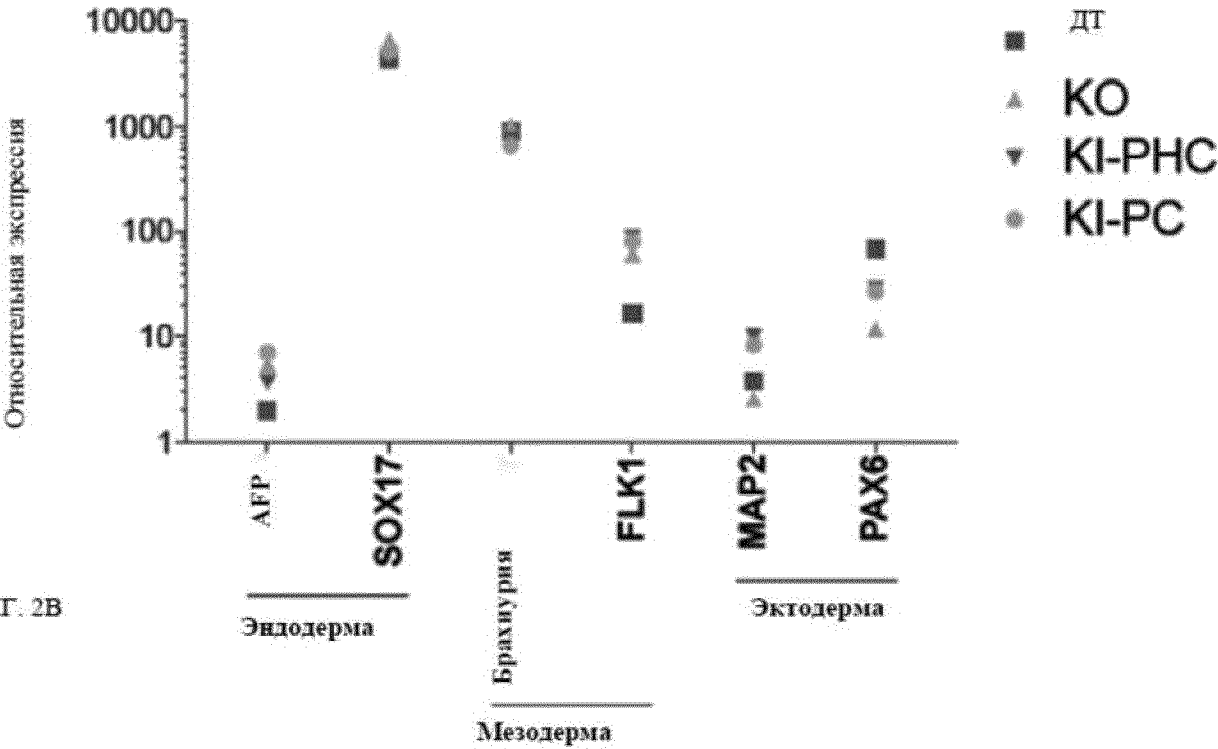


ФИГ. 1J

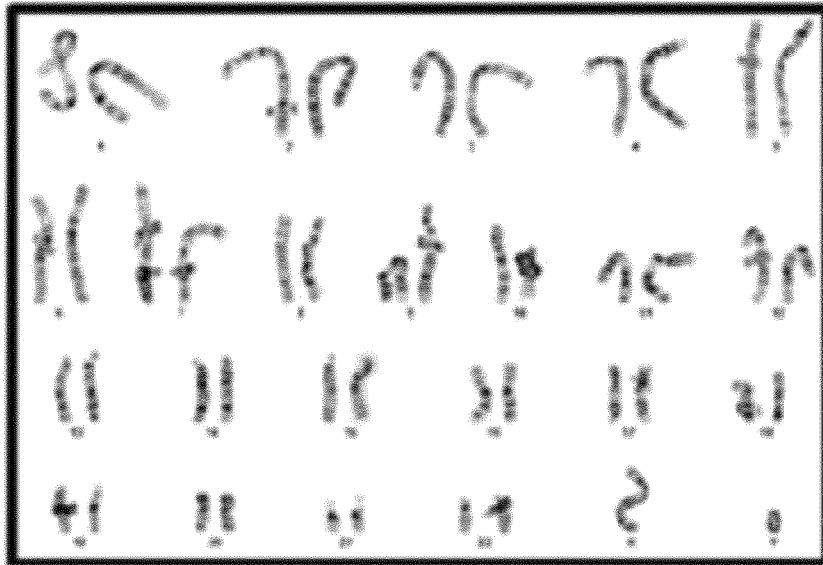
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

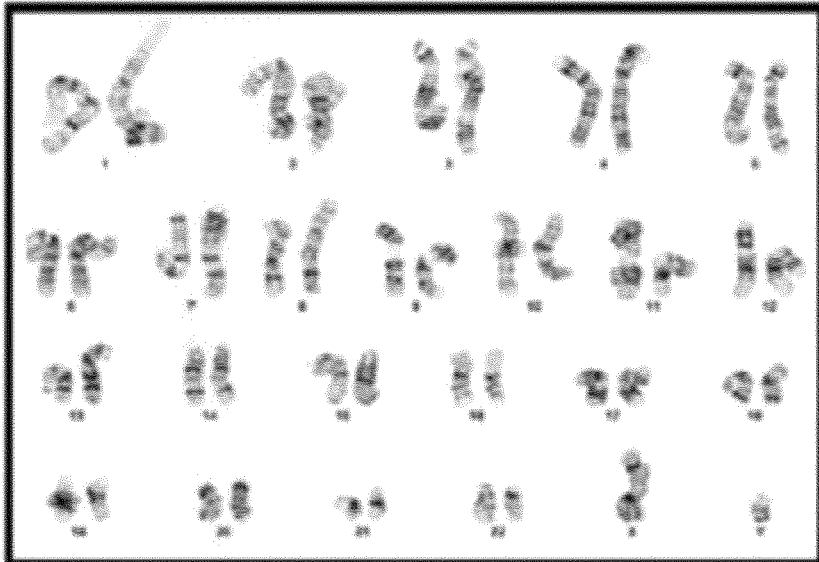


KO

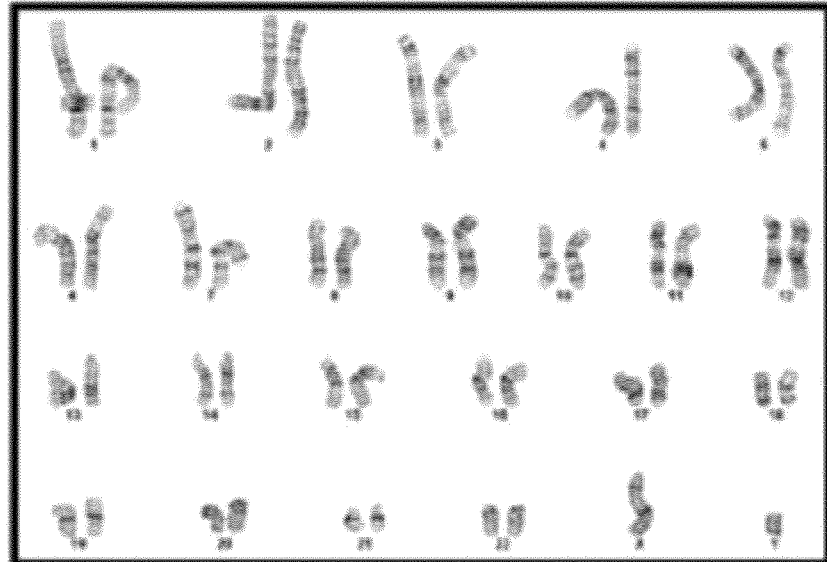


ФИГ. 2С

KI-PHC

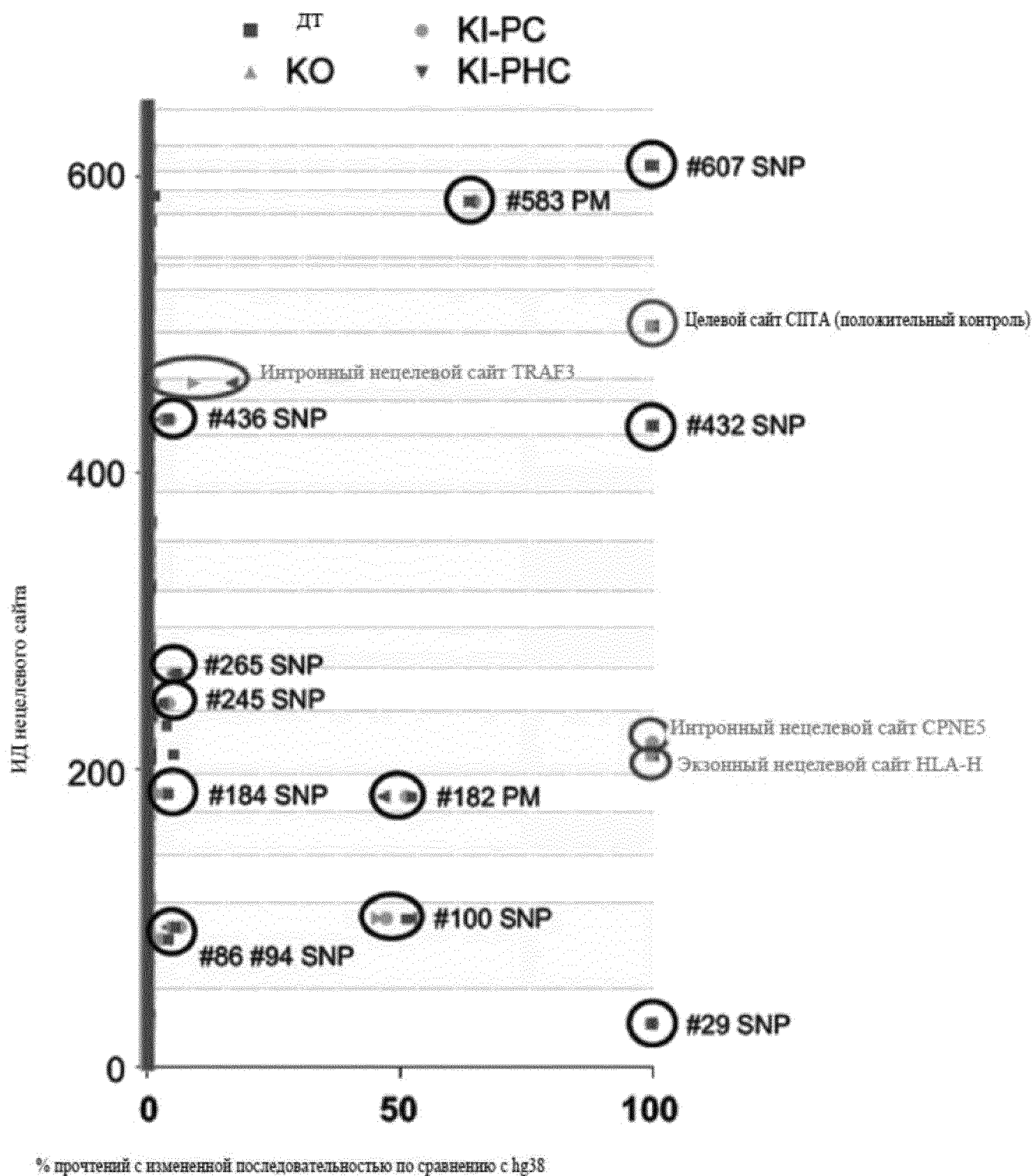


KI-PC

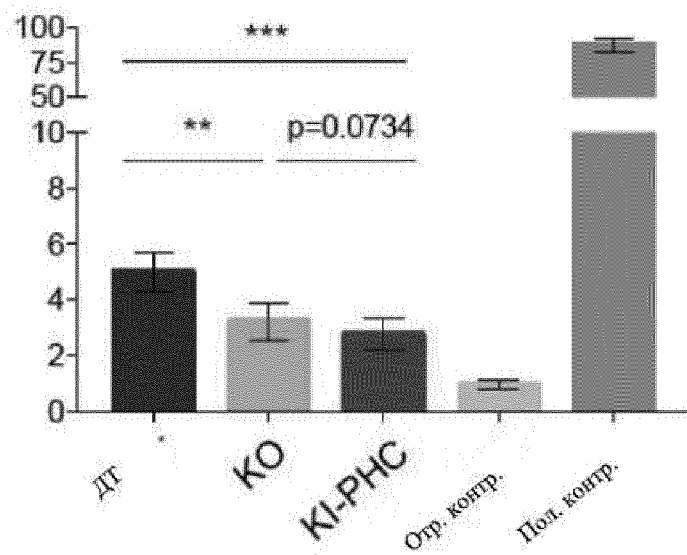
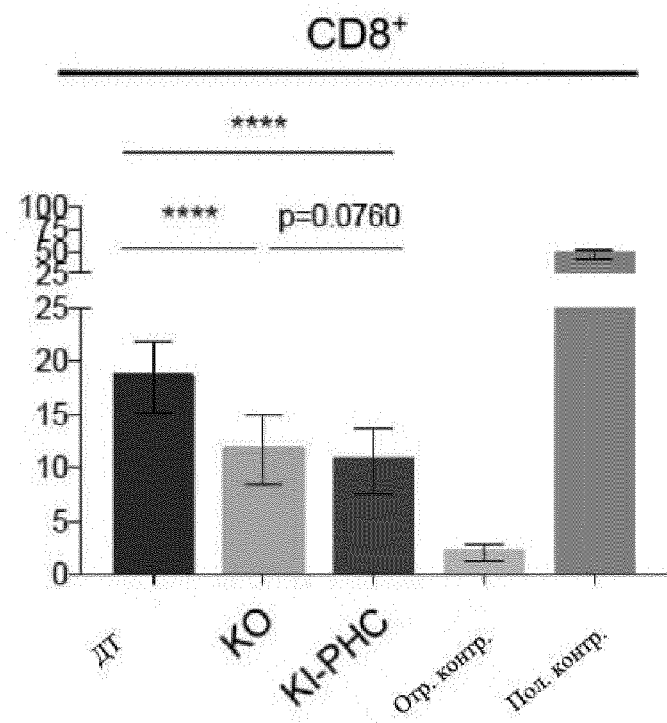


Кол-во sgRNA	Экзонные нецелевые сайты	Проанализированная клеточная линия	Редактирование
HLA-B против хода транскрипции_1	HLA-F-AS1	KO	Нет
	ITGA6	KO	Нет
HLA-B против хода транскрипции_2	HEATR1	KO	Нет
	HLA-F-AS1	KO	Нет
	PTDSS2	KO	Нет
HLA-C по ходу транскрипции_1	CTBS	KO	Нет
	ACSBG1	KO	Нет
	AC078852.1	KO	Нет
HLA-C по ходу транскрипции_2	HIPK4	KO	Нет
	ACSBG1	KO	Нет
	HIC2	KO	Нет
HLA-A против хода транскрипции	HLA-H	KO	Да
	HLA-K	KO	Нет
	HLA-G	KO	Нет
HLA-A по ходу транскрипции	PYCRL	KO	Нет
	RAB11FIP4	KO	Нет
СПТА	CHFR	KO	Нет
	PNCK	KO	Нет
gRNA_AAVS1-T2	AMN	KI-PHC, KI-PC	Нет
	FUT1	KI-PHC, KI-PC	Нет
	NPPA	KI-PHC, KI-PC	Нет

