

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291332** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки  
**2022.07.04**(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)(22) Дата подачи заявки  
**2020.08.28**(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ МОДИФИКАЦИИ CLL1**(31) **62/892,868; 62/962,133**(32) **2019.08.28; 2020.01.16**(33) **US**(86) **PCT/US2020/048617**(87) **WO 2021/041971 2021.03.04**(71) Заявитель:  
**ВОР БАЙОФАРМА ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Лайдерд Джон, Ло Чун, Лин Мишель  
(US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится, например, к новым клеткам, имеющим модификацию (например, инсерцию или делецию) в эндогенном гене CLL1. Настоящее изобретение также относится к композициям, например, гРНК, которые могут быть использованы для осуществления такой модификации.



N = 2

**A1****202291332****202291332****A1**

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573312EA/081

## КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ МОДИФИКАЦИИ CLL1

### Родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет заявки на патент США под регистрационным номером: 62/892868, поданной 28 августа 2019 г., и заявки на патент США под регистрационным номером: 62/962133, поданной 16 января 2020 г., содержание которых в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки.

### Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки. Упомянутая копия ASCII, созданная 28 августа 2020 года, называется V0291\_70005WO00\_SL.txt и имеет размер 54483 байта.

### Предпосылки создания изобретения

Когда онкологическому больному назначают противораковую терапию против CLL1, то такая терапия может приводить к истощению не только раковых CLL1<sup>+</sup>-клеток, но также и незлокачественных CLL1<sup>+</sup>-клеток, и может давать эффект, направленный «на другую мишень, но не на опухоль». Поскольку некоторые гемопоэтические клетки обычно экспрессируют CLL1, то потеря нераковых CLL1<sup>+</sup>-клеток может приводить к истощению кроветворной системы пациента. Чтобы предотвратить такое истощение, индивидууму могут быть введены защитные клетки (например, HSC и/или HPC), содержащие модификацию гена CLL1. Эти CLL1-модифицированные клетки могут быть резистентными к противораковой терапии, направленной против CLL1, и, следовательно, могут повторно заселять кроветворную систему во время или после терапии против CLL1.

### Сущность изобретения

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится, например, к новым клеткам, имеющим модификацию (например, замену, инсерцию или делецию) в эндогенном гене CLL1. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение также относится к композициям, например, гРНК, которые могут быть использованы для осуществления такой модификации. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к способам применения представленных здесь композиций, например, к способам применения определенных гРНК, полученных для создания генетически сконструированных клеток, например, клеток, имеющих модификацию эндогенного гена CLL1. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к способам введения описанных здесь генетически сконструированных клеток, например, клеток, имеющих модификацию эндогенного гена CLL1, индивидууму, нуждающемуся в этом. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к стратегиям, композициям, способам и к методам лечения пациентов, страдающих раком, и получающих противораковую терапию, направленную против CLL1, или нуждающихся в такой противораковой терапии.

### **Перечисленные варианты осуществления изобретения**

1. гРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью, указанным в Таблице 1 (например, с доменом-мишенью любой из SEQ ID NO: 1-20 или 40-43).
2. гРНК, содержащая нацеливающий домен, способный управлять расщеплением или редактированием домена-мишени, указанного в Таблице 1 (например, домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20 или 40-43).
3. гРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью любой из SEQ ID NO: 1-3 или 5-10, или SEQ ID NO: 11-13 или 15-20.
4. гРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью SEQ ID NO: 4.
5. гРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью SEQ ID NO: 14, где нацеливающий домен не содержит SEQ ID NO: 4.
6. гРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью SEQ ID NO: 14, где нацеливающий домен имеет длину по меньшей мере 21 нуклеотид.
7. гРНК в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен представляет собой пары оснований или комплементарен по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидам домена-мишени, или где нацеливающий домен содержит 0, 1, 2 или 3 ошибочных спариваний с доменом-мишенью.
8. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 31.
9. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 31, и пар оснований, или комплементарен по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидам домена-мишени.
10. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 46.
11. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 46 и пар оснований, или комплементарен по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидам домена-мишени.
12. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления

изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 270.

13. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 270, и пар оснований, или комплементарен по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидам домена-мишени.

14. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 271.

15. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 271, и пар оснований, или комплементарен по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидам домена-мишени.

16. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 272.

17. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит по меньшей мере 16 (например, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 271, и пар оснований, или комплементарен по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидам домена-мишени.

18. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где указанный нацеливающий домен сконструирован для обеспечения события расщепления (например, одноцепочечного разрыва или двухцепочечного разрыва) в домене-мишени, например, сразу после нуклеотида в положении 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 домена-мишени.

19. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 21.

20. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 22.

21. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 23.

22. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 24.

23. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит

последовательность SEQ ID NO: 25.

24. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 26.

25. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27.

26. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 28.

27. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 29.

28. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 30.

29. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 44.

30. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 45.

31. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 119.

32. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 98.

33. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность, представленную в Таблице 2 или 6.

34. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность, представленную в Таблице 8 (например, любую из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 98 или 119).

35. гРНК, содержащая нацеливающий домен, способный управлять расщеплением или редактированием домена-мишени, указанного в Таблице 2 (например, домена-мишени любой из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1-10, 40 или 42).

36. гРНК, содержащая нацеливающий домен, способный управлять расщеплением или редактированием домена-мишени, указанного в Таблице 6 (например, домена-мишени любой из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 67-177).

37. гРНК, содержащая нацеливающий домен, способный управлять расщеплением или редактированием домена-мишени, указанного в Таблице 8 (например, домена-мишени любой из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 98 или 119).

38. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где домен-мишень находится в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5 или экзоне 6 последовательности CLL1 SEQ ID NO: 31.

39. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где домен-мишень находится в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5, экзоне 6 или экзоне 7 последовательности CLL1 SEQ ID NO: 46.

40. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления

изобретения, где домен-мишень находится в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5, экзоне 6 или экзоне 7 последовательности CLL1 SEQ ID NO: 270.

41. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где домен-мишень находится в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5 или экзоне 6 последовательности CLL1 SEQ ID NO: 271.

42. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где домен-мишень находится в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3, экзоне 4 или экзоне 5 последовательности CLL1 SEQ ID NO: 272.

43. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, которая представляет собой одноцепочечную гидовую РНК (оцгРНК).

44. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен имеет длину 16 нуклеотидов или более.

45. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов.

46. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 1-10, 21-30, 40, 42, 44 или 45 или ее обратный комплемент, или последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична любой из вышеперечисленных последовательностей, или последовательность, имеющую не более 1, 2 или 3 мутаций по сравнению с любой из вышеперечисленных последовательностей.

47. гРНК согласно варианту 46, где 2 мутации не являются смежными друг с другом.

48. гРНК согласно варианту 46, где ни одна из 3 мутаций не является смежной.

49. гРНК согласно любому из вариантов 46-48, где 1, 2 или 3 мутации представляют собой замены.

50. гРНК согласно любому из вариантов 46-48, где одна или более мутаций представляют собой инсерцию или делецию.

51. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 1-10, 40 или 42.

52. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

53. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

54. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

55. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

56. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 5.



77. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 29.

78. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 30.

79. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 44.

80. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 45.

81. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 239.

82. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 257.

83. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 216-269.

84. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит одну или более химических модификаций (например, химическую модификацию азотистого основания, сахара или части остова).

85. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит один или более 2'-О-метил-нуклеотидов, например, в описанном здесь положении.

86. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит одну или более фосфоротиоатных или тио-РАСЕ-связей, например, в описанном здесь положении.

87. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая связывается с молекулой Cas9.

88. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен имеет длину приблизительно 18-23, например, 20 нуклеотидов.

89. гРНК согласно любому из вариантов 1-88, которая связывается с tracrРНК.

90. гРНК согласно любому из вариантов 1-88, которая содержит последовательность остова.

91. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит один или более (например, все) из:

первого комплементарного домена;

связывающего домена;

второго комплементарного домена, который является комплементарным первому комплементарному домену;

проксимального домена; и

хвостового домена.

92. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит первый комплементарный домен.

93. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит



связывающий домен.

94. гРНК согласно варианту 92 или 93, которая содержит второй комплементарный домен, комплементарный первому комплементарному домену.

95. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит проксимальный домен.

96. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит хвостовой домен.

97. гРНК согласно любому из вариантов 91-96, где нацеливающий домен гетерологичен одному или более (например, всем) из:

первого комплементарного домена;

связывающего домена;

второго комплементарного домена, который является комплементарным первому комплементарному домену;

проксимального домена; и

хвостового домена.

98. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где гРНК имеет частоту редактирования, оцененную с помощью ICE и составляющую 70-100, например, 75-100, 80-100, 85-100, 90-100 или 95-100, или по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 99 или по меньшей мере 100.

99. гРНК согласно любому из вариантов 1-97, где гРНК имеет частоту редактирования, оцененную с помощью ICE и составляющую 10-90, например, 20-70, 25-70, 30-70, 35-70, 40-70, 45-70, 50-70, 55-70, 60-70 или 65-70, или по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65 или по меньшей мере 70.

100. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где гРНК имеет частоту редактирования, оцененную с помощью ICE и составляющую по меньшей мере 80.

101. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где гРНК имеет величину  $R^2$  частоты редактирования, оцененную с помощью ICE и составляющую 0,8-1, например, 0,85-1, 0,9-1, 0,95-1 или по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,85, по меньшей мере 0,9, по меньшей мере 0,95, по меньшей мере 0,98, по меньшей мере 0,99 или по меньшей мере 1.

102. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где гРНК имеет величину  $R^2$  частоты редактирования, оцененную с помощью ICE и составляющую по меньшей мере 0,85.

103. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где гРНК имеет частоту редактирования, оцененную с помощью ICE и составляющую по меньшей мере 80, и величину  $R^2$  частоты редактирования, оцененную с помощью ICE и составляющую

по меньшей мере 0,85.

104. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где гРНК имеет частоту редактирования, например, оцененную путем секвенирования по Сэнгеру с последующим анализом ICE или TIDE и составляющую 70-100, например, 75-100, 80-100, 85-100, 90-100, 95-100 или по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 99 или по меньшей мере 100.

105. гРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где гРНК имеет частоту редактирования, например, оцененную путем секвенирования ампликона, нацеленного на мишень следующего поколения (секвенирования ампликона), и составляющую 70-100, например, 75-100, 80-100, 85-100, 90-100, 95-100 или по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 99 или по меньшей мере 100.

106. Набор или композиция, содержащие:

а) гРНК согласно любому из вариантов 1-105 или нуклеиновую кислоту, кодирующую гРНК, и

б) вторую гРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую вторую гРНК.

107. Набор или композиция согласно варианту 106, где первая гРНК включает нацеливающий домен, содержащий последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4).

108. Набор или композиция согласно варианту 106 или 107, где вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный для линии дифференцировки.

109. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-108, где вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и отличающийся от CLL1.

110. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-109, где вторая гРНК нацелена на CD33 (например, где вторая гРНК содержит нацеливающий домен, содержащий последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64).

111. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-110, где вторая гРНК нацелена на CD123 (например, где вторая гРНК содержит нацеливающий домен, содержащий последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 65) или AGTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 66)).

112. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-111, где вторая гРНК включает нацеливающий домен, содержащий последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 65).

113. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-112, где вторая гРНК включает нацеливающий домен, содержащий последовательность AGTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 66).

114. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-113, где вторая гРНК включает нацеливающий домен, содержащий последовательность, представленную

в Таблице А.

115. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-114, где первая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4), а вторая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64).

116. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-115, где первая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4), а вторая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 65).

117. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-116, где первая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4), а вторая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность AGTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 66).

118. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-117, которые дополнительно включают третью гРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую третью гРНК.

119. Набор или композиция согласно варианту 118, где третья гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки.

120. Набор или композиция согласно варианту 118, где третья гРНК нацелена на CD33, CLL-1 или CD123.

121. Набор или композиция согласно любому из вариантов 118-120, где первая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4), вторая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 65), а третья гРНК включает нацеливающий домен, содержащий последовательность AGTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 66).

122. Набор или композиция согласно любому из вариантов 118-120, где первая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4), вторая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64), а третья гРНК включает нацеливающий домен, содержащий последовательность AGTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 66).

123. Набор или композиция согласно любому из вариантов 118-120, где первая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4), вторая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 65), а третья гРНК включает нацеливающий домен, содержащий последовательность

CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64).

124. Набор или композиция согласно любому из вариантов 118-123, которые дополнительно содержат четвертую гРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую четвертую гРНК.

125. Набор или композиция согласно варианту 124, где четвертая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки.

126. Набор или композиция согласно варианту 124, где четвертая гРНК нацелена на CD33, CLL-1 или CD123.

127. Набор или композиция согласно любому из вариантов 124-126, где гРНК согласно (а) включает нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4); вторая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 65); третья гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность AGTTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 66); а четвертая гРНК включает нацеливающий домен, который содержит последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64).

128. Набор или композиция согласно любому из вариантов 124-127, где гРНК согласно (а), вторая гРНК, третья гРНК и четвертая гРНК являются смешанными.

129. Набор или композиция согласно любому из вариантов 124-127, где гРНК согласно (а), вторая гРНК, третья гРНК и четвертая гРНК находятся в отдельных контейнерах.

130. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-129, где гРНК (а) и (b) являются смешанными.

131. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-129, где (а) и (b) находятся в отдельных контейнерах.

132. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-131, где нуклеиновая кислота (а) и нуклеиновая кислота (b) являются частью одной и той же нуклеиновой кислоты.

133. Набор или композиция согласно любому из вариантов 106-131, где нуклеиновая кислота (а) и нуклеиновая кислота (b) представляют собой отдельные нуклеиновые кислоты.

134. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник), которая содержит:

(а) мутацию в домене-мишени, представленном в Таблице 1 (например, в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20 или 40-43); и

(b) вторую мутацию в гене, кодирующем антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и отличающийся от CLL1.

135. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 1.

136. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту

134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 2.

137. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 3.

138. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 4.

139. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 5.

140. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 6.

141. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 7.

142. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 8.

143. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 9.

144. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 10.

145. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 40.

146. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 42.

147. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 98.

148. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 119.

149. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 134, где мутация (а) присутствует в домене-мишени, представленном в любой из Таблиц 2 или 6.

150. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 134-149, где мутация (а) включает инсерцию, делецию или замену (например, модификацию по одному нуклеотиду).

151. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 134-149, которая содержит инсерцию 1 нуклеотида или делецию 1 нуклеотида, 2 нуклеотидов, или 3 нуклеотидов, или 4 нуклеотидов в CLL1.

152. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 134-151, которая содержит описанную здесь инсерцию-делецию, например, инсерцию-делецию, продуцированную или продуцируемую посредством описанной здесь гРНК (например, любой из гРНК D, гРНК F, гРНК G, гРНК O2 или гРНК P2).

153. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 134-152, которая содержит инсерцию-делецию, продуцированную или

продуцируемую посредством описанной здесь системы CRISPR, например, способом, описанным в Примерах 1, 2, 3, 4 или 5.

154. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 150-153, где делеция полностью находится в пределах домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10.

155. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 154, где длина делеции составляет 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17 нуклеотидов.

156. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 150-153, где делеция имеет одну или обе конечные точки за пределами домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10.

157. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 134-156, где мутация приводит к сдвигу рамки считывания.

158. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 134-157, где вторая мутация включает инсерцию, делецию или замену (например, модификацию по одному нуклеотиду).

159. Применение гРНК согласно любому из вариантов 1-105 или гРНК композиции или набора согласно любому из вариантов 106-133 для снижения уровня экспрессии CLL1 в образце гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников с использованием системы CRISPR/Cas9.

160. Применение системы CRISPR/Cas9 для снижения уровня экспрессии CLL1 в образце гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, где гРНК системы CRISPR/Cas9 представляет собой гРНК согласно любому из вариантов 1-105 или гРНК композиции или набора согласно любому из вариантов 106-133.

161. Способ получения генетически сконструированной клетки, включающий:

(i) получение клетки (например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника дикого типа), и

(ii) введение в клетку (а) геновой РНК (гРНК) согласно любому из вариантов 1-105 или гРНК композиции или набора согласно любому из вариантов 106-133; и (b) эндонуклеазы, которая связывается с гРНК (например, молекулы Cas9), и

тем самым получение генетически сконструированной клетки.

162. Способ получения генетически сконструированной клетки, включающий:

(i) получение клетки (например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника дикого типа), и

(ii) введение в клетку (а) гРНК согласно любому из вариантов 1-105 или гРНК композиции или набора согласно любому из вариантов 106-133; и (b) молекулы Cas9, которая связывается с гРНК, и

тем самым получение генетически сконструированной клетки.

163. Способ или применение согласно любому из вариантов 159-162, которые

приводят к получению генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, имеющей пониженный уровень экспрессии CLL1 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

164. Способ или применение согласно любому из вариантов 159-163, которые приводят к получению генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, имеющей пониженный уровень экспрессии CLL1, составляющий менее, чем 20% от уровня CLL1 в клетке-аналоге дикого типа.

165. Способ или применение согласно любому из вариантов 159-164, которые осуществляют с использованием множества гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников.

166. Способ или применение согласно любому из вариантов 159-165, которые осуществляют с использованием клеточной популяции, включающей множество гемопоэтических стволовых клеток и множество гемопоэтических клеток-предшественников.

167. Способ или применение согласно любому из вариантов 159-166, которые приводят к получению клеточной популяции согласно любому из вариантов 285-383.

168. Способ согласно любому из вариантов 161-167, где нуклеиновые кислоты (a) и (b) кодируются на одном векторе, который вводят в клетку.

169. Способ согласно варианту 168, где вектор представляет собой вирусный вектор.

170. Способ согласно варианту 169, где (a) и (b) вводят в клетку в виде предварительно полученного рибонуклеопротеинового комплекса.

171. Способ согласно варианту 170, где рибонуклеопротеиновый комплекс вводят в клетку посредством электропорации.