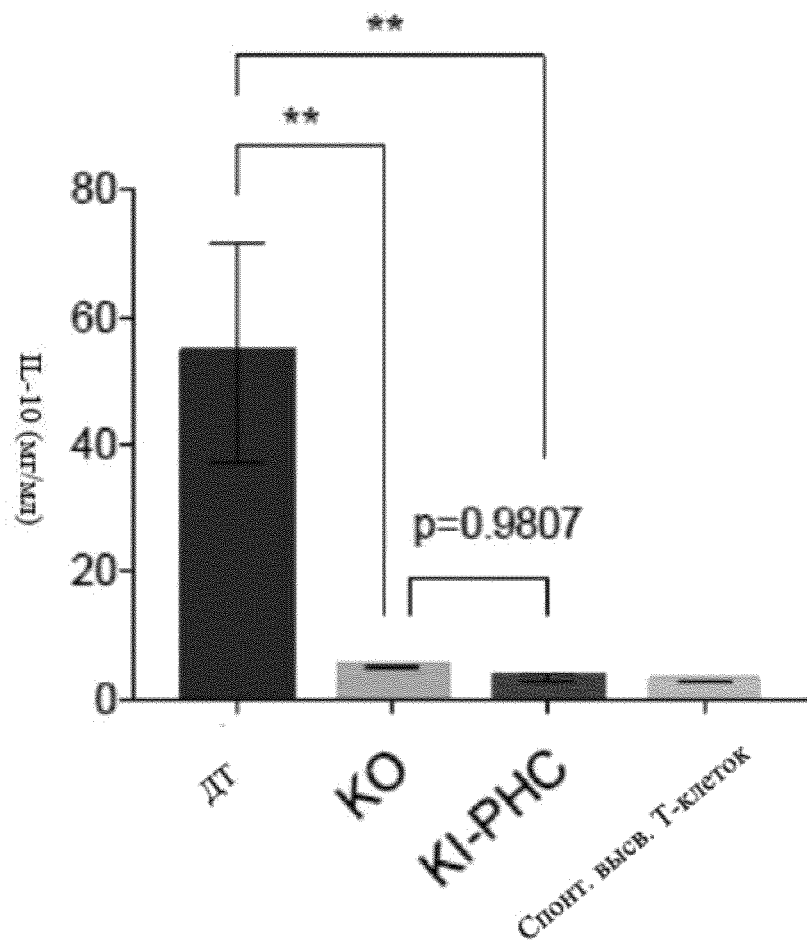
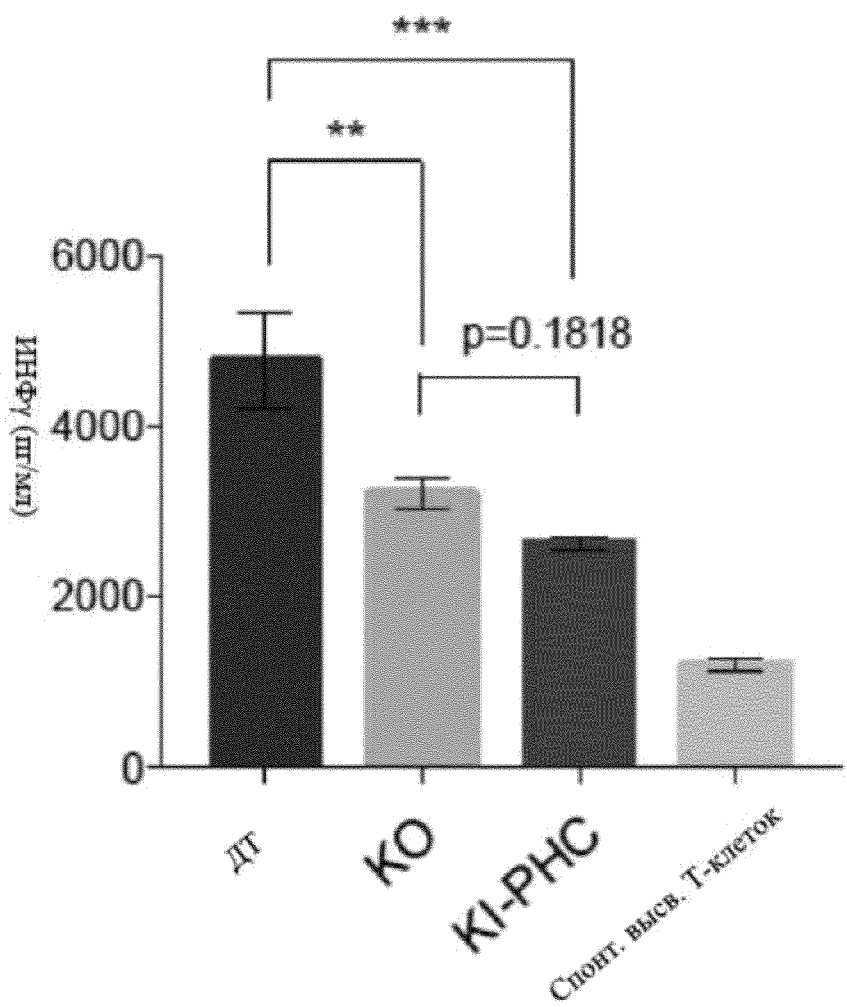
ФИГ. 2D



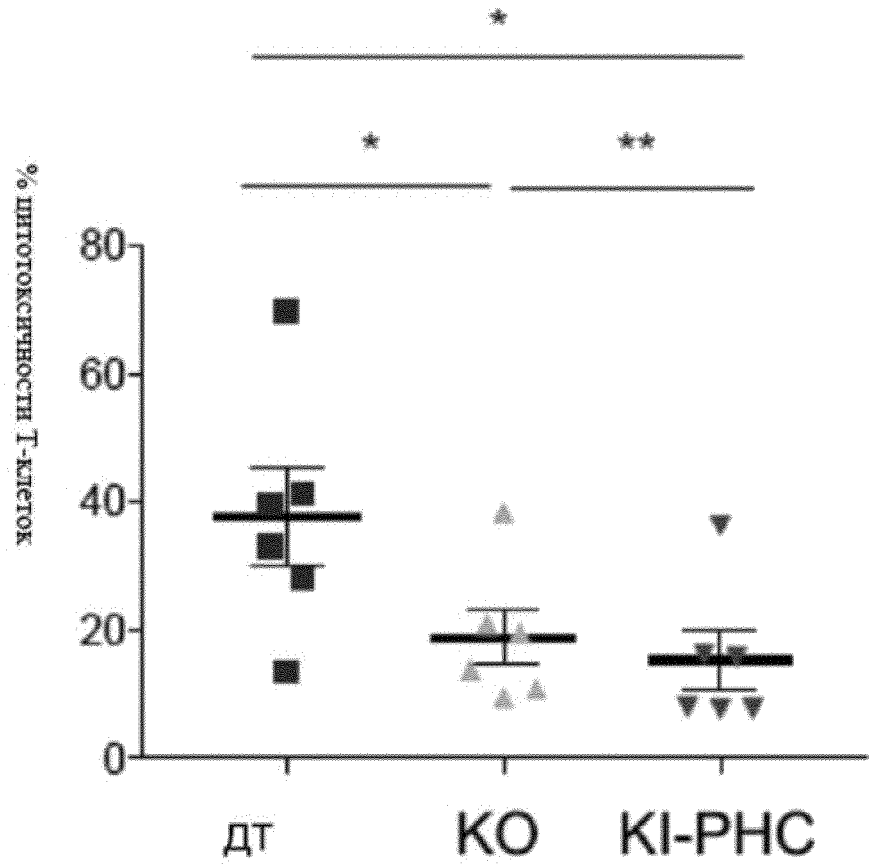
ФИГ. 2Е



ФИГ. 3В продолж.

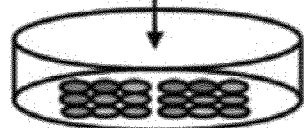
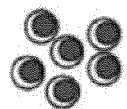


ФИГ. 3С



ФИГ. 3D

Аллогенные CD8⁺-клетки



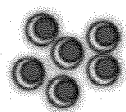
Прикрепленные клетки эмбрионного
тела ДТ



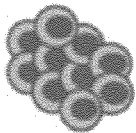
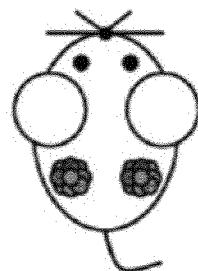
Предсенситизация