172. Способ согласно любому из вариантов 161-168, где эндонуклеазу (например, молекулу Cas9) вводят в клетку путем доставки в клетку молекулы нуклеиновой кислоты (например, молекулы мРНК или вирусного вектора, например, AAV), кодирующей эндонуклеазу.

173. Способ согласно любому из вариантов 161-172, где клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) представляет собой CD34<sup>+</sup>-клетку.

174. Способ согласно любому из вариантов 161-173, где жизнеспособность популяции клеток составляет по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 98% от жизнеспособности контрольных клеток (например, контрольных клеток, подвергнутых ложной электропорации) через 48 часов после введения гРНК в клетки.

175. Способ согласно любому из вариантов 161-174, где по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 98% клеток в популяции являются жизнеспособными через 48 часов после введения гРНК в клетки.

176. Способ согласно любому из вариантов 161-175, где гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник происходят из клеток костного мозга или

моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) индивидуума.

177. Способ согласно любому из вариантов 161-176, где индивидуум страдает расстройством системы кроветворения, например, злокачественным новообразованием кроветворной системы, например, лейкозом, например, ОМЛ.

178. Способ согласно любому из вариантов 161-176, где индивидуум страдает гематологическим заболеванием, например, предраковым состоянием, например, миелодисплазией, миелодиспластическим синдромом (МДС) или предлейкозом.

179. Способ согласно любому из вариантов 161-177, где индивидуум страдает раком, клетки которого экспрессируют CLL1 (например, где по меньшей мере множество раковых клеток экспрессируют CLL1).

180. Способ или применение согласно любому из вариантов 159-179, которые приводят к мутации, вызывающей пониженный уровень экспрессии CLL1 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

181. Способ или применение согласно любому из вариантов 159-180, которые приводят к мутации, вызывающей пониженный уровень экспрессии CLL1 дикого типа по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

182. Способ или применение согласно любому из вариантов 159-181, которые позволяют получить генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник, имеющую пониженный уровень экспрессии CLL1 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

183. Способ или применение согласно любому из вариантов 159-182, которые позволяют получить генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник, имеющую пониженный уровень экспрессии CLL1 дикого типа по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

184. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, полученная способом согласно любому из вариантов 159-183.

185. Нуклеиновая кислота (например, ДНК), кодирующая гРНК согласно любому из вариантов 1-105.

186. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник), которая содержит мутацию в домене-мишени, представленном в Таблице 1 (например, в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20), например, где мутация является результатом генной инженерии.

187. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник), которая содержит мутацию в домене-мишени, представленном в Таблице 8 (например, в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 98, или 119), например, где мутация является результатом генной инженерии.

188. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник), которая содержит мутацию в домене-мишени, представленном в Таблице 6 (например, в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 67-177), например, где мутация является результатом генной инженерии.



189. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник), содержащая мутацию в пределах 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов (расположенных выше или ниже) домена-мишени, представленного в Таблице 1 (например, домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20 или 40-43).

190. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник), содержащая мутацию в пределах 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов (расположенных выше или ниже) домена-мишени, представленного в Таблице 6 (например, домена-мишени любой из SEQ ID NO: 67-177).

191. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник), содержащая мутацию в пределах 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов (расположенных выше или ниже) домена-мишени, представленного в Таблице 8 (например, домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 98 или 119).

192. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 198, где мутация находится в пределах 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов (расположенных выше или ниже) любой из SEQ ID NO: 4, 6 или 7.

193. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 198, где мутация находится в пределах 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов, расположенных ниже SEQ ID NO: 4.

194. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 198, где мутация находится в пределах 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов, расположенных выше SEQ ID NO: 4.

195. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 1.

196. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 1, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

197. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 1, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1, который составляет менее 20% от уровня CLL1 в соответствующей клетке дикого типа.

198. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 2.

199. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 2, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

200. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или







клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 96, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1, который составляет менее 20% от уровня CLL1 в соответствующей клетке дикого типа.

237. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 186-236, содержащая предсказанный сайт, не являющийся мишенью, который не содержит мутации или модификации последовательности по сравнению с последовательностью сайта до редактирования гена CLL1.

238. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 186-237, содержащая два предсказанных сайта, не являющихся мишенью, которые не содержат мутации или модификации последовательности по сравнению с последовательностью сайта до редактирования гена CLL1.

239. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 186-238, содержащая по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 предсказанных сайтов, не являющихся мишенью, которые не содержат мутации или модификации последовательности по сравнению с последовательностью сайта до редактирования гена CLL1.

240. Генетически сконструированная клетка согласно любому из предшествующих вариантов, которая не содержит мутации в каком-либо предсказанном сайте, не являющемся мишенью, например, в любом сайте в геноме человека, имеющем 1, 2, 3 или 4 ошибочных спариваний по сравнению с доменом-мишенью.

241. Генетически сконструированная клетка согласно любому из предшествующих вариантов, которая не содержит мутации в любом сайте в геноме человека, имеющем 1 ошибочное спаривание по сравнению с доменом-мишенью.

242. Генетически сконструированная клетка согласно любому из предшествующих вариантов, которая не содержит мутации в любом сайте в геноме человека, имеющем 1 или 3 ошибочных спариваний по сравнению с доменом-мишенью.

243. Генетически сконструированная клетка согласно любому из предшествующих вариантов, которая не содержит мутации в любом сайте в геноме человека, имеющем 1, 2 или 3 ошибочных спариваний по сравнению с доменом-мишенью.

244. Генетически сконструированная клетка согласно любому из предшествующих вариантов, которая не содержит мутации в любом сайте в геноме человека, имеющем 1, 2, 3 или 4 ошибочных спариваний по сравнению с доменом-мишенью.

245. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-244, где мутация включает инсерцию, делецию или замену (например, модификацию по одному нуклеотиду).

246. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 245, где делеция полностью находится в пределах домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20, 40-43, 98 или 119.

247. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 246, где длина делеции составляет 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17 нуклеотидов.

248. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 167, где делеция имеет одну или обе конечные точки за пределами домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20, 40-43, 98 или 119.

249. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-248, где мутация приводит к сдвигу рамки считывания.

250. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно любому из вариантов 184 или 186-249, где мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 дикого типа по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа (например, менее, чем на 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% или 5% от уровня в соответствующей клетке дикого типа).

251. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-250, где клетка имеет пониженный уровень белка CLL1 дикого типа по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа (например, менее, чем на 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% или 5% от уровня в соответствующей клетке дикого типа).

252. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-251, которая не экспрессирует CLL1.

253. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно любому из предшествующих вариантов, где мутация приводит к отсутствию экспрессии CLL1.

254. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно любому из предшествующих вариантов, которая экспрессирует менее, чем 20% CLL1, экспрессируемого соответствующей клеткой дикого типа.

255. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно любому из предшествующих вариантов, где пониженный уровень экспрессии CLL1 наблюдается в клетке, дифференцированной (например, полностью дифференцированной) из гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, а клетка-аналог дикого типа представляет собой клетку, дифференцированную (например, полностью дифференцированную) из гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника дикого типа.

256. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно варианту 255, где клетка, дифференцированная из гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, представляет собой миелобласт, моноцит или миелоидную дендритную клетку.

257. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-256, представляющая собой CD34<sup>+</sup>-клетку.

258. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-257, полученная из клеток костного мозга или мононуклеарных клеток периферической крови индивидуума.

259. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 258, где

индивидуумом является человек, страдающий злокачественным новообразованием кроветворной системы, например, ОМЛ.

260. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 258, где индивидуумом является человек, страдающий гематологическим заболеванием, например, предраковым состоянием, например, миелодисплазией, миелодиспластическим синдромом (МДС) или предлейкозом.

261. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 258-260, где индивидуум страдает раком, клетки которого экспрессируют CLL1 (например, где по меньшей мере множество раковых клеток экспрессируют CLL1).

262. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 258, где индивидуум является здоровый человек-донор (например, HLA-совместимый донор).

263. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-262, которая дополнительно содержит нуклеазу, выбранную из эндонуклеазы CRISPR, нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеазы, или нуклеиновую кислоту (например, ДНК или РНК), кодирующую нуклеазу, где нуклеаза необязательно является специфичной к CLL1.

264. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-263, которая дополнительно содержит гРНК (например, одноцепочечную гидовую РНК), специфичную к CLL1, или нуклеиновую кислоту, кодирующую гРНК.

265. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 264, где гРНК представляет собой описанную здесь гРНК, например, гРНК согласно любому из вариантов 1-105.

266. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-265, которая была получена способом, включающим контактирование клетки с нуклеазой, выбранной из эндонуклеазы CRISPR, нуклеазы «цинкового пальца» (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеазы (например, посредством контактирования клетки с нуклеазой или с нуклеиновой кислотой, кодирующей нуклеазу).

267. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-266, которая была получена способом, включающим контактирование клетки с нуклеазой или с каталитически неактивной молекулой Cas9 (dCas9), например, связанной с функциональным доменом (например, посредством контактирования клетки с нуклеазой или с нуклеиновой кислотой, кодирующей нуклеазу).

268. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-267, в которой обе копии CLL1 являются мутантными.

269. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 286, где обе копии CLL1 имеют одинаковую мутацию.

270. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 286, где копии CLL1 имеют различные мутации.

271. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-186, содержащая первую копию CLL1, имеющую первую мутацию, и вторую копию CLL1, имеющую вторую мутацию, где первая и вторая мутации являются различными.

272. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 271, где первая копия CLL1 содержит первую делецию.

273. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 271 или 272, где вторая копия CLL1 содержит вторую делецию.

274. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 271-273, где первая и вторая делеции перекрываются.

275. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 271-274, где конечная точка первой делеции находится внутри второй делеции.

276. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 271-275, где обе конечные точки первой делеции находятся внутри второй делеции.

277. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 271-273, где первая и вторая делеции имеют общую конечную точку.

278. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-277, где каждая первая и вторая мутации независимо выбраны из: инсерции 1 нуклеотида или делеции 1 нуклеотида, 2 нуклеотидов, 3 нуклеотидов или 4 нуклеотидов.

279. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-278, которая способна образовывать колонию BFU-E, колонию CFU-G, колонию CFU-M, колонию CFU-GM или колонию CFU-GEMM.

280. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-279, которая способна продуцировать цитокин, например, воспалительный цитокин, например, IL-6, TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  или MIP-1 $\alpha$ .

281. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-280, которая способна продуцировать цитокин, например, воспалительный цитокин, например, IL-6, TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  или MIP-1 $\alpha$ , на уровне, сравнимом с аналогичной клеткой, которая представляет собой CLL1-содержащую клетку дикого типа.

282. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 184 или 186-281, которая способна продуцировать цитокин, например, воспалительный цитокин, например, IL-6, TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  или MIP-1 $\alpha$ , на уровне, который составляет по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90% или 95% от уровней, продуцируемых аналогичной клеткой, которая представляет собой CLL1-содержащую клетку дикого типа.

283. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 280-282, которая способна продуцировать цитокин при ее моделировании с помощью агониста TLR, например, LPS или R848, например, как описано в Примере 5.

284. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 280-283, которая способна к фагоцитозу.

285. Популяция клеток, содержащая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников согласно любому из



вариантов 184 или 186-284 (например, включающая гемопоэтические стволовые клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или их комбинацию).

286. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 1.

287. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 1, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

288. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 1, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1, составляющему менее 20% от уровня CLL1 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

289. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 2.

290. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 2, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

291. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 2, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1, составляющему менее 20% от уровня CLL1 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

292. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 3.

293. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 3, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

294. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 3, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1, составляющему менее 20% от уровня CLL1 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

295. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат





мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 10, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1, составляющему менее 20% от уровня CLL1 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

316. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 40.

317. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 40, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

318. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 40, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1, составляющему менее 20% от уровня CLL1 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

319. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 42.

320. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 42, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

321. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 42, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1, составляющему менее 20% от уровня CLL1 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

322. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 98.

323. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 98, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

324. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 98, где такая мутация приводит к снижению

уровня экспрессии CLL1, составляющему менее 20% от уровня CLL1 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

325. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 119.

326. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 119, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

327. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 119, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1, составляющему менее 20% от уровня CLL1 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

328. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-218, где популяция клеток может дифференцироваться в клетки определенного типа, которые экспрессируют CLL1 на более низком уровне по сравнению с уровнем CLL1, экспрессируемого теми же самыми дифференцированными клетками, которые происходят от гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников дикого типа, содержащих CLL1.

329. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-328, где гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники сконструированы так, чтобы происходящие от них миелоидные клетки-предшественники имели дефицит уровней CLL1 по сравнению с миелоидными клетками-предшественниками, происходящими от CLL1-содержащих гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников дикого типа.

330. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-328, где гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники сконструированы так, чтобы происходящие от них миелоидные клетки (миелоидные клетки на конечной стадии дифференцировки) имели дефицит уровней CLL1 по сравнению с миелоидными клетками (миелоидными клетками на конечной стадии дифференцировки), происходящими от CLL1-содержащих гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников дикого типа.

331. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-330, которая дополнительно включает одну или более клеток, которые содержат один или более немодифицированных генов CLL1.

332. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-331, которая дополнительно включает одну или более клеток, гомозиготных по CLL1 дикого типа.

333. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-332, где приблизительно 0-1%, 1-2%, 2-5%, 5-10%, 10-15% или 15-20% клеток в популяции являются

гомозиготными по CLL1 дикого типа, например, гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники являются гомозиготными по CLL1 дикого типа.

334. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-333, которая дополнительно содержит одну или более клеток, гетерозиготных по CLL1, например, содержит одну копию CLL1 дикого типа и одну копию мутантного CLL1.

335. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-334, где приблизительно 0-1%, 1-2%, 2-5%, 5-10%, 10-15% или 15-20% клеток в популяции являются гетерозиготными по CLL1 дикого типа, например, являются гемопоэтическими стволовыми клетками или клетками-предшественниками, которые содержат одну копию CLL1 дикого типа и одну копию мутантного CLL1.

336. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-335, где по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% копий CLL1 в популяции являются мутантными.

337. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-336, которая содержит множество различных мутаций CLL1, например, которая включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных мутаций.

338. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-337, которая содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных мутаций.

339. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-338, которая содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных инсерций.

340. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-339, которая содержит множество инсерций и множество делеций.

341. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-340, которая экспрессирует менее 20% CLL1, экспрессируемого популяцией соответствующих клеток дикого типа.

342. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-341, где пониженный уровень экспрессии CLL1 наблюдается в клетке, дифференцированной (например, окончательно дифференцированной) из гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, а соответствующая клетка дикого типа представляет собой клетку, дифференцированную (например, окончательно дифференцированную) из гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников дикого типа.

343. Популяция клеток согласно варианту 342, где клетка, дифференцированная из гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, представляет собой миелобласт, моноцит или миелоидную дендритную клетку.

344. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-343, которая при ее введении индивидууму продуцирует hCD45<sup>+</sup>-клетки у индивидуума, например, как было проанализировано через 16 недель после введения.

345. Популяция клеток согласно варианту 344, которая продуцирует hCD45<sup>+</sup>-клетки на уровнях, сравнимых с уровнями hCD45<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой

CLL1-клетки дикого типа.

346. Популяция клеток согласно вариантам 344 или 345, которая продуцирует hCD45<sup>+</sup>-клетки на уровнях, которые составляют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90% или 95% от уровней hCD45<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

347. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-346, которая при ее введении индивидууму продуцирует hCD34<sup>+</sup>-клетки у индивидуума, например, как было проанализировано через 16 недель после введения.

348. Популяция клеток согласно варианту 347, которая продуцирует hCD34<sup>+</sup>-клетки на уровнях, сравнимых с уровнями hCD34<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

349. Популяция клеток согласно вариантам 347 или 348, которая продуцирует hCD34<sup>+</sup>-клетки на уровнях, которые составляют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90% или 95% от уровней hCD34<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

350. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-349, которая при ее введении индивидууму продуцирует тучные клетки, базофилы, эозинофилы, общие дендритные клетки (сDC), плазмацитоидные дендритные клетки (pDC), нейтрофилы, моноциты, Т-клетки, В-клетки или любые их комбинации у индивидуума, например, как было проанализировано через 16 недель после введения.

351. Популяция клеток согласно варианту 350, которая продуцирует тучные клетки, базофилы, эозинофилы, общие дендритные клетки (сDC), плазмацитоидные дендритные клетки (pDC), нейтрофилы, моноциты, Т-клетки, В-клетки или любые их комбинации, на уровнях, сравнимых с уровнями клеток указанного типа, продуцируемых в остальном аналогичной популяцией клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

352. Популяция клеток согласно варианту 350 или 351, которая продуцирует тучные клетки, базофилы, эозинофилы, общие дендритные клетки (сDC), плазмацитоидные дендритные клетки (pDC), нейтрофилы, моноциты, Т-клетки, В-клетки или любые их комбинации, на уровнях, которые составляют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90% или 95% от уровней, сравнимых с уровнями клеток указанного типа, продуцируемых в остальном аналогичной популяцией клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

353. Популяция клеток согласно любому из вариантов 350-352, где продуцируемые клетки детектируют в пробе крови, в образце костного мозга или в образце селезенки, взятых у индивидуума.

354. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-353, которая, при их введении индивидууму, сохраняется у индивидуума в течение по меньшей мере 8, 12 или 16 недель.

355. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-354, которая, при их введении индивидууму, обеспечивает восстановление клеток многих линий кроветворной системы.

356. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-355, которая продуцирует CD14<sup>+</sup>-клетки, например, как было проанализировано через 7 или 14 дней недель после генетической модификации.

357. Популяция клеток согласно варианту 356, которая продуцирует CD14<sup>+</sup>-клетки на уровнях, сравнимых с уровнями CD14<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

358. Популяция клеток согласно вариантам 356 или 357, которая продуцирует CD14<sup>+</sup>-клетки на уровнях, которые составляют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90% или 95% от уровней CD14<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

359. Популяция клеток согласно любому из вариантов 356-358, где уровни CD14<sup>+</sup>-клеток анализируют после культивирования *in vitro* в среде для дифференцировки миелоидных клеток.

360. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-359, которая продуцирует CD11b<sup>+</sup>-клетки, например, как было проанализировано через 7 или 14 дней недель после генетической модификации.

361. Популяция клеток согласно варианту 360, которая продуцирует CD11b<sup>+</sup>-клетки на уровнях, сравнимых с уровнями CD11b<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

362. Популяция клеток согласно вариантам 360 или 361, которая продуцирует CD11b<sup>+</sup>-клетки на уровнях, которые составляют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90% или 95% от уровней CD11b<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

363. Популяция клеток согласно любому из вариантов 356-362, где уровни CD15<sup>+</sup>-клеток анализируют после культивирования *in vitro* в среде для дифференцировки миелоидных клеток.

364. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-362, которая продуцирует CD15<sup>+</sup>-клетки, например, как было проанализировано через 7 или 14 дней недель после генетической модификации.

365. Популяция клеток согласно варианту 364, которая продуцирует CD15<sup>+</sup>-клетки на уровнях, сравнимых с уровнями CD15<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

366. Популяция клеток согласно вариантам 364 или 365, которая продуцирует CD15<sup>+</sup>-клетки на уровнях, которые составляют по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90% или



95% от уровней CD15<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CLL1-клетки дикого типа.

367. Популяция клеток согласно любому из вариантов 356-366, где уровни CD15<sup>+</sup>-клеток анализируют после культивирования *in vitro* в среде для дифференцировки миелоидных клеток.

368. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-367, где наиболее распространенная мутация CLL1 в клеточной популяции представляет собой делецию, например, делецию 1 нуклеотида, 2 нуклеотидов, 3 нуклеотидов или 4 нуклеотидов.

369. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-367, где наиболее распространенная мутация в CLL1 в клеточной популяции представляет собой инсерцию, например, инсерцию 1 нуклеотида.

370. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-368, где наиболее распространенная мутация в клеточной популяции в последовательности SEQ ID NO: 16 в CLL1 представляет собой делецию, например, делецию 1 нуклеотида.

371. Популяция клеток согласно вариантам 285-370, которая дополнительно содержит одну или две делеции из 2 нуклеотидов или инсерцию 1 нуклеотида в последовательности SEQ ID NO: 16 в копии CLL1.

372. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-368, где наиболее распространенная мутация в клеточной популяции в последовательности SEQ ID NO: 14 в CLL1 представляет собой инсерцию, например инсерцию 1 нуклеотида.

373. Популяция клеток согласно вариантам 285-368 или 224аа, которая дополнительно содержит делецию 1 нуклеотида в последовательности SEQ ID NO: 14 в копии CLL1.

374. Популяция клеток согласно любому из вариантов 188-368, где наиболее распространенная мутация в клеточной популяции в последовательности SEQ ID NO: 17 в CLL1 представляет собой делецию, например, делецию 2 нуклеотидов.

375. Популяция клеток согласно вариантам 285-368 или 374, которая дополнительно содержит инсерцию 1 нуклеотида в последовательности SEQ ID NO: 17 в копии CLL1.

376. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-368, где наиболее распространенная мутация в клеточной популяции в последовательности SEQ ID NO: 17 в CLL1 представляет собой инсерцию, например, инсерцию 1 нуклеотида.

377. Популяция клеток согласно вариантам 285-368 или 376, которая дополнительно содержит делецию 2 нуклеотидов в последовательности SEQ ID NO: 40 в копии CLL1.

378. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-368, где наиболее распространенная мутация в популяции клеток в последовательности SEQ ID NO: 43 в CLL1 представляет собой делецию, например, делецию 4 нуклеотидов.

379. Популяция клеток согласно вариантам 285-368 или 378, которая дополнительно содержит инсерцию 1 нуклеотида в последовательности SEQ ID NO: 43 в

копии CLL1.

380. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-379, которая включает гемопоэтические стволовые клетки и гемопоэтические клетки-предшественники.

381. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-380, где по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 98% клеток в популяции являются жизнеспособными.

382. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-381, где по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или 90% копий CLL1 содержат мутацию.

383. Популяция клеток согласно любому из вариантов 285-382, где по меньшей мере 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% клеток в популяции являются негативными по экспрессии CLL1 на клеточной поверхности, например, как было определено с помощью анализа методом проточной цитометрии на экспрессию CLL1 на клеточной поверхности.

384. Фармацевтическая композиция, содержащая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник согласно любому из вариантов 184 или 186-284.

385. Фармацевтическая композиция, содержащая клеточную популяцию согласно любому из вариантов 285-383.

386. Смесь, например, реакционная смесь, содержащая:

а) гРНК согласно любому из вариантов 1-105 или гРНК композиции или набора согласно любому из вариантов 106-133; и

б) клетку, например, гемопоэтическую клетку, например, HSC или НРС, например, генетически сконструированную клетку согласно любому из вариантов 184 или 186-284.

387. Смесь согласно варианту 386, где клетка представляет собой клетку дикого типа или клетку с мутацией в CLL1.

388. Набор, содержащий любые два или более (например, три или все) из:

а) гРНК согласно любому из вариантов 1-105 или гРНК композиции или набора согласно любому из вариантов 106-133;

б) клеток, например, гемопоэтических клеток, например, HSC или НРС, например, генетически сконструированных клеток согласно любому из вариантов 184 или 186-284;

с) молекулы Cas9; и

д) агента, нацеленного на CLL1, например, агента, описанного в настоящей заявке.

389. Набор согласно варианту 388, который включает (а) и (б), (а) и (с), (а) и (д), (б) и (с), (б) и (д), или (с) и (д).

390. Способ получения генетически сконструированной клетки (например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника) согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или популяции клеток согласно любому из вариантов 285-383, где указанный способ включает:

(i) получение клетки (например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника дикого типа), и

(ii) введение в клетку нуклеазы (например, эндонуклеазы), которая расщепляет домен-мишень, и

тем самым, получение генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника.

391. Способ согласно варианту 390, где (ii) включает введение в клетку гРНК, которая связывается с доменом-мишенью (например, гРНК согласно любому из вариантов 1-105 и эндонуклеазы, которая связывается с гРНК).

392. Способ согласно варианту 390, где эндонуклеаза представляет собой ZFN, TALEN или мегануклеазу.

393. Способ введения индивидууму HSC, HPC или HSPC, включающий введение индивидууму множества клеток согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточной популяции согласно любому из вариантов 285-383.

394. Способ, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, множества клеток согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточной популяции согласно любому из вариантов 285-383.

395. Способ согласно вариантам 393 или 394, где индивидуум страдает раком, где раковые клетки экспрессируют CLL1 (например, где по меньшей мере множество раковых клеток экспрессируют CLL1).

396. Способ согласно любому из вариантов 393-395, который дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества агента, нацеленного на CLL1, и где указанный агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CLL1.

397. Способ согласно варианту 396, где агент, нацеленный на CLL1, представляет собой иммунную клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с CLL1.

398. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 285-383 для их применения в целях лечения расстройств кроветворения, где указанное лечение включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника или клеточной популяции, и дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества агента, нацеленного на CLL1, где указанный агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CLL1.

399. Агент, нацеленный на CLL1, где указанный агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CLL1, и предназначен для лечения расстройства кроветворения, где лечение включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества агента, нацеленного на CLL1, и дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника

согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточной популяции согласно любому из вариантов 285-383.

400. Комбинация генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточной популяции согласно любому из вариантов 285-383 и агента, нацеленного на CLL1 и содержащего антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CLL1, для применения в целях лечения расстройства кроветворения, где указанное лечение включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника или клеточной популяции, и агента, который связывается с CLL1.

401. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 285-384 для их применения в противораковой иммунотерапии.

402. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 285-384 для их применения в противораковой иммунотерапии, где индивидуум страдает расстройством кроветворения.

403. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 285-384 для их применения в целях гемопоэтической репопуляции у индивидуума, страдающего расстройством кроветворения.

404. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 285-384 для их применения в способе лечения расстройства кроветворения, где генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник описанные в настоящей заявке, или клеточная популяция, описанная в настоящей заявке, обеспечивают репопуляцию у индивидуума.

405. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 285-384 для их применения в целях снижения цитотоксических эффектов агента, нацеленного на CLL1, при иммунотерапии.

406. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 184 или 186-284 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 285-384 для их применения в способе иммунотерапии с использованием агента, нацеленного на CLL1, где описанная здесь генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, или описанная здесь популяция клеток снижают цитотоксические

эффекты агента, нацеленного на CLL1.

407. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 285-384, где генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника или клеточную популяцию вводят одновременно с агентом, нацеленным на CLL1.

408. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 393-407, где генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника или клеточную популяцию вводят перед введением агента, нацеленного на CLL1.

409. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 393-408, где агент, нацеленный на CLL1, вводят до введения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника или клеточной популяции.

410. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 393-409, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

411. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 393-410, где иммунная клетка, генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, или та и другая, являются аллогенными.

412. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 393-411, где иммунная клетка, генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, или та и другая, являются аутологичными.

413. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 393-412, где антигенсвязывающий фрагмент в химерном рецепторе представляет собой фрагмент одноцепочечного антитела (scFv), который специфически связывается с человеческим CLL1.

414. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 393-413, где расстройство кроветворения представляет собой рак, и где по меньшей мере множество раковых клеток экспрессируют CLL1.

415. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 393-414, где индивидуум страдает злокачественным новообразованием кроветворной системы, например, злокачественным новообразованием кроветворной системы, выбранным из лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, лейкоза (например, острого миелоидного лейкоза, острого лимфоидного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза или хронического лимфобластного лейкоза и хронического лимфолейкоза) или множественной миеломы.

416. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 393-415, где индивидуум страдает гематологическим расстройством, например, предраковым состоянием, например, миелодисплазией, миелодиспластическим синдромом (МДС) или предлейкозом.

Приведенное выше краткое описание приводится лишь для иллюстрации

некоторых раскрытых здесь вариантов, преимуществ, признаков и их технологического применения, но не должно рассматриваться как ограничение объема изобретения. Другие варианты, преимущества, признаки и их технологическое применение будут очевидны из подробного описания, чертежей, примеров и формулы изобретения.

### **Краткое описание чертежей**

На фигуре 1 представлен график, иллюстрирующий скрининг гРНК CLL1 на CD34<sup>+</sup>-клетках. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием белка Cas9 и гРНК, нацеленных на CLL1 (указаны на оси Y). Эффективность редактирования локуса CLEC12A, показанного на оси X, определяли путем секвенирования по Сэнгеру и с помощью анализа TIDE.

На фигурах 2A-2D представлена серия диаграмм, иллюстрирующих выживаемость и дифференцировку CD34<sup>+</sup>-клеток, отредактированных с использованием CLL1. (A) Схема, иллюстрирующая рабочий процесс эксперимента. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием белка Cas9 и гРНК, нацеленной на CLL1, с последующим анализом на эффективность редактирования с помощью TIDE и анализом CFU для оценки дифференцировки *in vitro*. (B) Жизнеспособность клеток оценивали через 48 часов после электропорации. В качестве контроля использовали группу без RNP Cas9. (C) Эффективность редактирования локуса CLEC12A определяли путем секвенирования по Сэнгеру и анализа TIDE. (D) Контрольные клетки или отредактированные по CLL1 CD34<sup>+</sup>-клетки высевали в Methocult через 2 дня после электропорации и оценивали на образование колоний через 14 дней. BFU-E: область дифференцировки ранних клеток-предшественников эритроидного ряда; CFU-GM: колониеобразующая единица гранулоцитов/макрофагов; CFU-GEMM: колониеобразующая единица мультипотентных миелоидных клеток-предшественников (генерируют гранулоциты, эритроциты, моноциты и мегакариоциты). Был использован t-критерий Стьюдента.

На фигуре 3 показана целевая экспрессия на клеточных линиях ОМЛ. Экспрессию CD33, CD123 и CLL1 в клетках MOLM-13 и THP-1 и в неокрашенном контроле определяли с помощью проточного цитометрического анализа. На оси X указана интенсивность окрашивания антителами, а на оси Y указано количество клеток.

На фигуре 4 показаны CD33- и CLL1-модифицированные клетки HL-60. Экспрессию CD33 и CLL1 в клетках дикого типа (WT), в CD33<sup>-/-</sup>, CLL1<sup>-/-</sup> и CD33<sup>-/-</sup>CLL1<sup>-/-</sup>-клетках HL-60 оценивали с помощью проточной цитометрии. Для получения CD33<sup>-/-</sup> или CLL1<sup>-/-</sup>-клеток HL-60, клетки HL-60 дикого типа подвергали электропорации с использованием RNP, нацеленного на CD33 или CLL1, с последующим проведением сортировки CD33- или CLL1-негативных клеток с помощью проточной цитометрии. CD33<sup>-/-</sup>CLL1<sup>-/-</sup>-клетки HL-60 получали путем электропорации CD33<sup>-/-</sup>-клеток с использованием RNP, нацеленного на CLL1, и проводили сортировку на CLL1-негативную популяцию. На оси X показана интенсивность окрашивания антителами, а на оси Y показано количество клеток.

На фигуре 5 показан анализ на цитотоксичность CD33- и CLL1-CAR-T *in vitro*.

Антитела против CAR-T CD33 и CAR-T CLL1 инкубировали с клетками дикого типа (WT), CD33<sup>-/-</sup>, CLL1<sup>-/-</sup> и CD33<sup>-/-</sup>CLL1<sup>-/-</sup>-клетками HL-60 и оценивали цитотоксичность методом проточной цитометрии. Нетрансдуцированные Т-клетки использовали в качестве CAR-T-контроля. Группа CARpool состояла из объединенной комбинации 1:1 антител против CD33 и CLL1 CAR-T-клеток. При этом, использовали t-критерий Стьюдента. ns=не значимые; \*P < 0,05; \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001. На оси Y показан процент специфического цитолиза.

На фигуре 6 показана эффективность редактирования генов CD34<sup>+</sup>-клеток. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием белка Cas9 и гРНК, нацеленных на CD33, CD123 или CLL1, по отдельности или в комбинации. Эффективность редактирования локуса CD33, CD123 или CLL1 определяли путем секвенирования по Сэнгеру и с помощью анализа TIDE. На оси Y показана эффективность редактирования (% по TIDE).

На фигурах 7A-7C показано образование *in vitro* колоний CD34<sup>+</sup>-клеток с отредактированным геном. Контрольные клетки или CD33-, CD123-, CLL1-модифицированные CD34<sup>+</sup>-клетки высевали в Methocult через 2 дня после электропорации и оценивали на образование колоний через 14 дней. BFU-E: область дифференцировки ранних клеток-предшественников эритроидного ряда; CFU-GM: колониеобразующая единица гранулоцитов/макрофагов; CFU-GEMM: колониеобразующая единица мультипотентных миелоидных клеток-предшественников (генерируют гранулоциты, эритроциты, моноциты и мегакарициты). Был использован t-критерий Стьюдента.

На фигуре 8 показана частота редактирования генов CD34<sup>+</sup>-клеток. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP), состоящих из белка Cas9 и гРНК, нацеленных на CLL1, как показано на оси X, а их последовательности представлены в Таблице 8. Частоту редактирования локуса CLL1 определяли путем секвенирования по Сэнгеру. На оси Y показана частота редактирования.

На фигуре 9 показана частота редактирования генов CD34<sup>+</sup>-клеток. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием белка Cas9 и гРНК, нацеленных на CLL1, как показано на оси X, а в частности, слева направо, гРНК D, F, G, O2 и P2. Частоту редактирования локуса CLL1 определяли путем секвенирования по Сэнгеру. На оси Y показана частота редактирования. Все гРНК на фигуре 9 давали частоту редактирования ≥ 80%.

На фигуре 10 показано распределение INDEL (инсерций /делций) для человеческих CD34<sup>+</sup>-клеток, отредактированных с использованием гРНК, нацеленных на CLL1, а в частности, гРНК D (вверху слева), гРНК F (в середине слева), гРНК G (внизу слева), гРНК O2 (вверху справа) и гРНК P2 (в середине справа). На оси X указан размер INDEL, а на оси Y указан процент конкретных INDEL в смеси.

На фигуре 11 представлена схема и детальный обзор протокола и экспериментальной процедуры/временной шкалы, использованных для характеристики *in*

*vivo* CLL1-отредактированных HSPC у мышей NBSGW.

На фигурах 12A-12D показано долгосрочное приживление клеточной линии CLL1-отредактированных клеток в костном мозге мышей через 16 недель после приживления неотредактированных контрольных клеток или CLL1-КО-клеток. На фигуре 12A представлены показатели лейкоцитарного химеризма у человека, вычисленные как процент человеческих CD45<sup>+</sup>-клеток (hCD45<sup>+</sup>) в общей популяции CD45<sup>+</sup>-клеток (сумма человеческих и мышинных CD45<sup>+</sup>-клеток) в костном мозге на 16-й неделе после приживления контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-КО-клеток, отредактированных с использованием гРНК F. На фигуре 12B показан процент hCD45<sup>+</sup>-клеток, которые также были позитивными по CD34 человека (hCD34<sup>+</sup>) в костном мозге на 16 неделе после приживления контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-КО-клеток, отредактированных с использованием гРНК F. На фигуре 12C показан процент hCD45<sup>+</sup>-клеток, которые представляют собой В-клетки, Т-клетки, моноциты, нейтрофилы, обычные дендритные клетки (cDC), плазмцитоподобные дендритные клетки (pDC), эозинофилы, базофилы и тучные клетки) в костном мозге на 16-й неделе после приживления контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-КО-клеток, отредактированных с использованием гРНК F. На фигуре 12D показано процентное содержание hCD45<sup>+</sup>-клеток, которые также были количественно определены как CLL1<sup>+</sup>-клетки в костном мозге на 16-й неделе после приживления контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-КО-клеток, отредактированных с использованием гРНК F.