Примированные CD8⁺-клетки



Образование тератомы

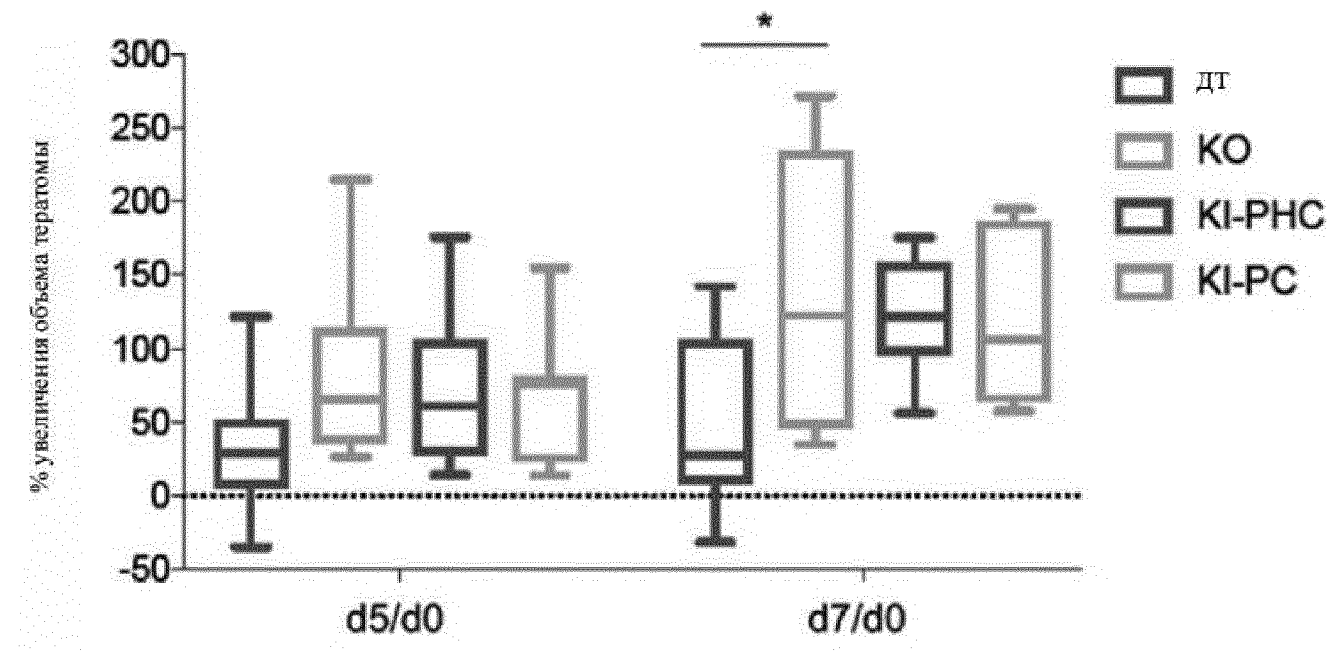


ESC

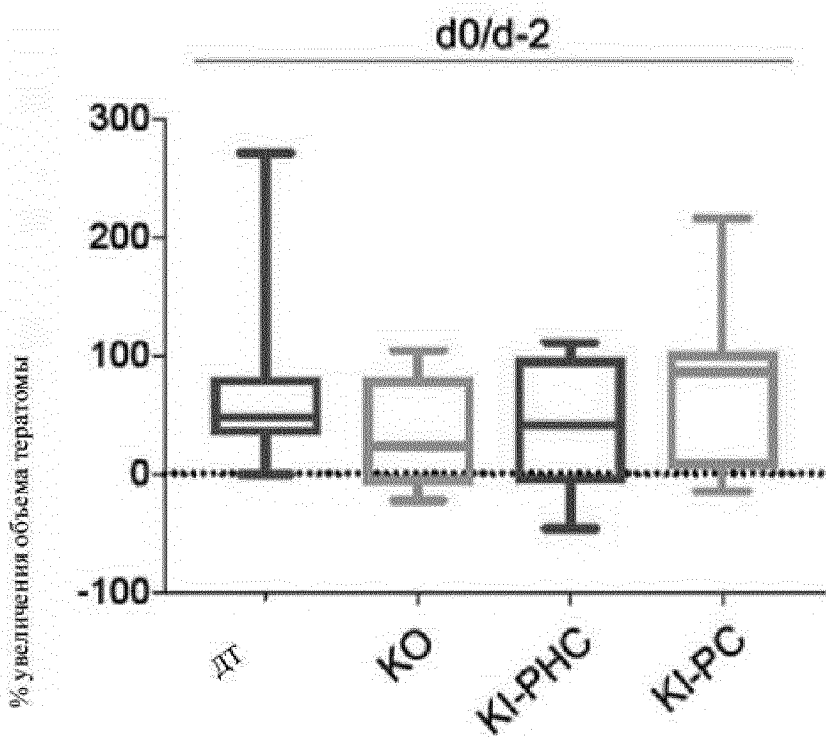


Скорость роста тератомы
Инфильтрация Т-клеток

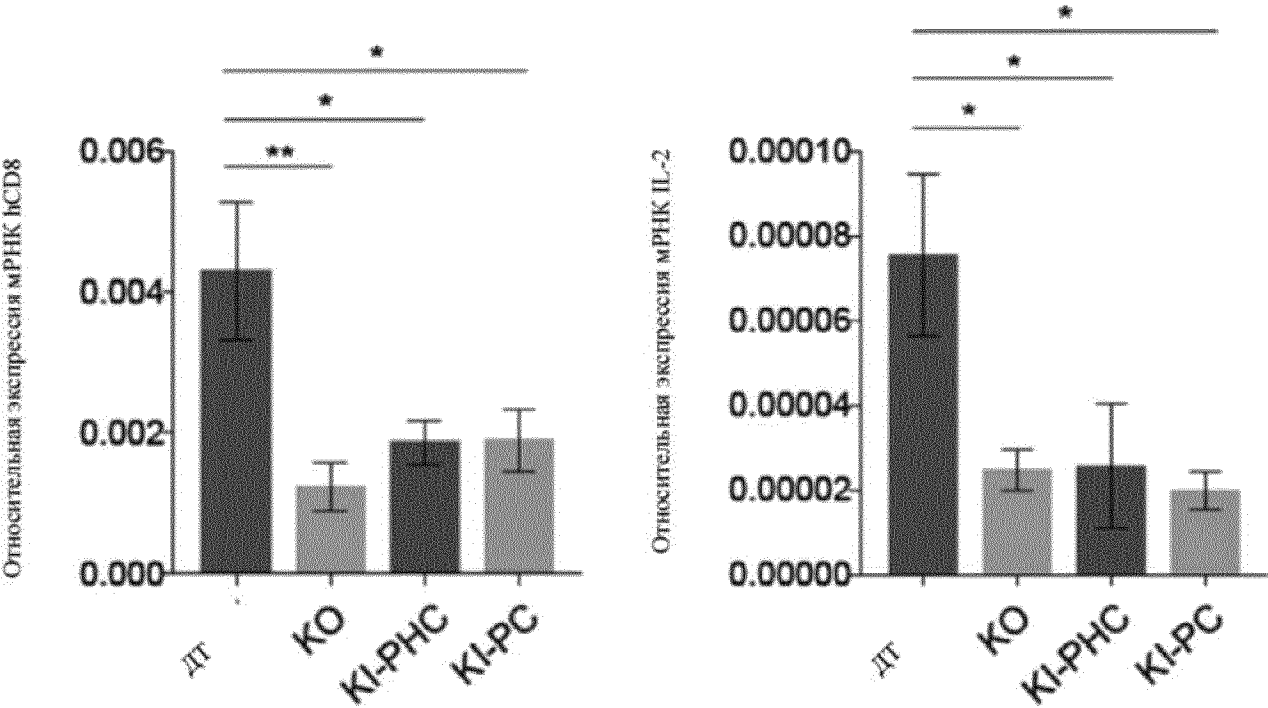
ФИГ. 4А



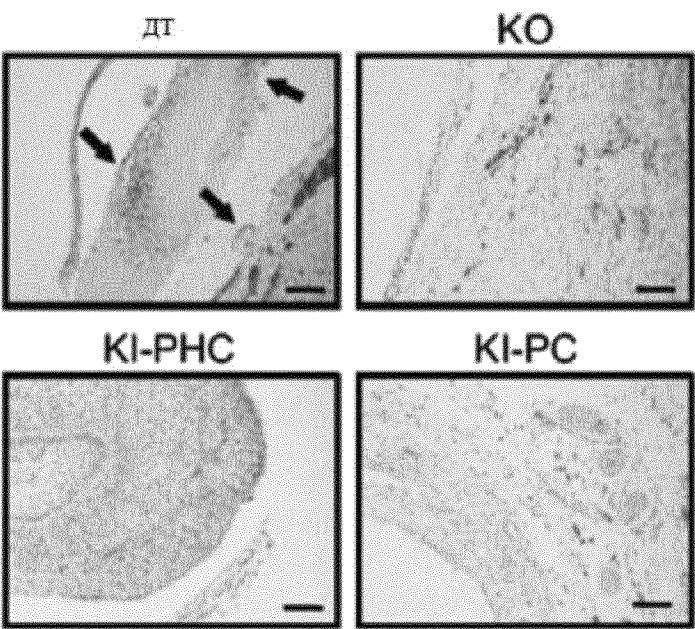
ФИГ. 4В



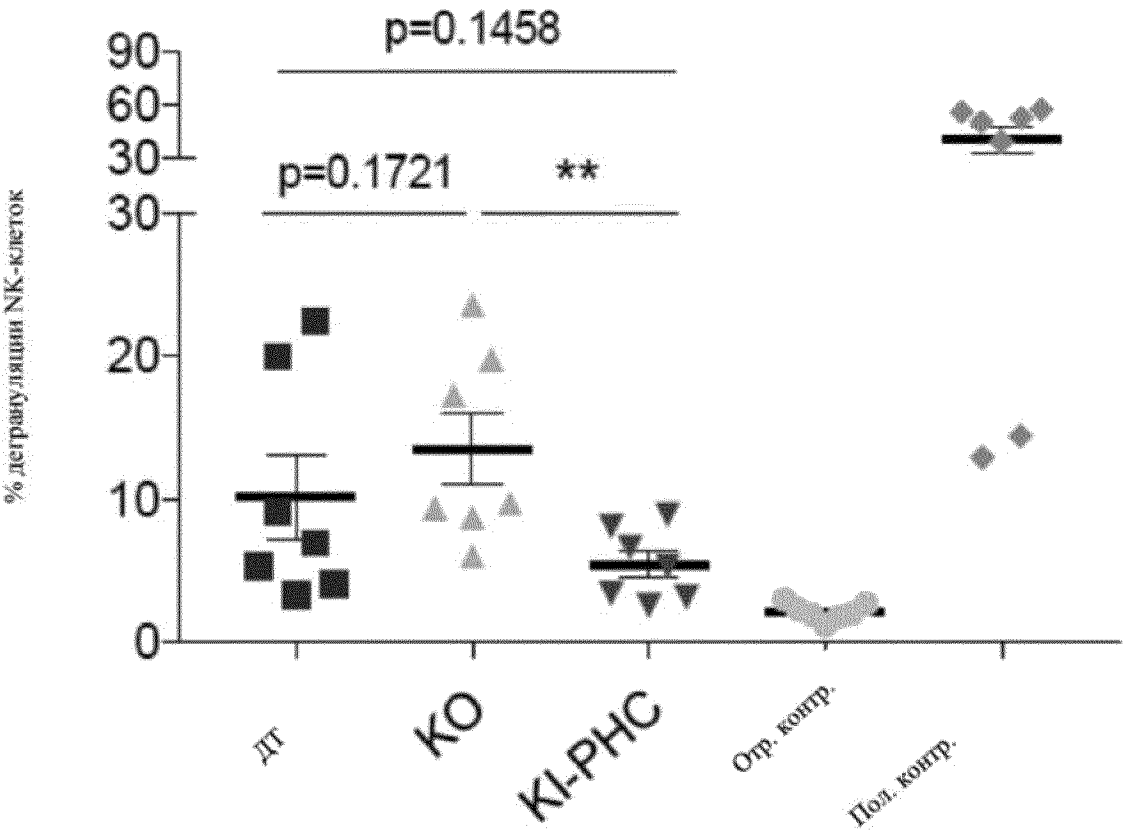
ФИГ. 4С



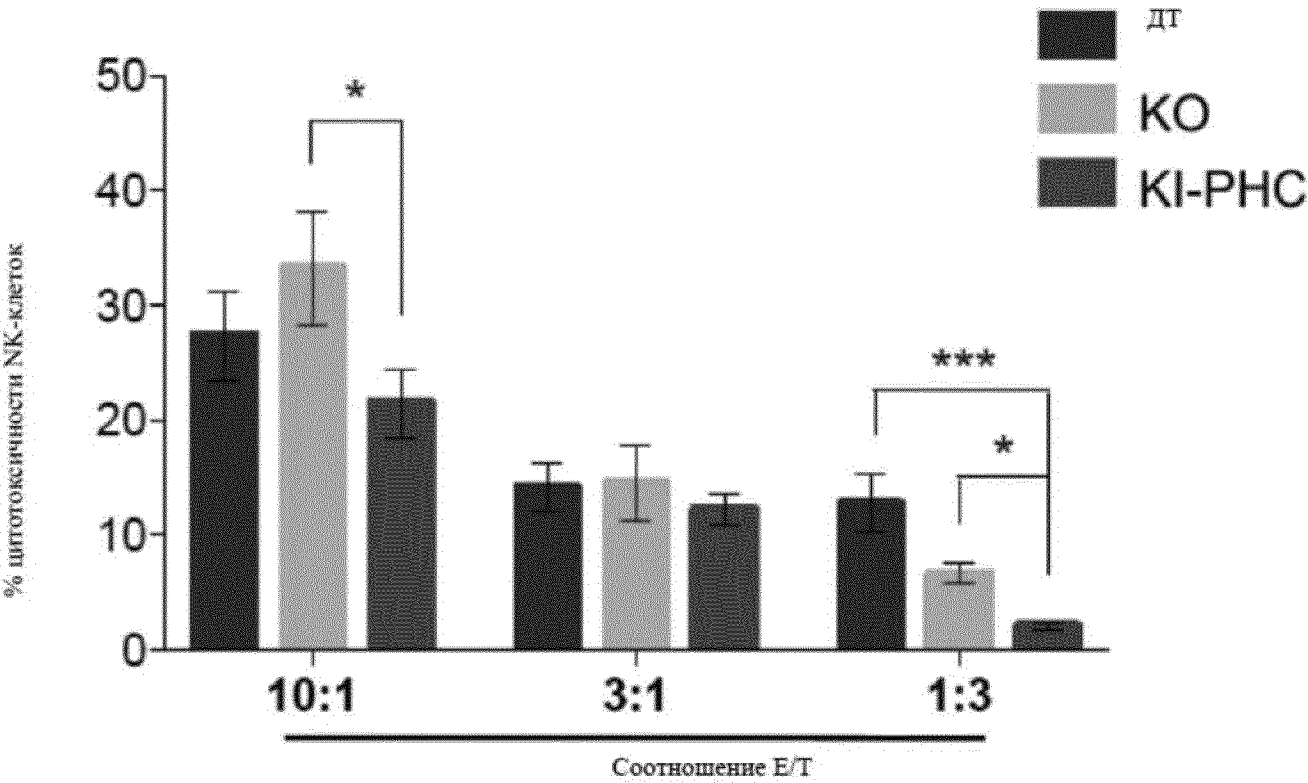
ФИГ. 4D



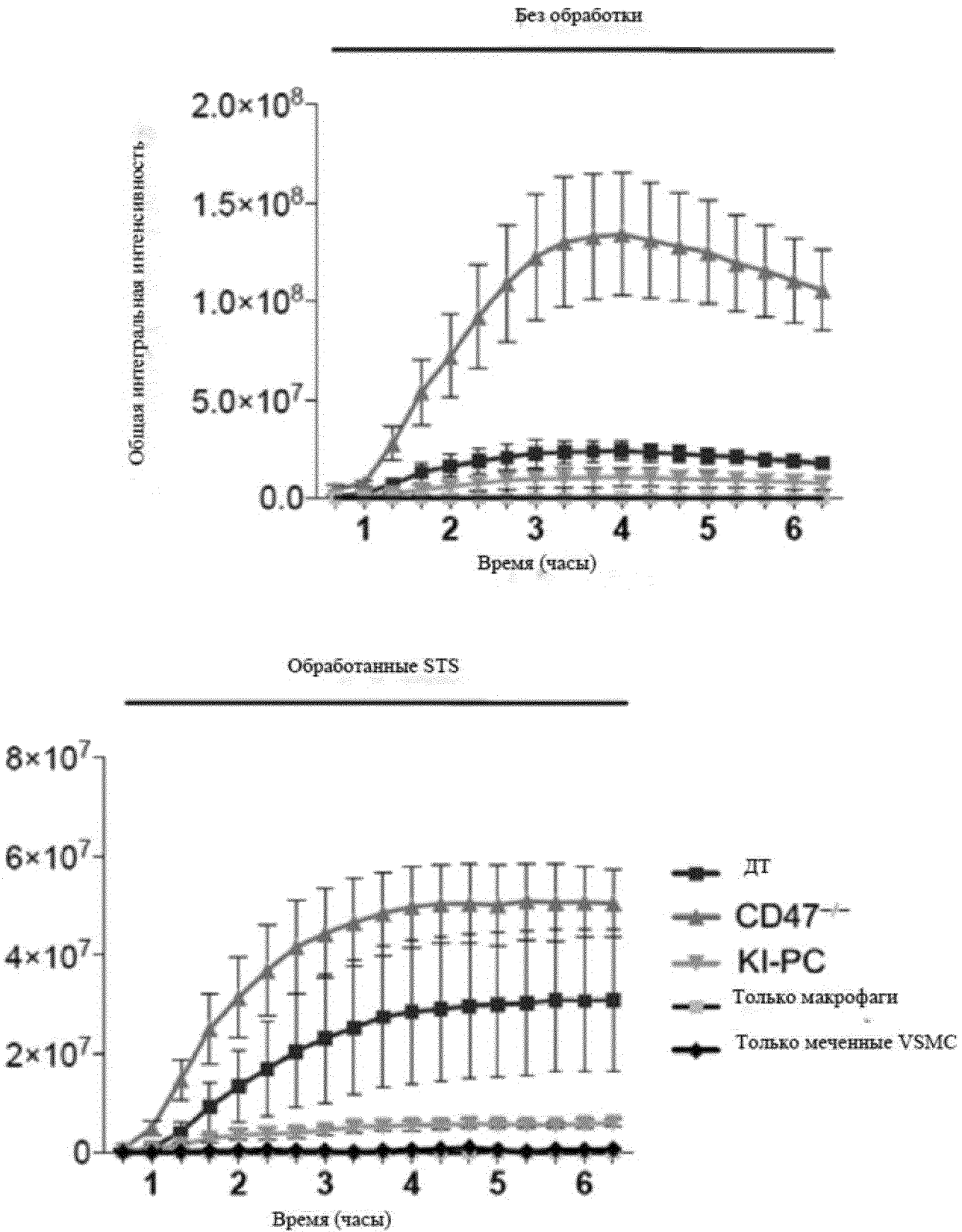
ФИГ. 4E



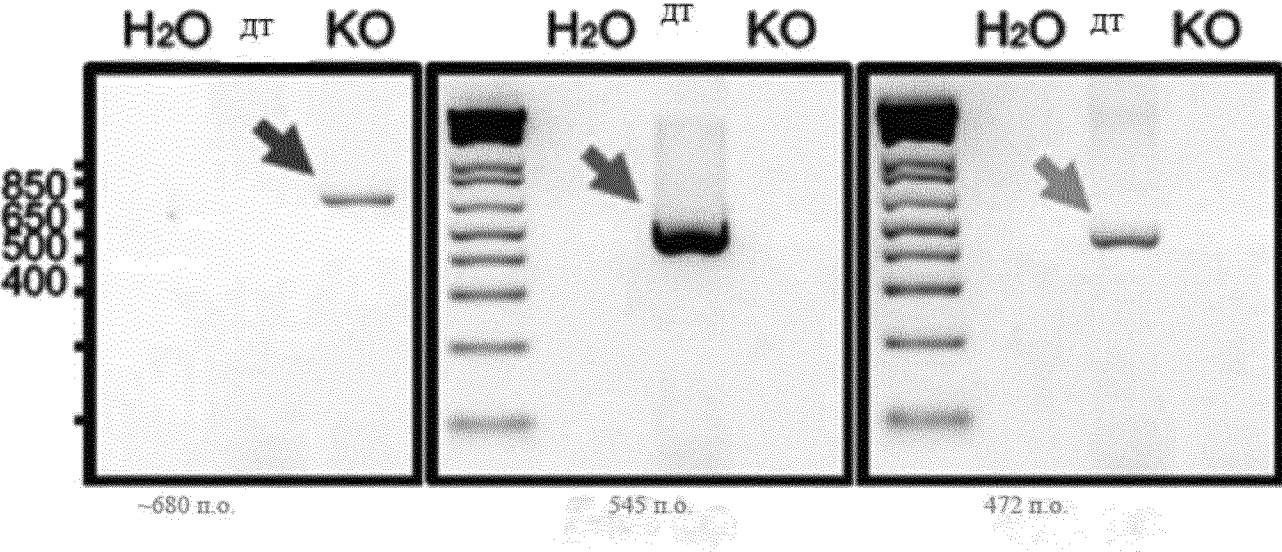
ФИГ. 5А



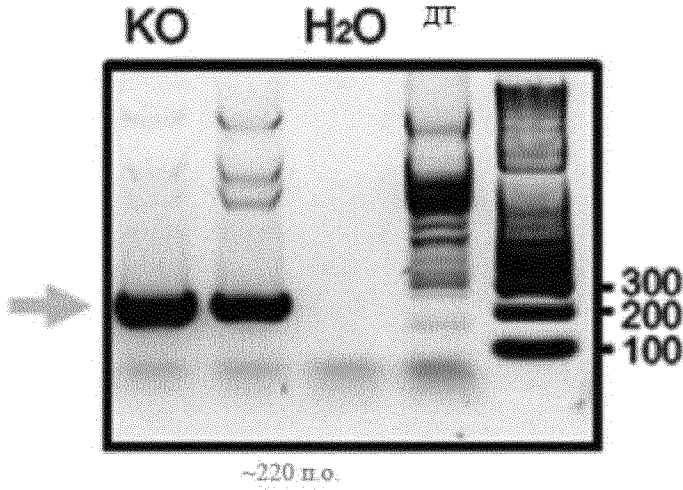
ФИГ. 5В



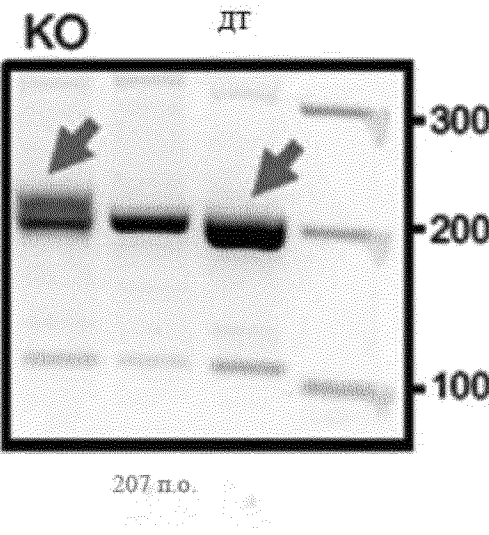
ФИГ. 5C



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В



ФИГ. 6С

CIITA

ДГ CCCCTGTGCCTCTACCACTTCTATGACCAGATGGACCTGGCTGGAGAAG SEQ ID NO: 80

GGGGACACGGAGATGGTGAAGATACTGGTCTACCTGGACCGACCTCTTC SEQ ID NO: 81

PAM

sgRNA

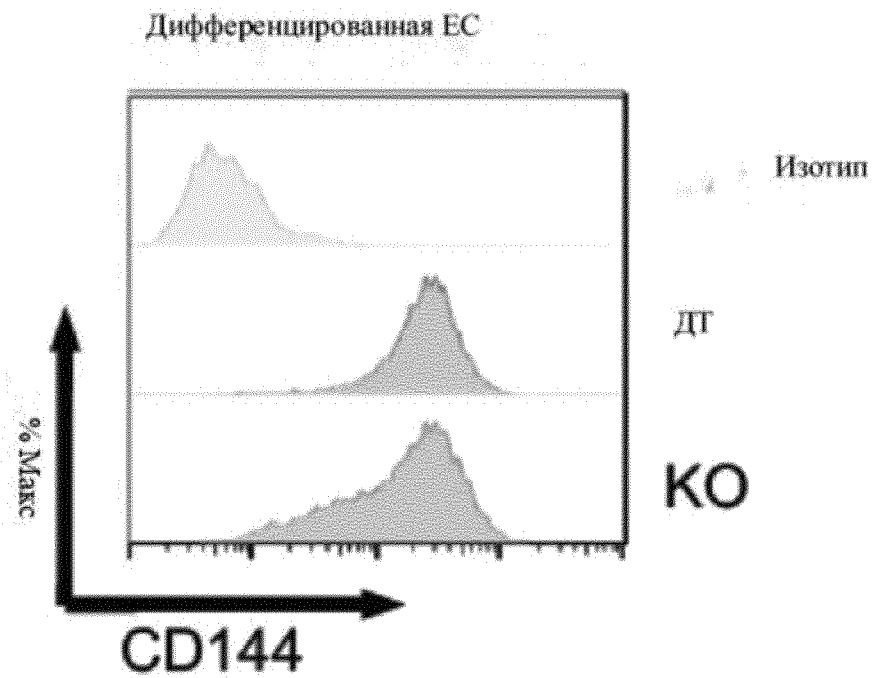
SEQ ID NO: 82

КО CCCCTGTGCCTCTACCACTTCCTATGACCAGATGGACCTGGCTGGAGAAG +1 н.о.

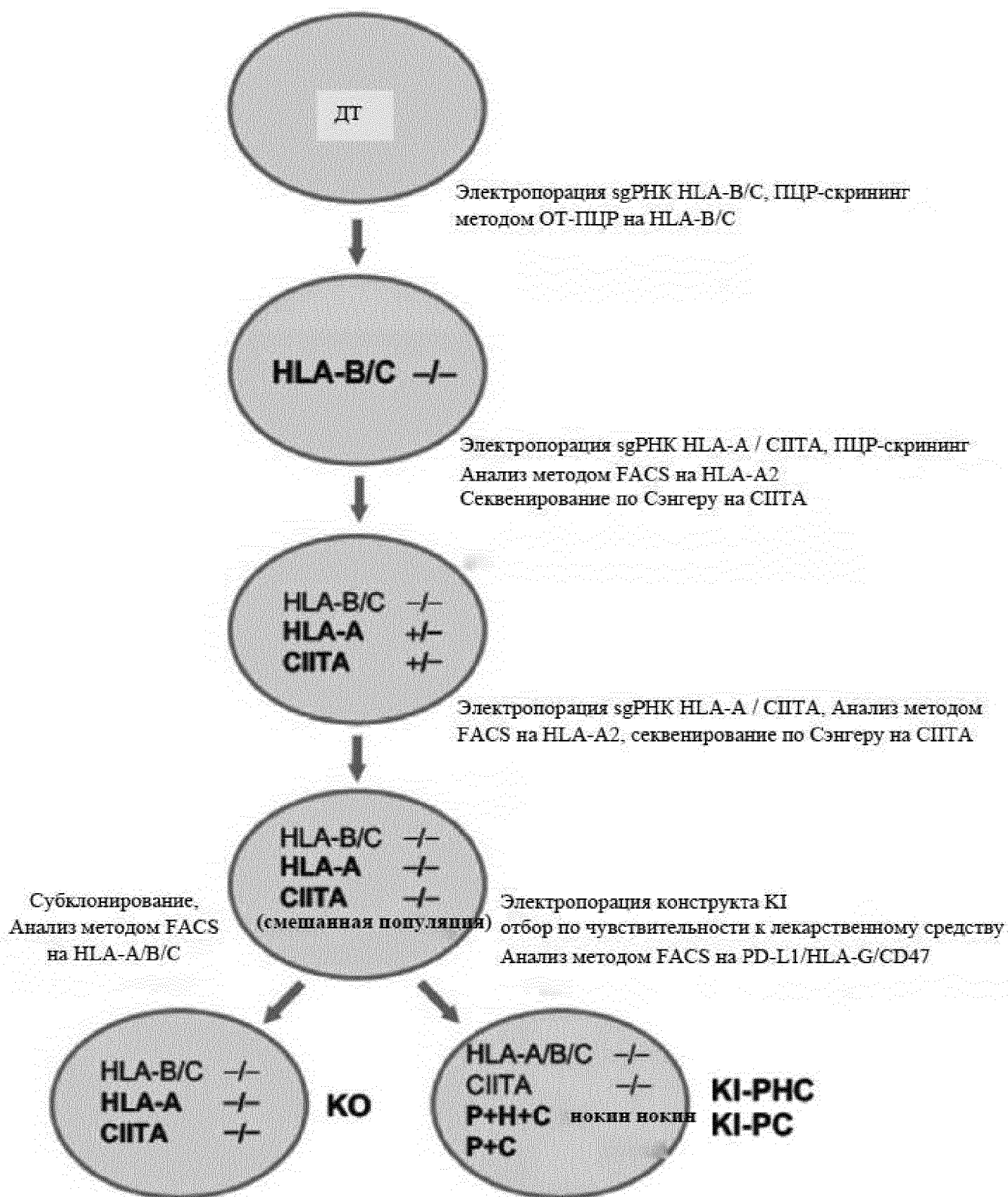
CCCCTGTGCCTCT-----ACCAGATGGACCTGGCTGGAGAAG -12 н.о.

SEQ ID NO: 83

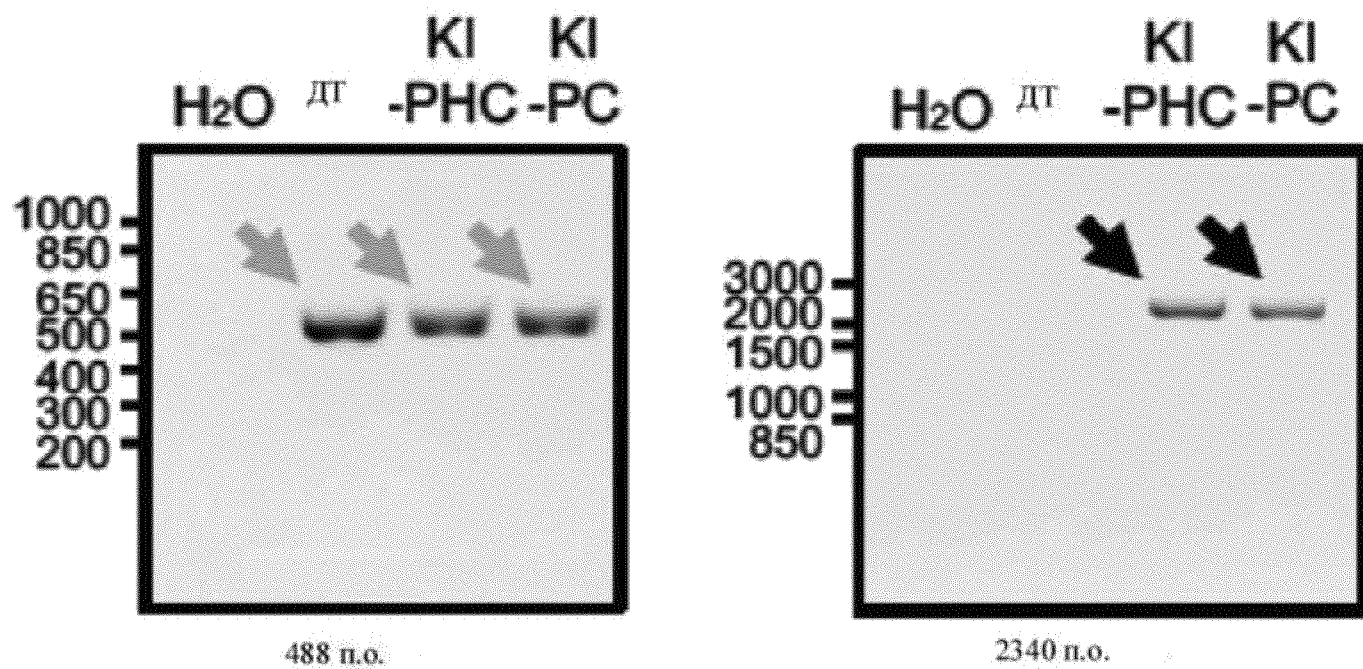
ФИГ. 6D



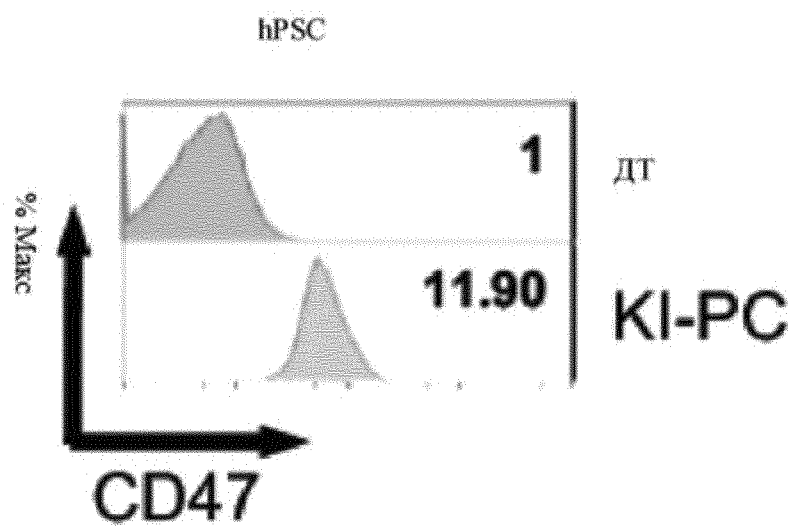
ФИГ. 6Е



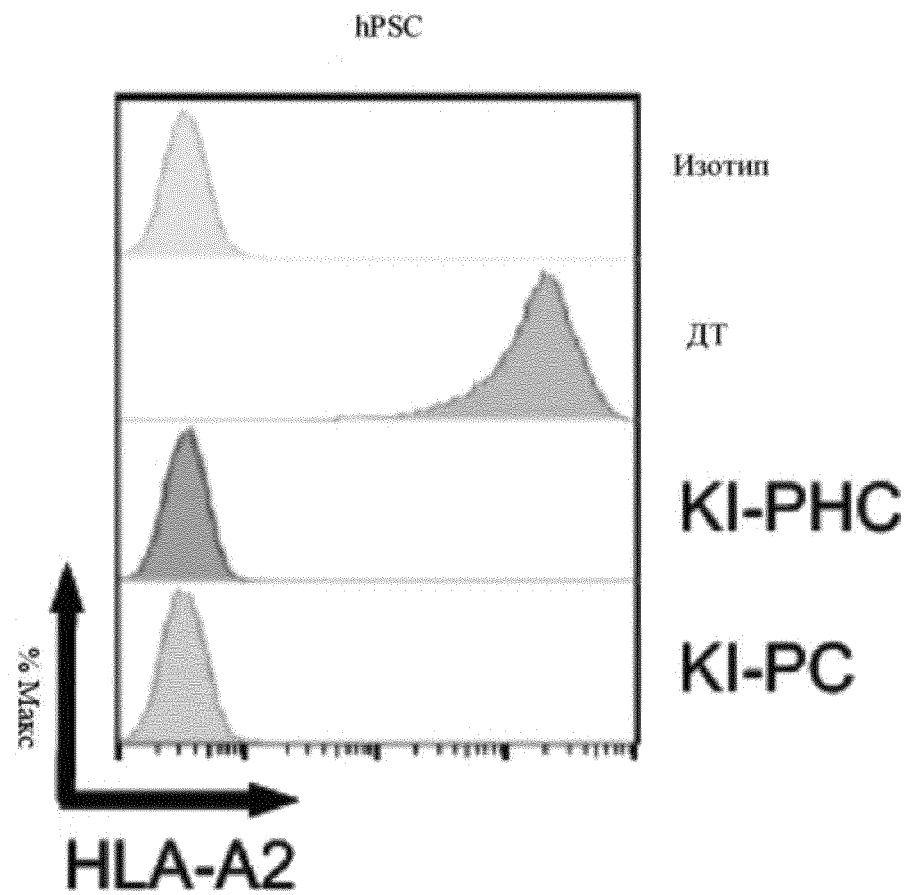
ФИГ. 6F



ФИГ. 6G

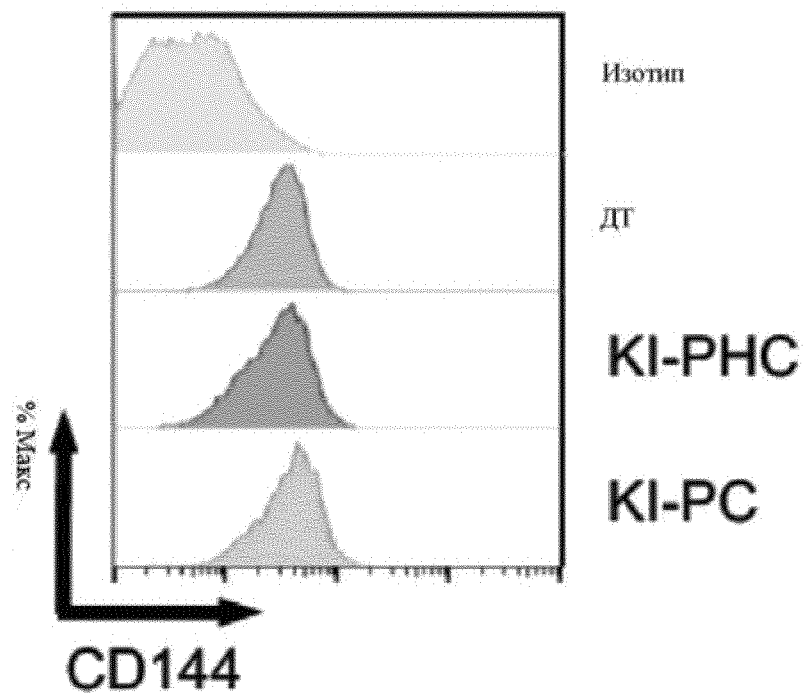


ФИГ. 7А



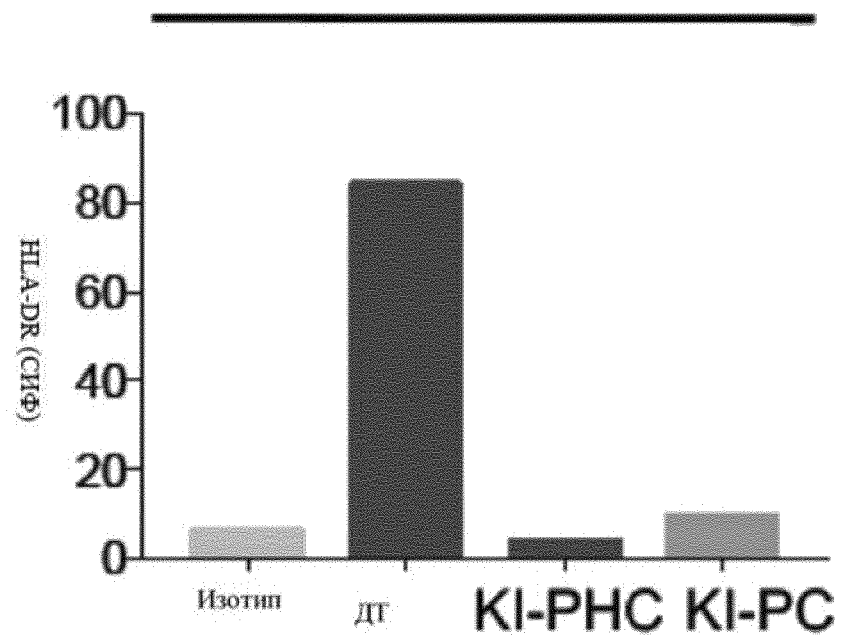
ФИГ. 7В

Дифференцированная ЕС



ФИГ. 7С

Дифференцированная ЕС



ФИГ. 7D

Дифференцированная VSMC

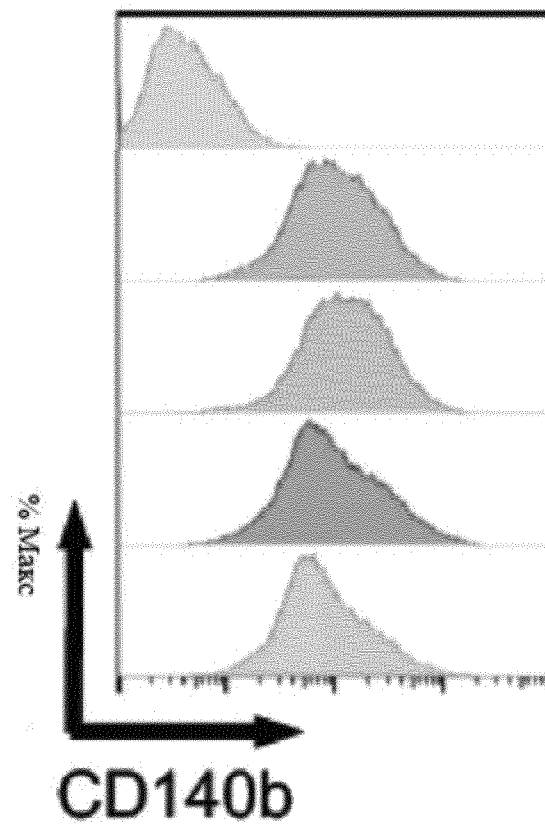
Изотип

ДТ

KO

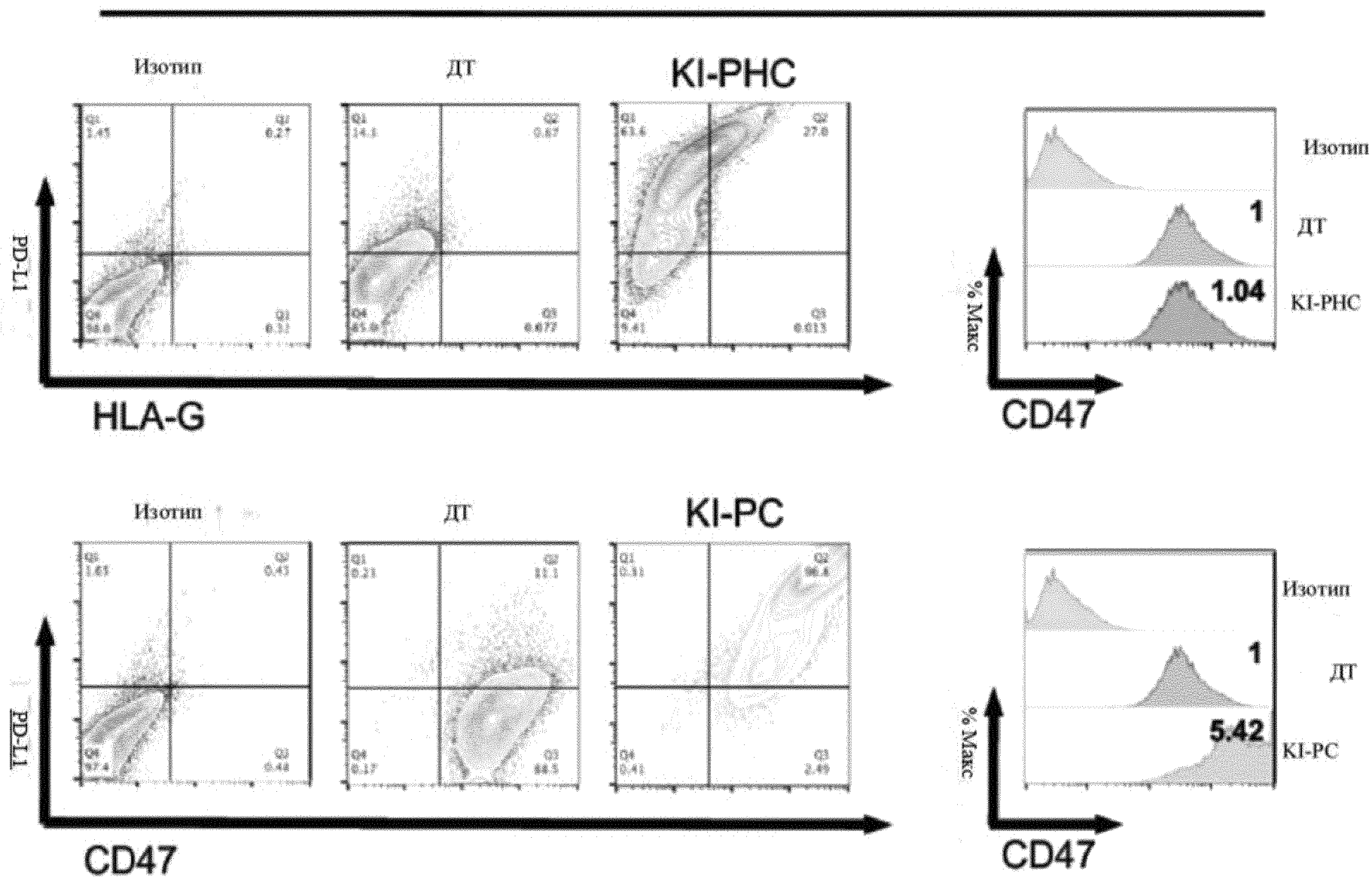
KI-PHC

KI-PC

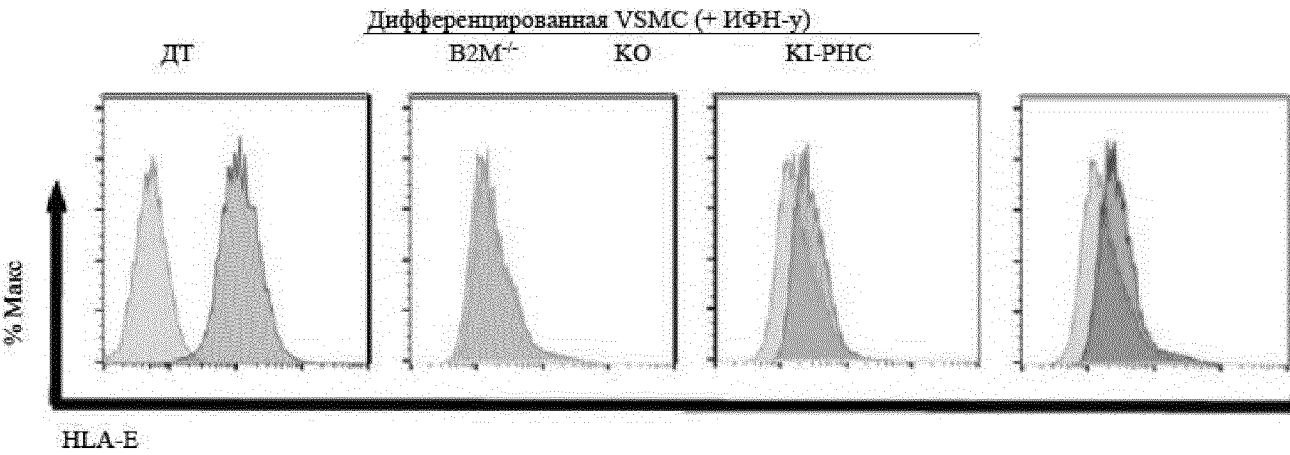


ФИГ. 7Е

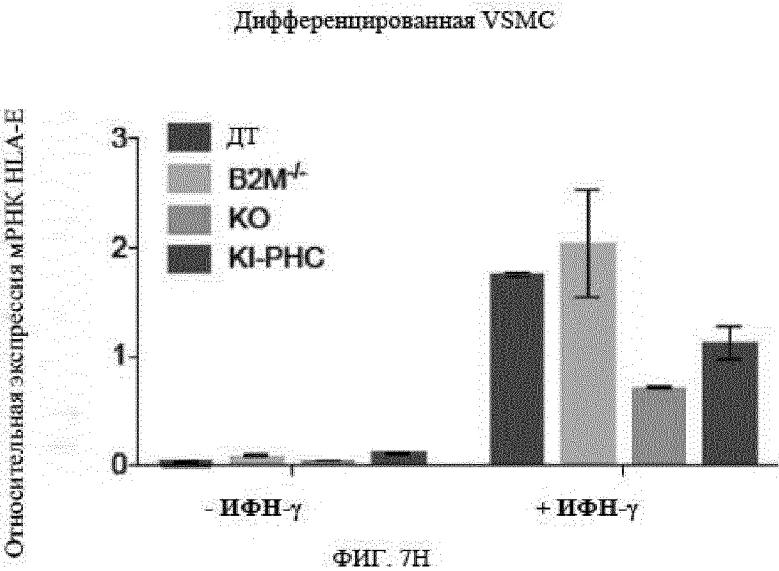