На фигуре 13A показана экспрессия CLL1 на клеточной поверхности *in vitro*, оцененная с помощью FACS, показано сверху вниз: неотредактированные контрольные клетки, CLL1-КО-клетки, отредактированные с использованием гРНК F (частота редактирования 79,2%, оцененная с помощью TIDE), и FMO (интенсивность флуоресценции -1) в качестве контроля. На фигуре 13B показан количественный анализ гранулоцитов, полученных в течение определенного периода времени путем культивирования *in vitro* неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-КО-клеток, отредактированных с использованием гРНК F. На фигуре 13C показан количественный анализ моноцитов, полученных в течение определенного периода времени путем культивирования *in vitro* неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-КО-клеток, отредактированных с использованием гРНК F.

На фигуре 14A показан процент CLL1<sup>+</sup>-гранулоцитов (вверху) или моноцитов (внизу), полученных за определенное время из культивируемых *in vitro* неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-КО-клеток, отредактированных с использованием гРНК F. На фигуре 14B показан процент CD15<sup>+</sup>-клеток (вверху слева) или CD11b<sup>+</sup>-позитивных гранулоцитов (вверху справа) или процент CD14<sup>+</sup>-моноцитов (вверху слева) или CD11b<sup>+</sup>-позитивных моноцитов (внизу справа), количественно определенный на 0, 7 и 14 день после редактирования и культивирования неотредактированных контрольных клеток или CLL1-КО-клеток, отредактированных с использованием гРНК F.



На фигуре 15 показан процент фагоцитоза, оцененный в гранулоцитах (вверху) или в моноцитах (внизу), полученных из неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-KO-клеток, отредактированных с использованием гРНК F.

На Фигуре 16А показано продуцирование IL-6 в пг/мл (справа) или TNF- $\alpha$  в пг/мл (слева) гранулоцитами, полученными из неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-KO-клеток, отредактированных с использованием гРНК F, которые были нестимулированными, либо были стимулированы LPS или R848. На фигуре 16В показано продуцирование IL-6 в пг/мл (справа) или TNF- $\alpha$  в пг/мл (слева) моноцитами, полученными из неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или CLL1-KO-клеток, отредактированных с использованием гРНК F, которые были нестимулированными, либо были стимулированы LPS или R848.

На фигуре 17А-17В показано образование колоний *in vitro* CD34<sup>+</sup>-клеток с отредактированным геном. Контрольные или CLL1-модифицированные CD34<sup>+</sup>-клетки высевали после электропорации и оценивали на образование колоний через 14 дней. BFU-E: область дифференцировки ранних клеток-предшественников эритроидного ряда; CFU-GM: колониеобразующая единица гранулоцитов/макрофагов; CFU-GEMM: колониеобразующая единица мультипотентных миелоидных клеток-предшественников (генерируют гранулоциты, эритроциты, моноциты и мегакариоциты). На Фигуре 17А показано количество колоний BFU-E, CFU-G/M/GM или CFU-GEMM, полученных из неотредактированных клеток (EP ctrl) или CLL1-KO-клеток, отредактированных с использованием гРНК F (частота редактирования 79,2%). На Фигуре 17В показан процент распределение колоний BFU-E, CFU-G/M/GM или CFU-GEMM, полученных из неотредактированных клеток (EP ctrl) или CLL1-KO-клеток, отредактированных с использованием гРНК F.

## **Подробное описание изобретения**

### *Определения*

Используемый здесь термин «связывается», относится к взаимодействию гРНК с доменом-мишенью, а именно, к взаимодействию молекулы гРНК с доменом-мишенью с образованием комплекса. Комплекс может включать две цепи, образующие дуплексную структуру, или три или более цепей, образующих многоцепочечный комплекс. Связывание может представлять собой стадию более сложного процесса, такого как расщепление домена-мишени эндонуклеазой Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК связывается с доменом-мишенью с полной комплементарностью, а в других вариантах осуществления изобретения, гРНК связывается с доменом-мишенью с частичной комплементарностью, например, с одним или более ошибочными спариваниями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, если гРНК связывается с доменом-мишенью, то полный нацеливающий домен образует пары оснований гРНК с доменом-мишенью. В других вариантах осуществления изобретения, только часть домена-мишени и/или только часть нацеливающего домена образуют пары оснований друг с другом. В одном варианте осуществления изобретения, взаимодействие

является достаточным для опосредования события расщепления, опосредованного доменом-мишенью.

Используемый здесь термин «молекула Cas9» означает молекулу или полипептид, которые могут взаимодействовать с гРНК и вместе с гРНК подвергаться хоумингу или локализоваться в сайте, который содержит домен-мишень. Молекулы Cas9 включают природные молекулы Cas9 и сконструированные, измененные или модифицированные молекулы Cas9, которые отличаются, например, по меньшей мере одним аминокислотным остатком от природной молекулы Cas9.

Термины «гРНК» (gRNA) и «гидовая РНК» (guide RNA) используются здесь как синонимы и означают нуклеиновую кислоту, которая способствует специфическому нацеливанию или хоумингу комплекса «гРНК/молекула Cas9» на нуклеиновую кислоту-мишень. гРНК может быть мономолекулярной (имеющей одну молекулу РНК), иногда называемой здесь оцгРНК, или модульной (содержащей более одной, а обычно две отдельные молекулы РНК). гРНК может связываться с доменом-мишенью в геноме клетки-хозяина. гРНК может содержать нацеливающий домен, который может быть частично или полностью комплементарным домену-мишени. гРНК может также содержать «каркасную последовательность» (например, последовательность *tracrRNA*), которая обеспечивает рекрутинг молекулы Cas9 в домен-мишень, связанный с последовательностью гРНК (например, посредством нацеливающего домена последовательности гРНК). Каркасная последовательность может включать по меньшей мере одну структуру «стебель-петля» и обеспечивать рекрутинг эндонуклеазы. Примеры каркасных последовательностей можно найти, например, в публикации Jinek, et al. *Science* (2012) 337(6096):816-821, Ran, et al. *Nature Protocols* (2013) 8:2281-2308, в заявке РСТ № WO2014/093694 и в заявке РСТ № WO2013/176772.

Используемый здесь термин «мутация» означает генетическое изменение (например, инсерцию, делецию или замену) в нуклеиновой кислоте по сравнению с эталонной последовательностью, например, соответствующей нуклеиновой кислотой дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация в гене не нацеливает белок, продуцируемый этим геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок CLL1, не являющийся мишенью, не связывается или связывается на более низком уровне с агентом, нацеленным на CLL1.

«Нацеливающий домен» гРНК комплементарен «домену-мишени» на нуклеиновой кислоте-мишени. Цепь нуклеиновой кислоты-мишени, содержащая нуклеотидную последовательность, комплементарную коровому домену гРНК, называется здесь «комплементарной цепью» нуклеиновой кислоты-мишени. Руководство по выбору нацеливающих доменов можно найти, например, в публикациях Fu Y et al., *Nat Biotechnol* 2014 (doi: 10.1038/nbt.2808) и Sternberg SH et al., *Nature* 2014 (doi: 10.1038/nature13011).

#### Нуклеазы

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки (например, HSC или НРС), описанные в настоящей заявке, получают с использованием описанной здесь

нуклеазы. Примеры нуклеаз включают молекулы Cas (например, Cas9, TALEN, ZFN и мегануклеазы). В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазу используют в комбинации с гРНК CLL1, описанной в настоящей заявке (например, как показано с Таблицах 2, 6 или 8).

### Молекулы Cas9

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК CLL1, описанная в настоящей заявке, образует комплекс с молекулой Cas9. Могут быть использованы различные молекулы Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулу Cas9 выбирают так, чтобы она обладала желаемой РАМ-специфичностью для нацеливания комплекса гРНК/молекула Cas9 на домен-мишень в CLL1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, генетическая модификация клетки также включает введение в клетку одной или более (например, 1, 2, 3 или более) молекул Cas9.

Молекулы Cas9 различных видов могут быть использованы в описанных здесь способах и композициях. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 представляет собой или происходит от *S. pyogenes* (SpCas9), *S. aureus* (SaCas9) или *S. thermophilus*. Дополнительные подходящие молекулы Cas9 включают или происходят от *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* (NmCas9), *Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces* sp., *Cyclophilus denitrificans*, *Aminomonas paucivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides* sp., *Blastopirellula marina*, *Bradyrhizobium* sp., *Brevibacillus Laterosporus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* (CjCas9), *Campylobacter lari*, *Candidatus Puniceispirillum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium matruchos dolichum*, *Gamma proteobacterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Illyobacter polytropus*, *Kingella kingae*, *Lactobacillus crispatus*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeriaceae bacterium*, *Methylocystis* sp., *Methylosinus trichosporium*, *Mobiluncus mulieris*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria* sp., *Neisseria wadsworthii*, *Nitrosomonas* sp., *Parvibaculum lavamentivorans*, *Pasteurella multocida*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum* sp., *Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas* sp., *Sporolactobacillus vineae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus* sp., *Subdoligranulum* sp., *Tistrella mobilis*, *Treponema* sp., или *Verminephrobacter eiseniae*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 представляет собой природную молекулу Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 представляет собой сконструированную, измененную или модифицированную молекулу Cas9, которая отличается, например, по меньшей мере на один аминокислотный остаток от эталонной последовательности, например, наиболее похожей природной молекулы Cas9 или последовательности, представленной в Таблицы 50 заявки WO 2015157070, которая в полном объеме включена в настоящее описание

посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 содержит Cpf1 или его фрагмент или вариант.