Дифференцированная VSMC



ФИГ. 7F

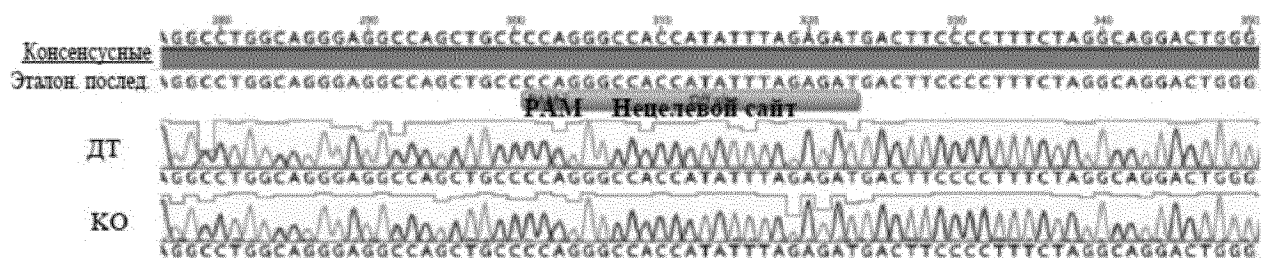


ФИГ. 7G



ФИГ. 7H

HLA-F-AS1



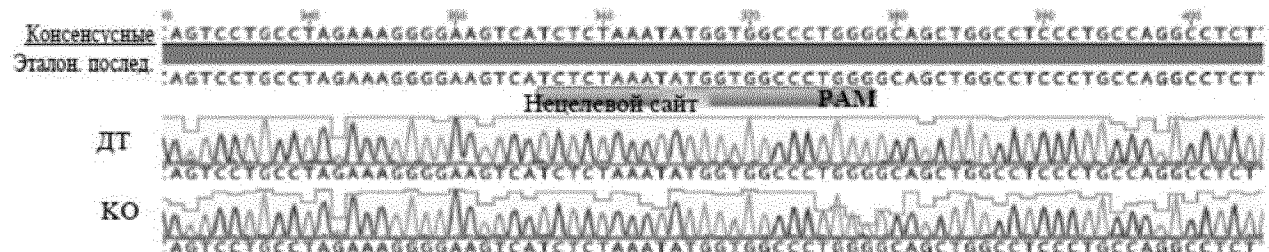
ITGA6



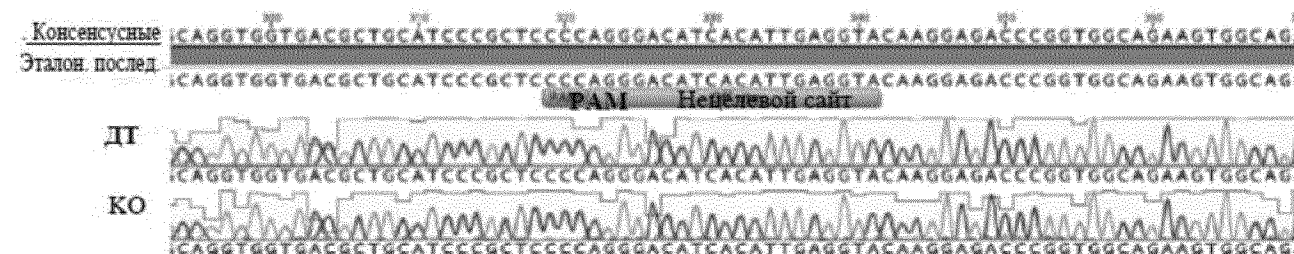
HEATR1



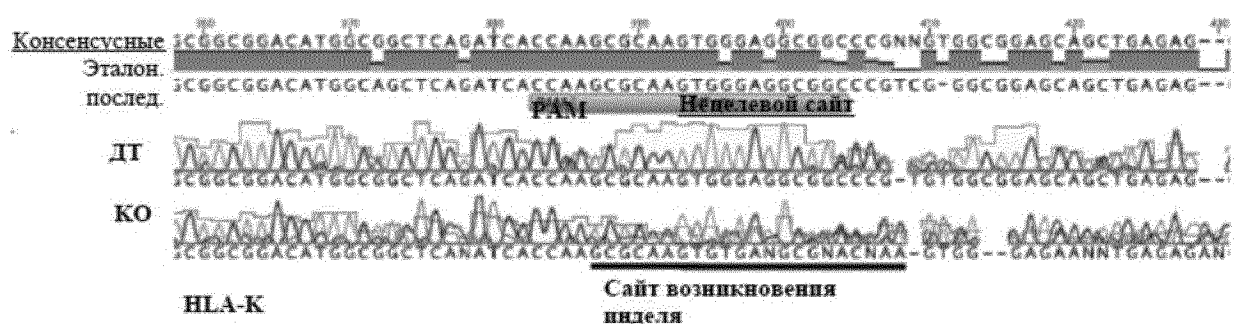
HLA-F-AS1



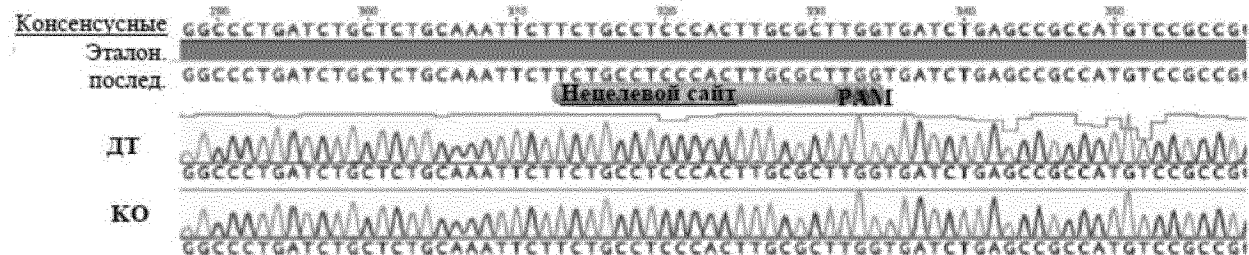
PTDSS2



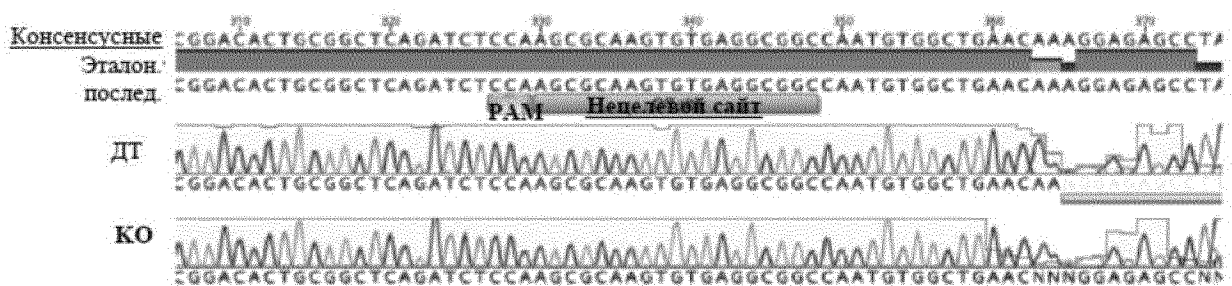
HLA-H



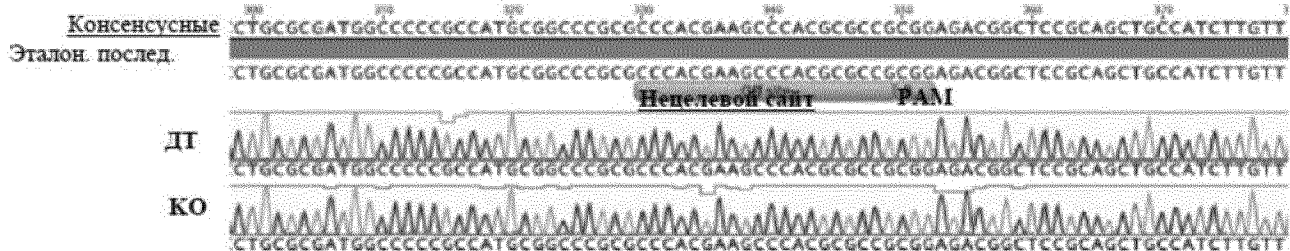
HLA-K



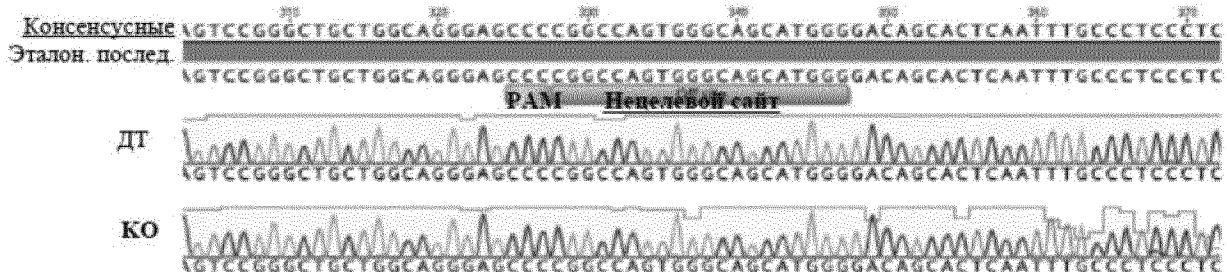
HLA-G



PYCRL

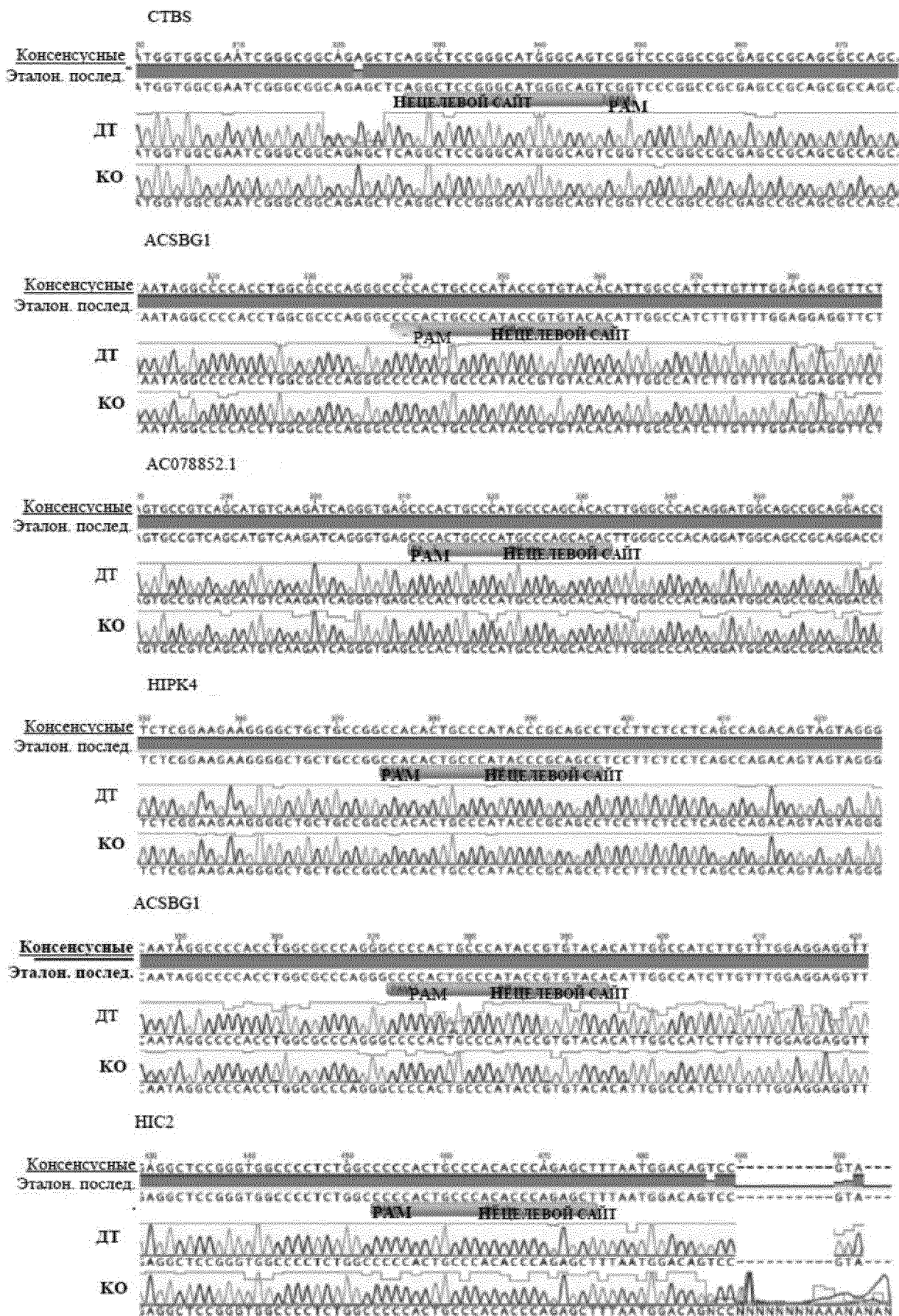


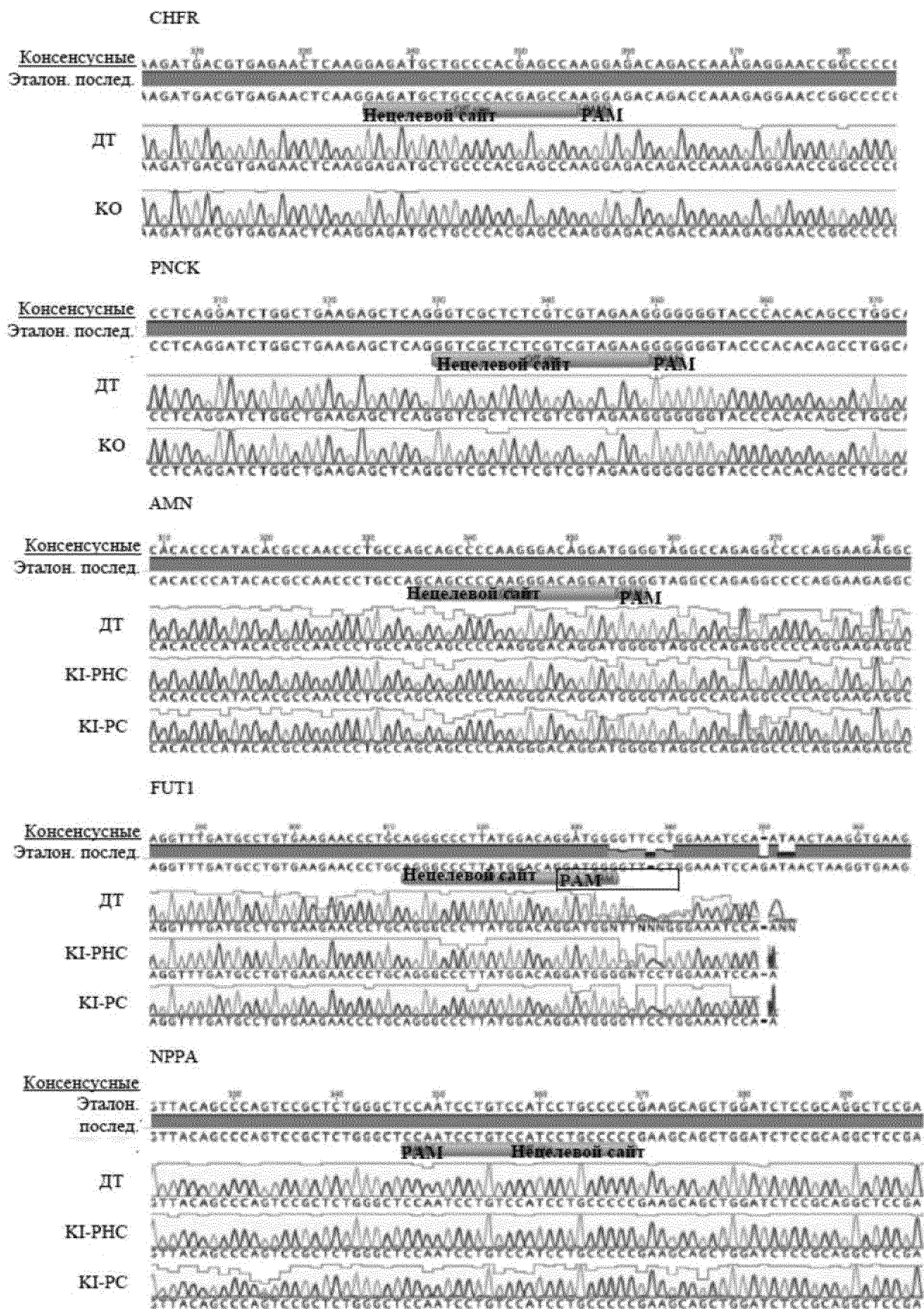
RAB11FIP4



SEQ ID NO: 105-124

ФИГ. 8 продолж.

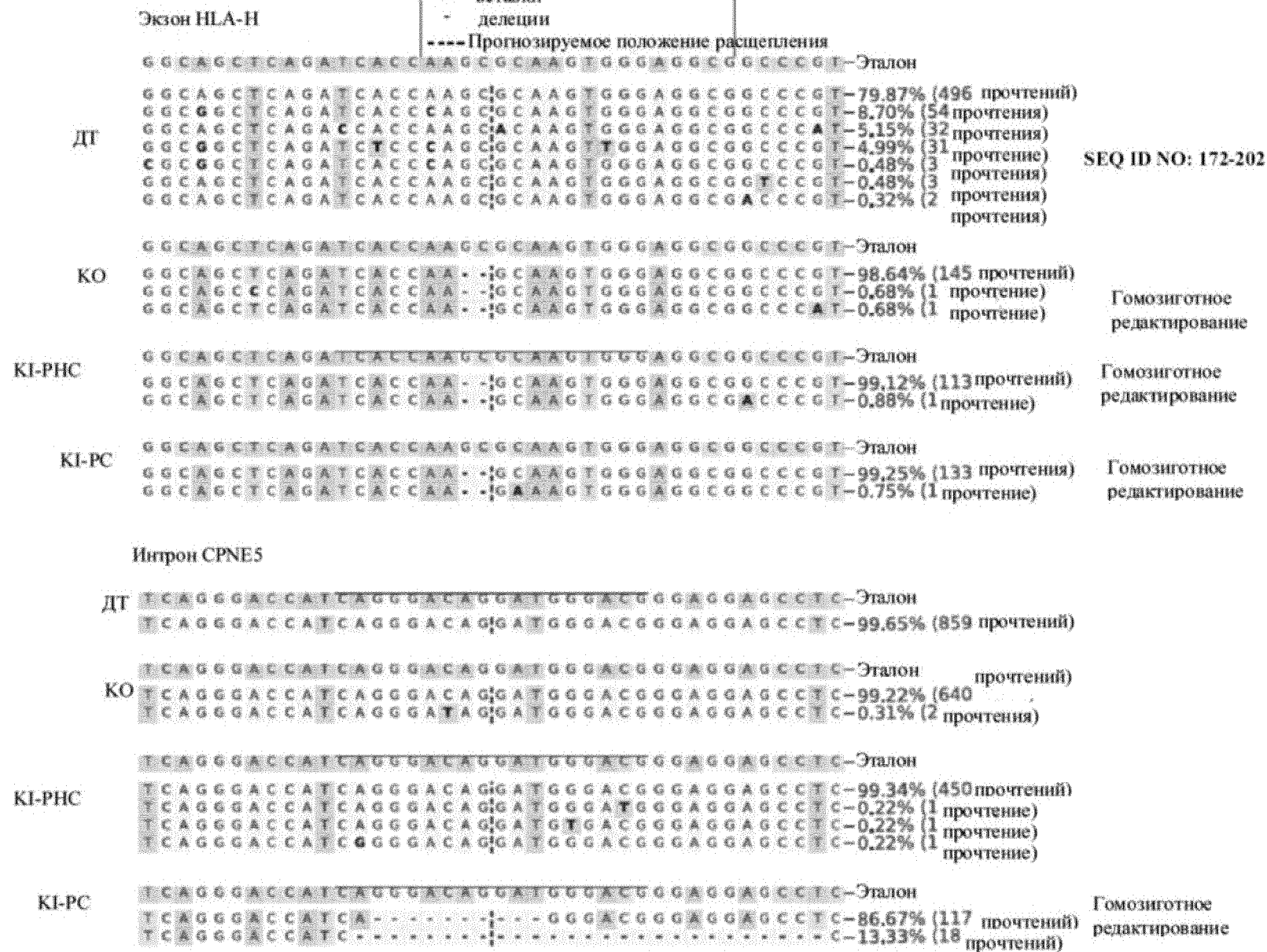




ФИГ. 8 продолж.

SEQ ID NO: 149-171

Нецелевые сайты



ФИГ. 9

SEQ ID NO: 203-216

Интрон TRAF3

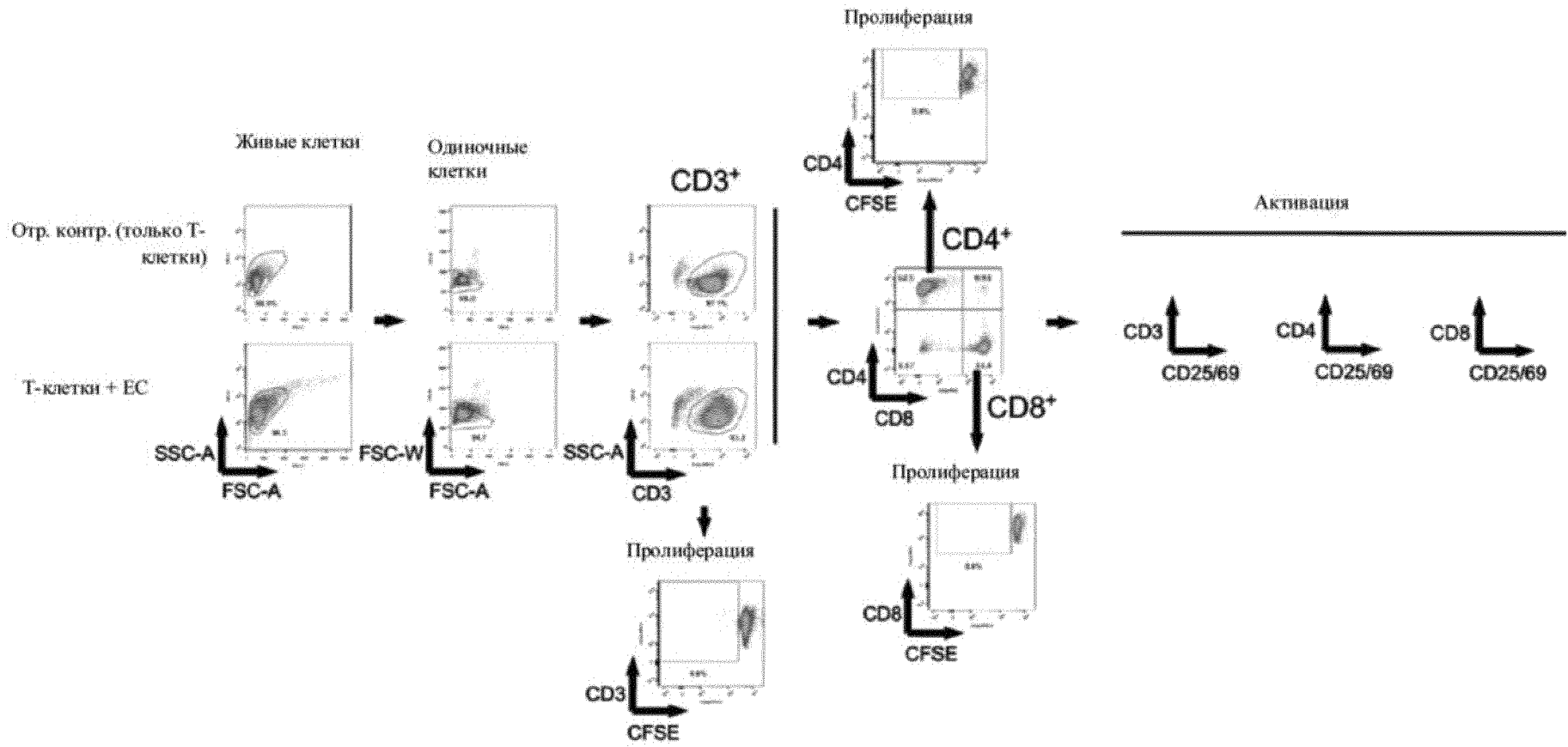
ДТ	G C G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—Эталон	
	G C G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—100,00% (179 прочтений)	
КО	G C G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—Эталон	
	G C G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—89,41% (76 прочтений)	
	G C G G G G G T C C G G G T A T G G —9,41% (8 прочтений)	
	G C G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C A C G A A T C C C C C T C—1,18% (1 прочтение)	
KI-PHC	G C G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—Эталон	
	G C G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—83,33% (30 прочтений)	
	G C G G G G G T C C G G G T A T G G —16,67% (6 прочтений)	
KI-PC	G C G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—Эталон	
	G C G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—96,34% (79 прочтений)	
	C G G G G G G T C C G G G T A T G G G C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—1,22% (1 прочтение)	
	G C G G G G G T C C G G G T A T G G —1,22% (1 прочтение)	
	G C G G G G G T C C G G G T A T G G A C A G A G G G C G C G A A T C C C C C T C—1,22% (1 прочтение)	

Гетерозиготное редактирование

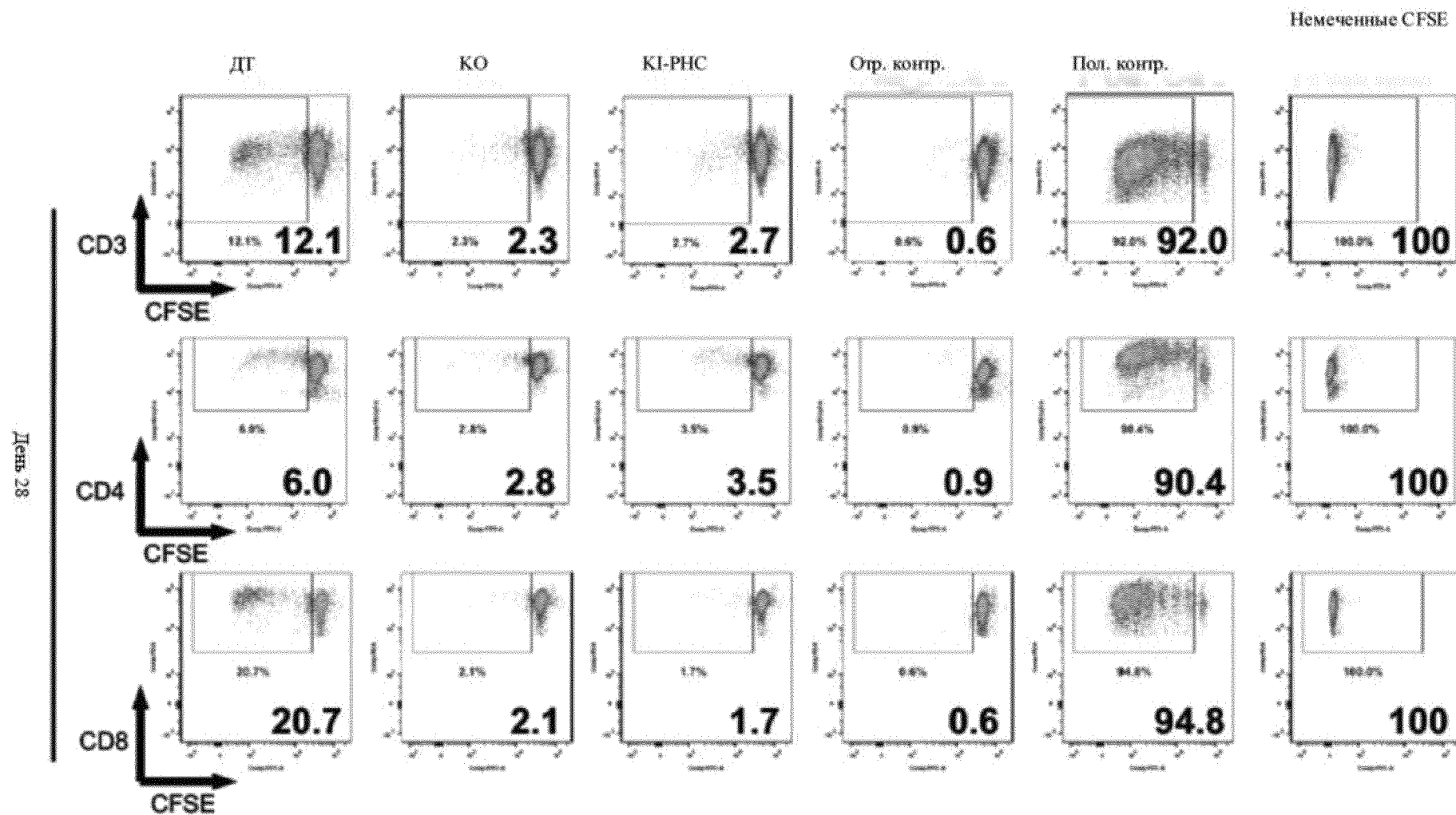
Гетерозиготное редактирование

Гетерозиготное редактирование

ФИГ. 9 продолж.

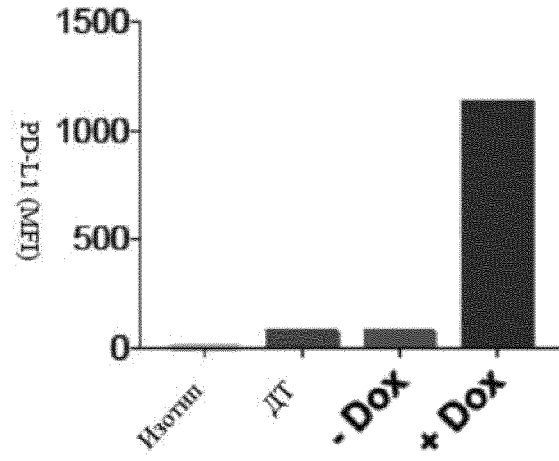


ФИГ. 10А

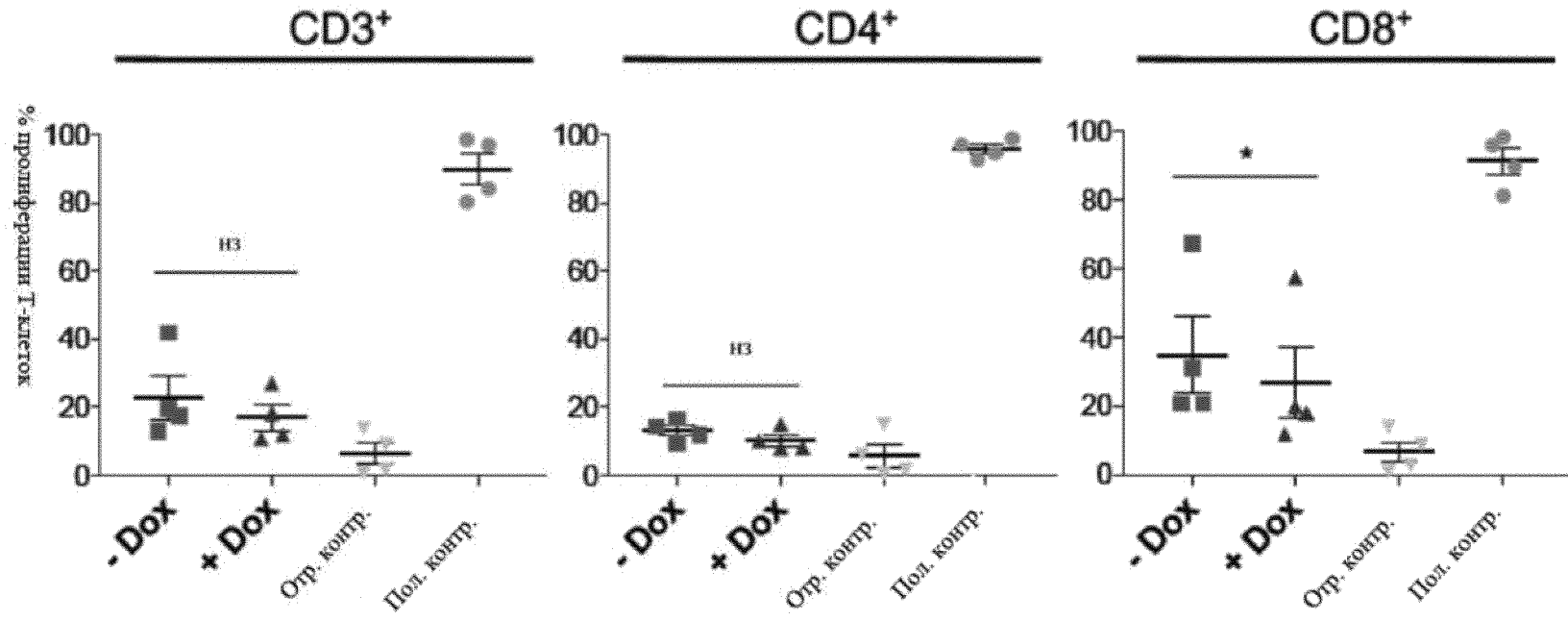


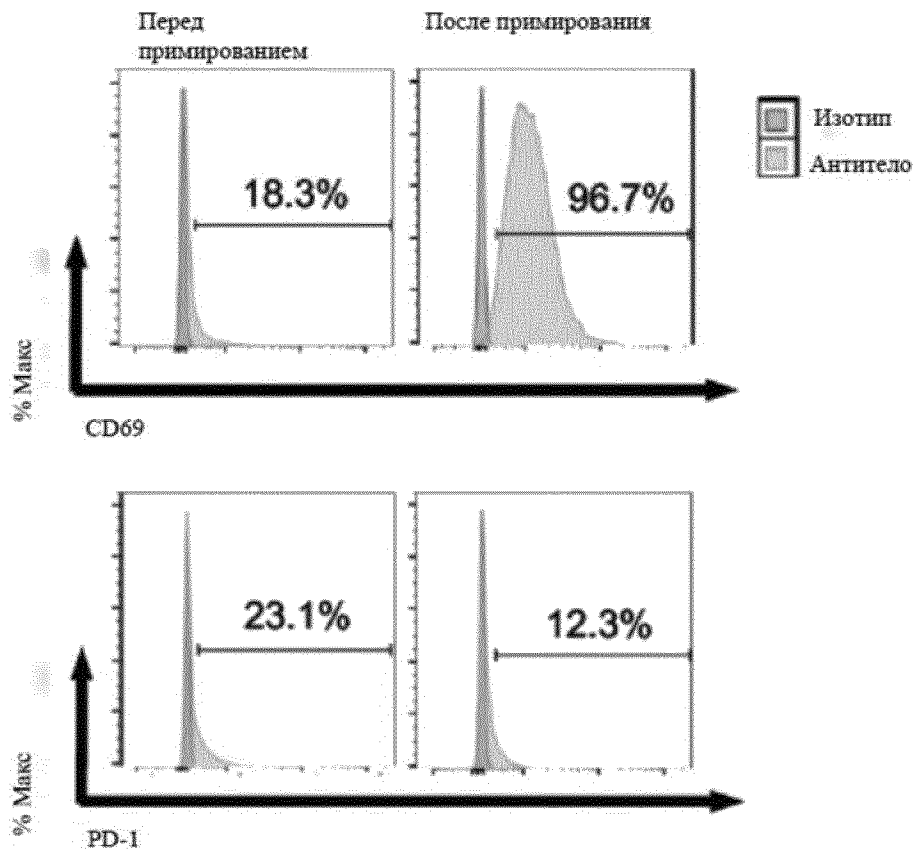
ФИГ. 10B

ФИГ. 10С

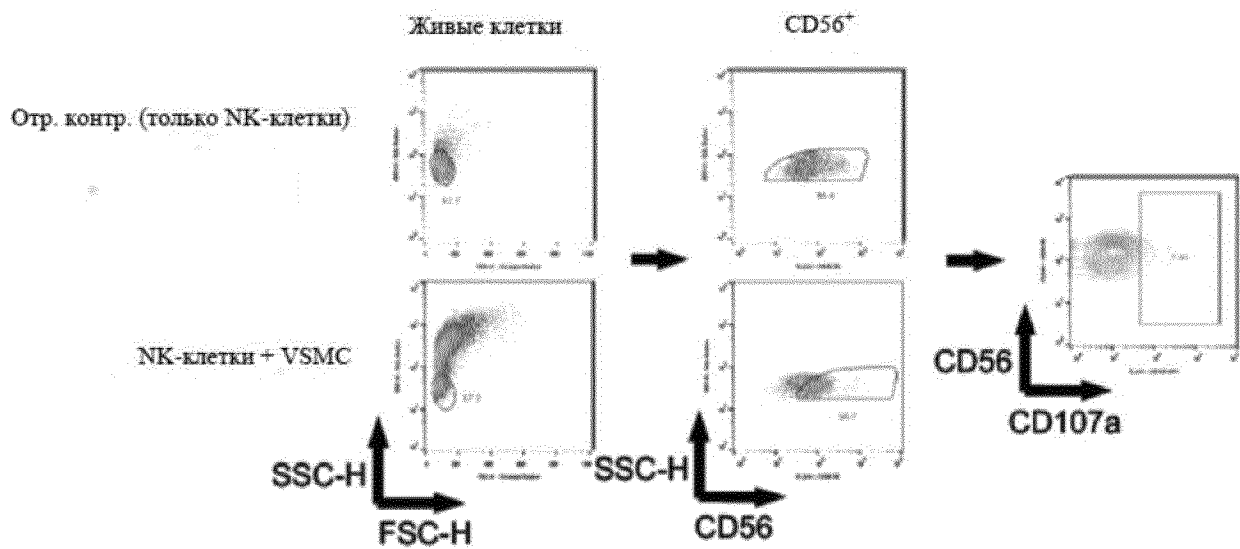


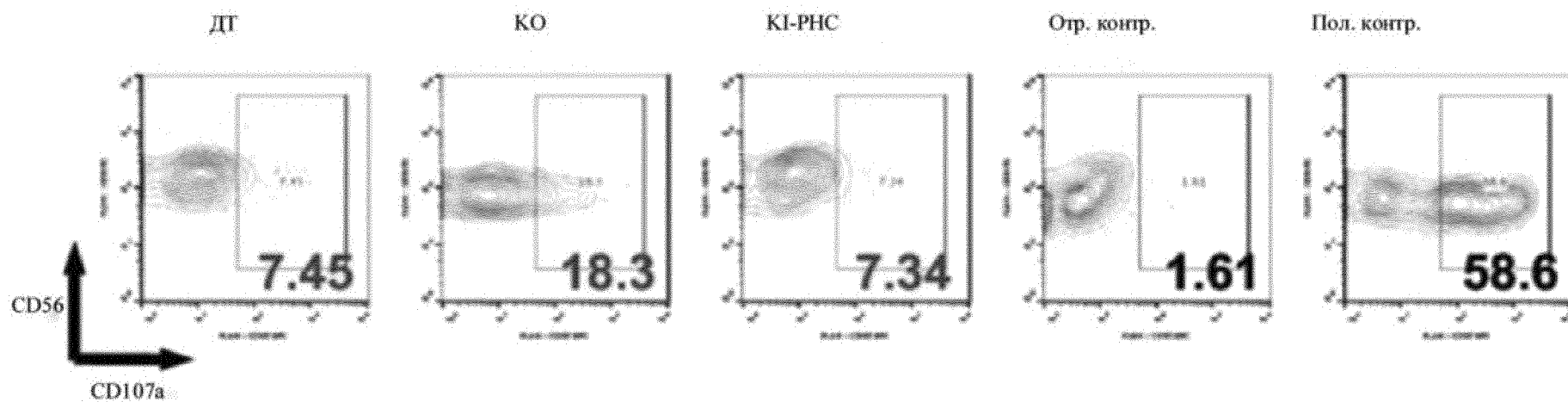
ФИГ. 10D



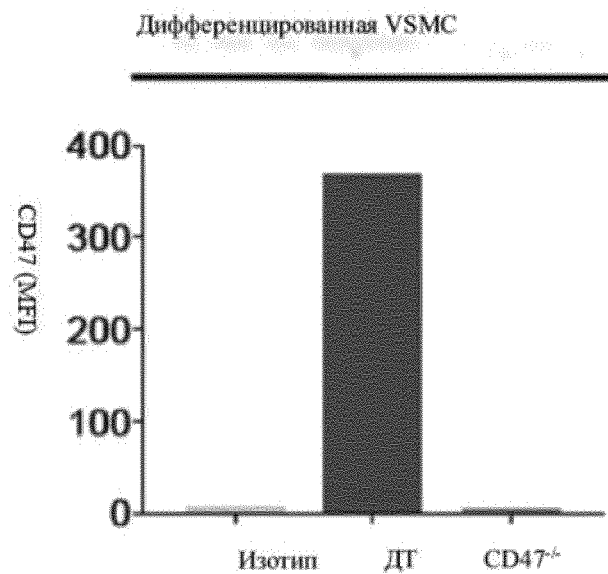


ФИГ. 11A

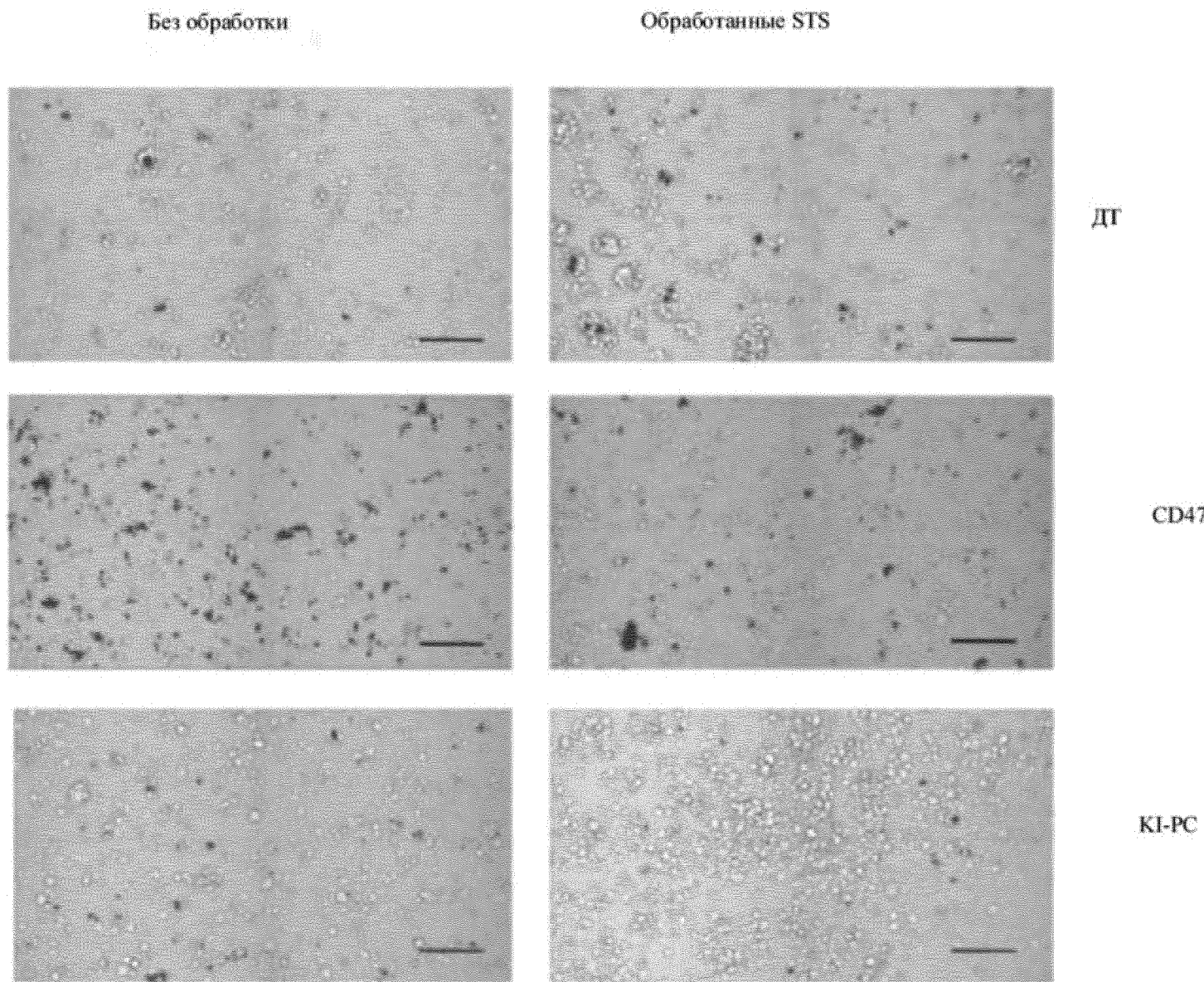




ФИГ. 11С

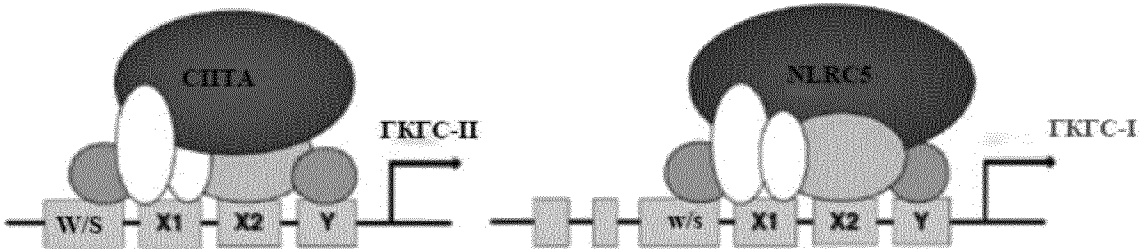


ФИГ. 11D



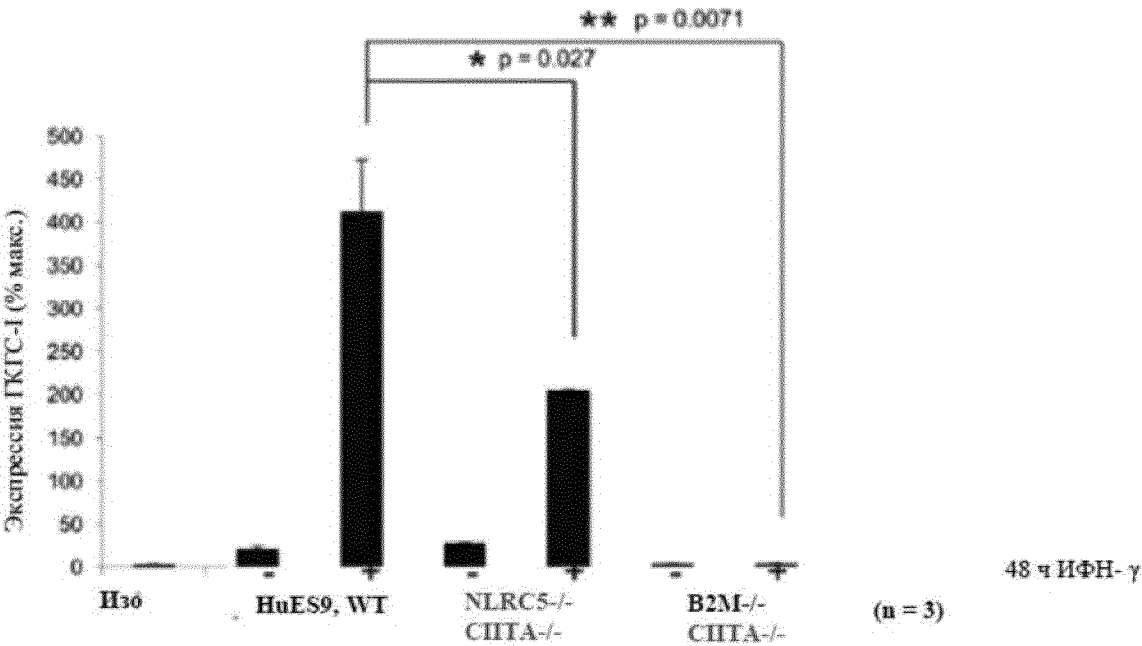
ФИГ. 11Е

Нацеливания на регуляторы транскрипции экспрессии HLA



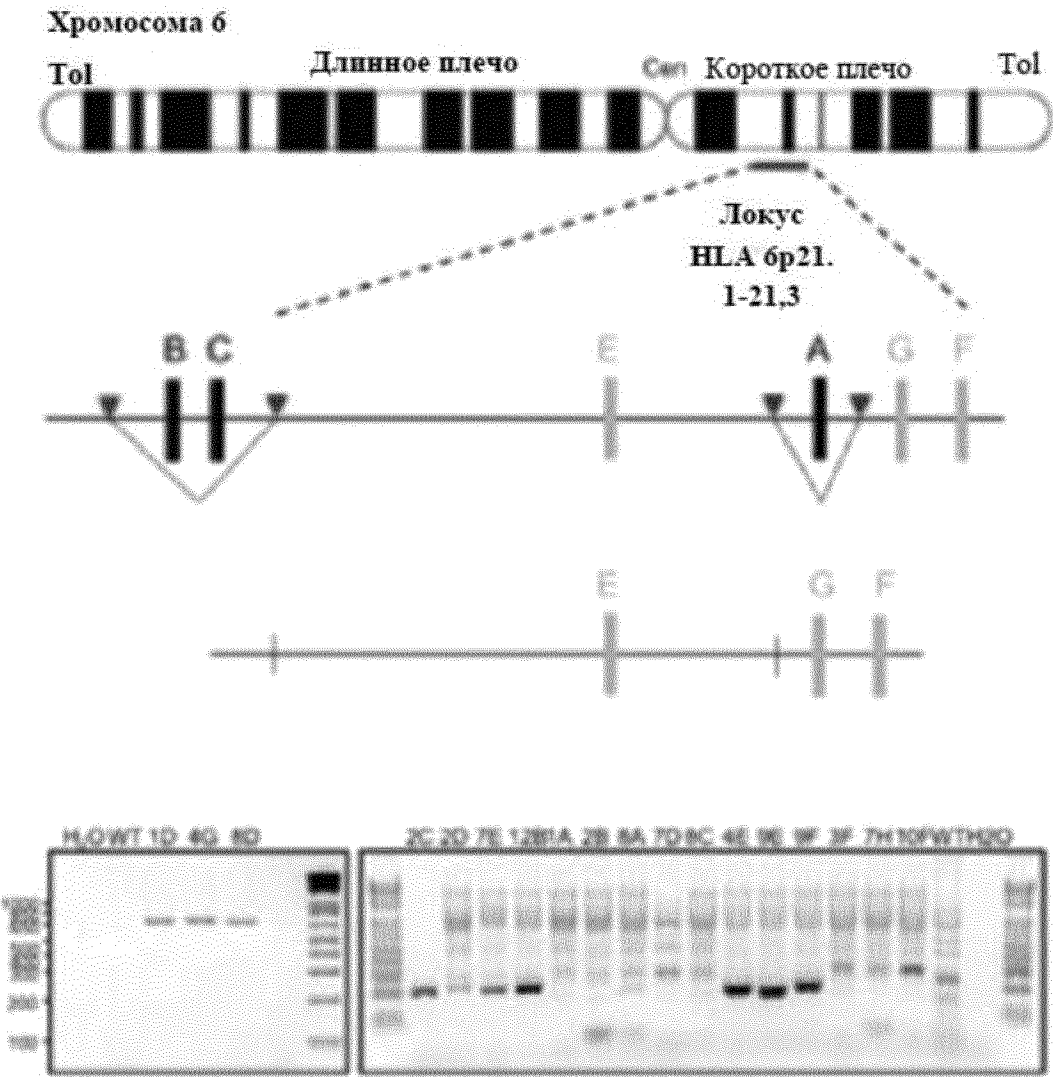
ФИГ. 12А

Делеция В2М предотвращает поверхностную экспрессию ГКГС класса I

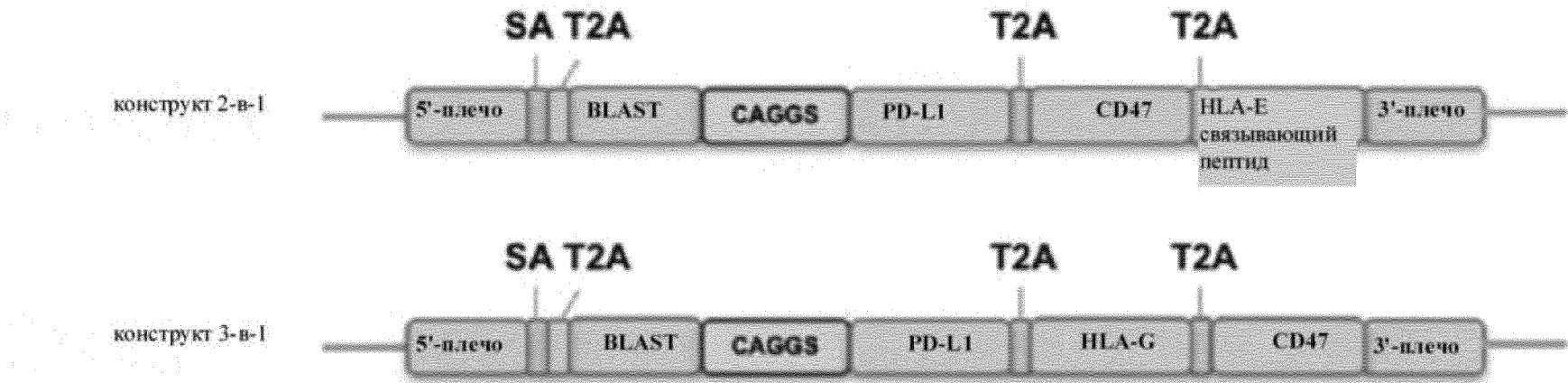


ФИГ. 12В

Нацеливание на отдельные полиморфные молекулы HLA



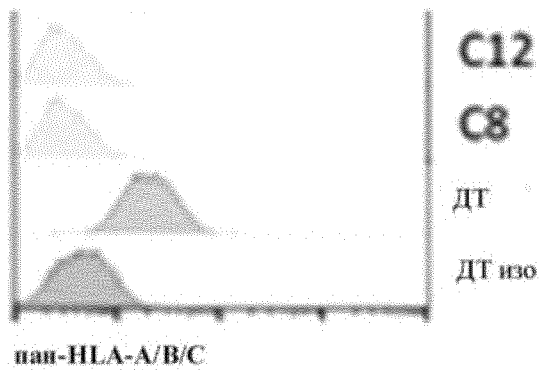
ФИГ. 12С



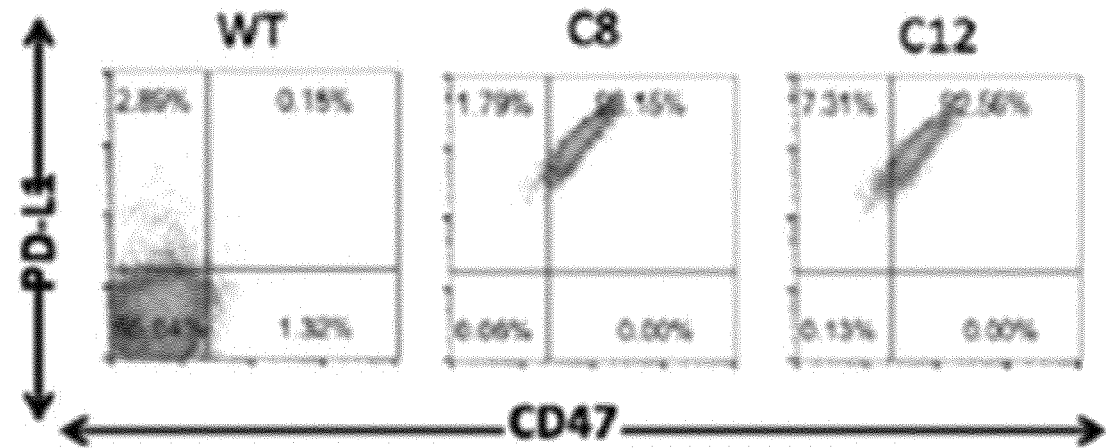
ФИГ. 13А

	Иммуногенный		Ингибирующие молекулы			
	Нокаут		Нокин в локус AAVS			
	HLA-A/B/C (MHC I)	CIITA (MHC II)	PD-L1	HLA-G	HLA-E-связывающий пептид	CD47
2-в-1	+	-/-	het: CAGGS		het: CAGGS	het: CAGGS

ФИГ. 13В

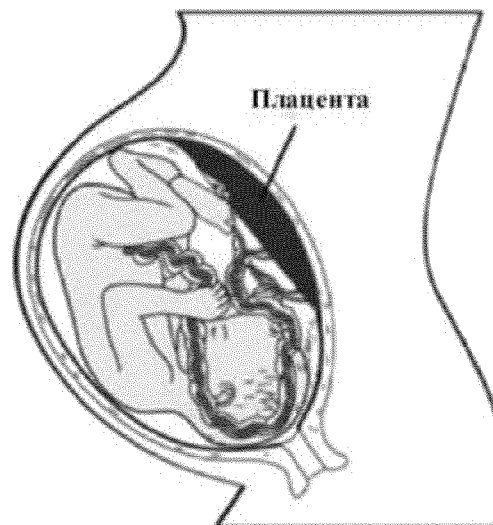


Вставка в локус «безопасная гавань» (AAVS1, HPRT)



ФИГ. 13C

ФИГ. 13D

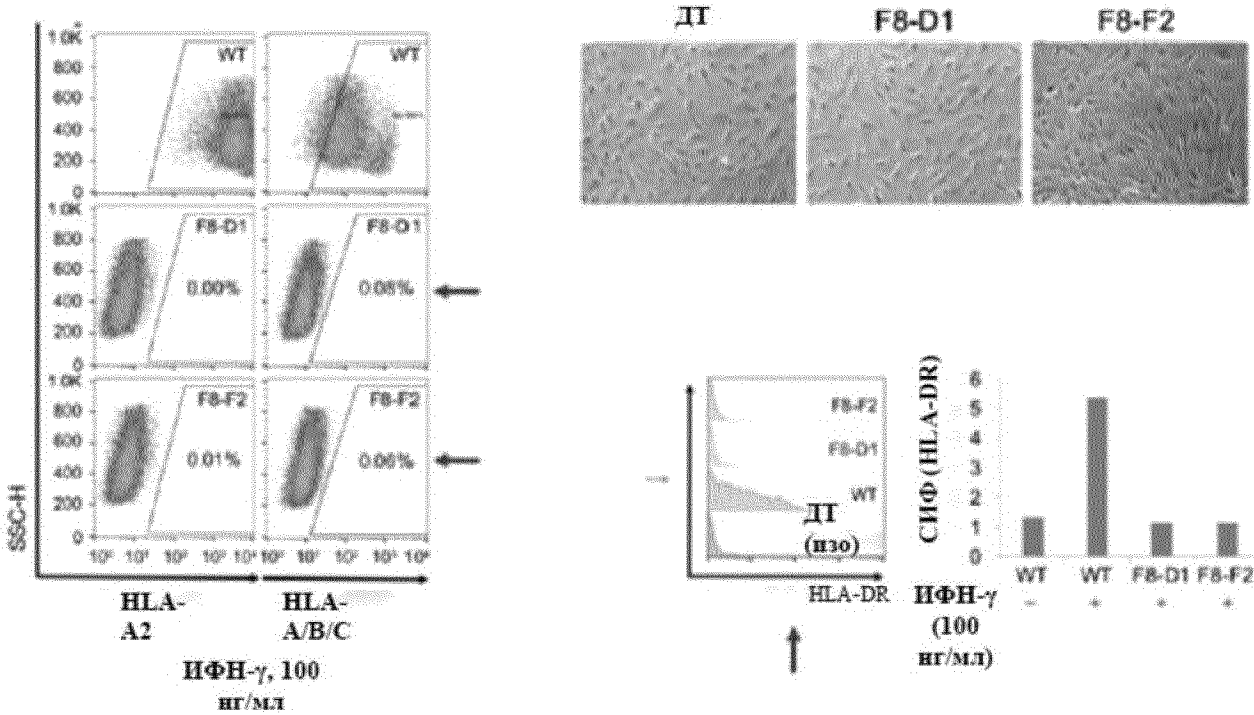


Иммуносупрессивная среда
 PD-L1 => T-клеточное ингибирование
 HLA-G => NK-клеточное ингибирование
 CD47 => макрофагальный сигнал «не ешь меня»

ФИГ. 13E

Дифференцировка

- Бета-клетки поджелудочной железы
- VSMC EC
- HLA-A^{-/-}, B^{-/-}, C^{-/-}, и СИТА^{-/-}

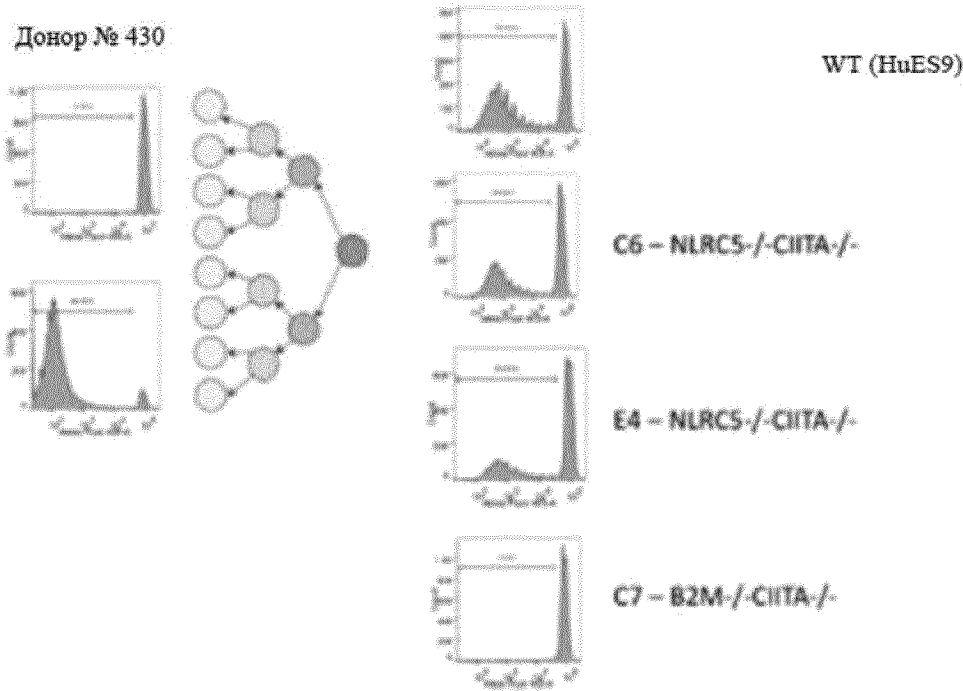


- Тестирование на микоплазму
- Кариотипирование
- Плурипотентность
- Анализ нецелевых сайтов
- Функция клетки, например, секреция инсулина

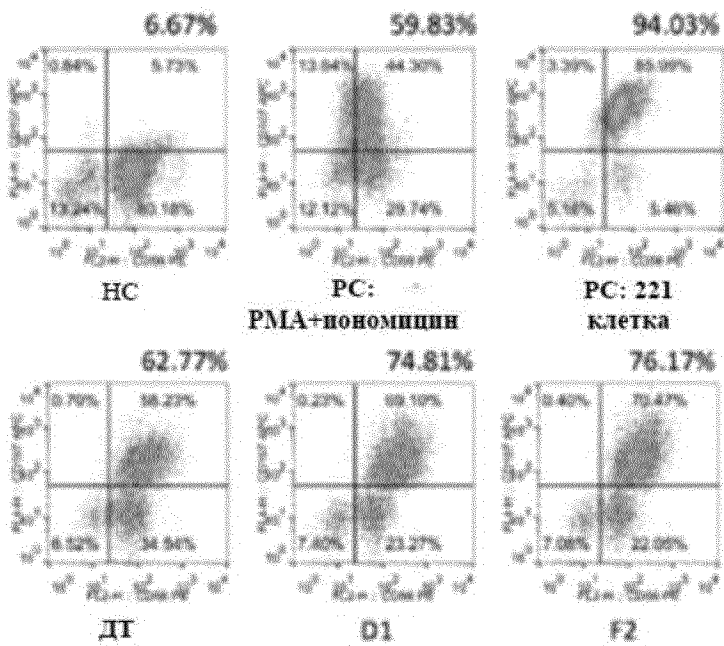
ФИГ. 14А

Иммунные анализы *in vitro*

Анализ пролиферации Т-клеток

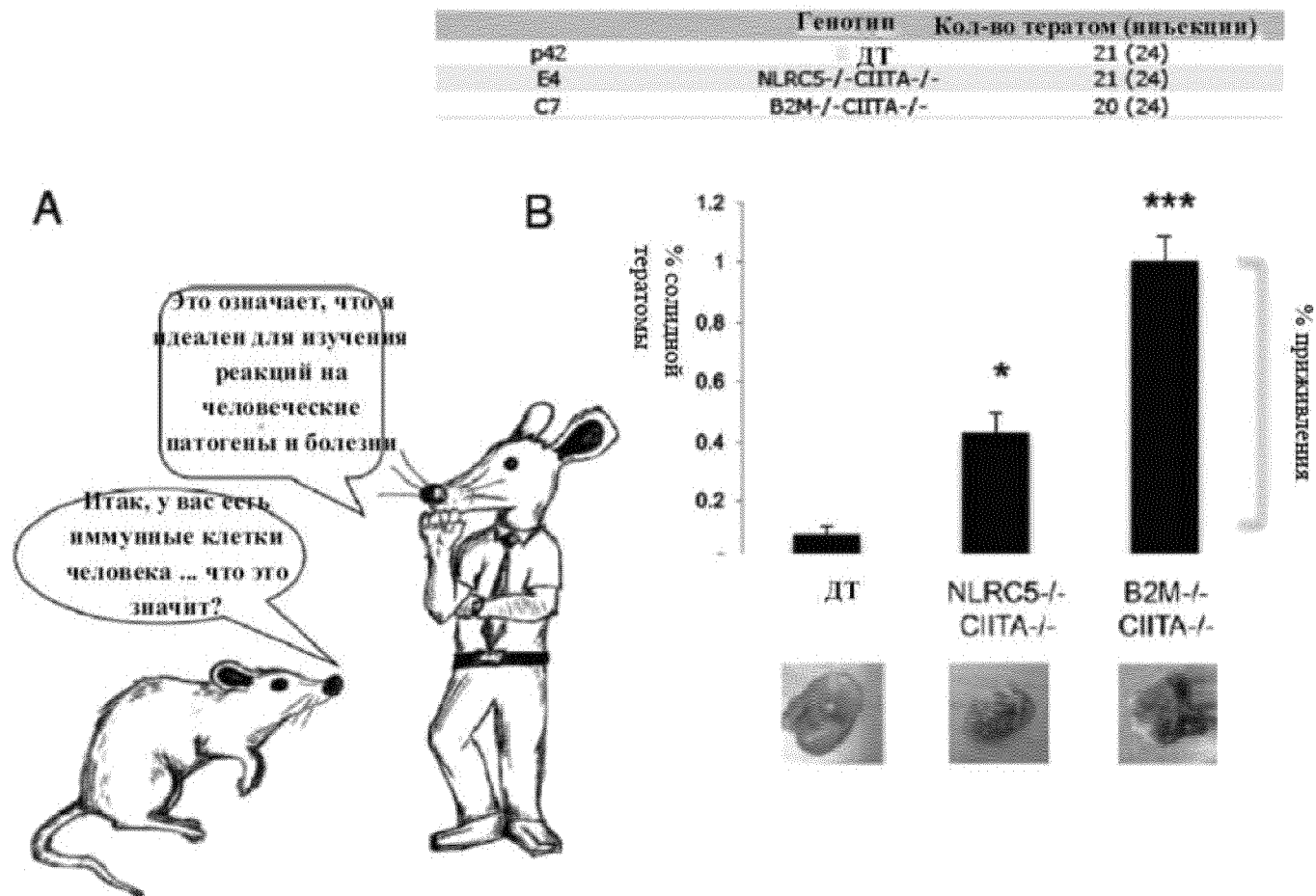


Анализ дегрануляции NK-клеток



ФИГ. 14В

...с помощью нашей гуманизированной мышиной платформы



ФИГ. 15А

- * Мыши с ослабленным иммунитетом
- * Восстановленные с помощью иммунной системой человека