Встречающаяся в природе молекула Cas9 обычно состоит из двух частей: части распознавания (REC) и части нуклеазы (NUC); каждая из которых дополнительно содержит домены, описанные, например, в заявке WO 2015157070, например, на фиг. 9А-9В (эта заявка в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

Часть REC состоит из богатой аргинином мостиковой спирали (ВН), домена REC1 и домена REC2. Часть REC, по-видимому, является Cas9-специфическим функциональным доменом. Домен ВН представляет собой длинную альфа-спираль и область, богатую аргинином, и включает аминокислоты 60-93 последовательности Cas9 *S. pyogenes*. Домен REC1 участвует в распознавании дуплекса повтор:антиповтор, например, гРНК или tracrРНК. Домен REC1 содержит два мотива REC1 в положениях аминокислот от 94 до 179 и от 308 до 717 последовательности Cas9 *S. pyogenes*. Эти два домена REC1, хотя и разделены доменом REC2 в линейной первичной структуре, собираются в третичную структуру с образованием домена REC1. Домен REC2 или его части также могут играть определенную роль в распознавании дуплекса повтор:антиповтор. Домен REC2 содержит аминокислоты 180-307 последовательности Cas9 *S. pyogenes*.

Часть NUC содержит домен RuvC (также называемый здесь RuvC-подобным доменом), домен HNH (также называемый здесь HNH-подобным доменом) и РАМ-взаимодействующий (PI) домен. Домен RuvC имеет структурное сходство с членами суперсемейства ретровирусных интеграз и расщепляет одну цепь, например, некомплементарную цепь молекулы нуклеиновой кислоты-мишени. Домен RuvC собран из трех расщепленных мотивов RuvC (RuvC I, RuvCII и RuvCIII, которые специалисты в данной области часто называют доменом RuvCI или N-концевым доменом RuvC, доменом RuvCII и доменом RuvCIII) в положениях аминокислот 1-59, 718-769 и 909-1098, соответственно, последовательности Cas9 *S. pyogenes*. Подобно домену REC1, три мотива RuvC линейно разделены другими доменами в первичной структуре, однако, в третичной структуре три мотива RuvC подвергаются сборке и образуют домен RuvC. Домен HNH имеет структурное сходство с эндонуклеазами HNH и расщепляет одну цепь, например комплементарную цепь молекулы нуклеиновой кислоты-мишени. Домен HNH расположен между мотивами RuvC II-III и включает аминокислоты 775-908 последовательности Cas9 *S. pyogenes*. Домен PI взаимодействует с РАМ молекулы нуклеиновой кислоты-мишени и включает аминокислоты 1099-1368 последовательности Cas9 *S. pyogenes*.

Кристаллические структуры были определены для природных бактериальных молекул Cas9 (Jinek et al., Science, 343(6176): 1247997, 2014) и для Cas9 *S. pyogenes* с гидовой РНК (например, с синтетическим гибридом crРНК и tracrРНК) (Nishimasu et al., Cell, 156:935-949, 2014, и Anders et al., Nature, 2014, doi: 10.1038/nature13579).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9, описанная в настоящей заявке, обладает нуклеазной активностью, например, активностью в

отношении разрыва двойной цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 была модифицирована для инактивации одного из каталитических остатков эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 представляет собой нуклеазу и образует одноцепочечный разрыв. См., например, Dabrowska et al. *Frontiers in Neuroscience* (2018) 12(75). Было показано, что одна или несколько мутаций в каталитических доменах фермента RuvC и HNH могут повысить эффективность Cas9. См., например, Sarai et al. *Currently Pharma. Biotechnol.* (2017) 18(13). В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 связана со вторым доменом, например, доменом, который модифицирует ДНК или хроматин, например, доменом дезаминазы или деметилазы. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, молекулу Cas9 модифицируют для устранения ее эндонуклеазной активности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулу Cas9, описанную в настоящей заявке, вводят вместе с матрицей для репарации по гомологии (HDR). В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанную здесь молекулу Cas9 вводят без матрицы HDR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулу Cas9 модифицируют для повышения специфичности фермента (например, для уменьшения нецелевых эффектов, поддержания надежного расщепления на мишени). В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 представляет собой вариант Cas9 с повышенной специфичностью (например, eSPCas9). См., например, Slaymaker et al. *Science* (2016) 351 (6268): 84-88. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 представляет собой вариант Cas9 с высокой достоверностью (например, SpCas9-HF1). См., например, Kleinstiver et al. *Nature* (2016) 529: 490-495.

Различные молекулы Cas9 известны специалистам в данной области и могут быть получены из различных источников и/или сконструированы/модифицированы для модуляции одной или более активностей или специфичностей ферментов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 была сконструирована/модифицирована для распознавания одной или нескольких последовательностей PAM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 была сконструирована/модифицирована для распознавания одной или нескольких последовательностей PAM, которые отличаются от последовательности PAM, распознаваемой молекулой Cas9 без конструирования/модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 была сконструирована/модифицирована для снижения нецелевой активности фермента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу Cas9, была дополнительно модифицирована для изменения специфичности эндонуклеазной активности (например, снижения нецелевого расщепления, снижения эндонуклеазной активности или времени ее действия в клетках, повышения уровня рекомбинации, опосредуемой гомологией и снижения

степени негомологичного присоединения по концам). См., например, Komor et al. *Cell* (2017) 168: 20-36. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу Cas9, была модифицирована для изменения распознавания PAM эндонуклеазой. Так, например, молекула Cas9 SpCas9 распознает последовательность PAM NGG, тогда как релаксированные варианты SpCas9, содержащие одну или несколько модификаций эндонуклеазы (например, VQR SpCas9, EQR SpCas9, VRER SpCas9), могут распознавать последовательности PAM NGA, NGAG, NGCG. Распознавание PAM модифицированной молекулой Cas9 считается «релаксированным», если молекула Cas9 распознает больше потенциальных последовательностей PAM по сравнению с молекулой Cas9, которая не была модифицирована. Так, например, молекула Cas9 SaCas9 распознает последовательность PAM NNGRRT, тогда как релаксированный вариант SaCas9, содержащий одну или несколько модификаций (например, KKH SaCas9), может распознавать последовательность PAM NNNRRT. В одном примере, молекула Cas9 FnCas9 распознает последовательность PAM NNG, тогда как релаксированный вариант FnCas9, содержащий одну или несколько модификаций эндонуклеазы (например, RHA FnCas9), может распознавать последовательность PAM YG. В одном примере, молекула Cas9 представляет собой эндонуклеазу Cpf1, содержащую замещающие мутации S542R и K607R и распознающую последовательность PAM TYCV. В одном примере, молекула Cas9 представляет собой эндонуклеазу Cpf1, содержащую замещающие мутации S542R, K607R и N552R и распознающую последовательность PAM TATV. См., например, Gao et al. *Nat. Biotechnol.* (2017) 35(8): 789-792.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используется более, чем одна (например, 2, 3 или более) молекула Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна из молекул Cas9 представляет собой фермент Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна из молекул Cas представляет собой фермент Cpf1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна молекула Cas9 происходит от *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна молекула Cas9 происходит от *Streptococcus pyogenes*, и по меньшей мере одна молекула Cas9 происходит от организма, который не является *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 представляет собой редактор оснований. Эндонуклеаза редактора оснований обычно содержит каталитически неактивную молекулу Cas9, связанную с функциональным доменом. См., например, Eid et al. *Biochim. J.* (2018) 475(11): 1955-1964; Rees et al. *Nature Reviews Genetics* (2018) 19:770-788. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каталитически неактивная молекула Cas9 представляет собой dCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эндонуклеаза содержит dCas9, связанную с одним или более доменами ингибитора урацилгликозилазы (UGI). В некоторых вариантах осуществления изобретения, эндонуклеаза содержит dCas9, связанную с редактором адениновых оснований (ABE), например, ABE, происходящим от РНК-адениндезаминазы TadA. В некоторых вариантах

осуществления изобетения, эндонуклеаза содержит dCas9, связанную с ферментом цитидиндезаминазой (например, дезаминазой APOBEC, pmCDA1, индуцированной активацией цитидиндезаминазой (AID)). В некоторых вариантах осуществления изобетения, каталитически неактивная молекула Cas9 имеет пониженную активность и представляет собой nCas9. В некоторых вариантах осуществления изобетения, каталитически неактивная молекула Cas9 (dCas9) присоединена к одному или более доменам ингибитора урацилгликозилазы (UGI). В некоторых вариантах осуществления изобетения, молекула Cas9 содержит nCas9, связанную с редактором адениновых оснований (ABE), например, ABE, происходящим от РНК-адениндезаминазы TadA. В некоторых вариантах осуществления изобетения, молекула Cas9 содержит nCas9, связанную с ферментом цитидиндезаминазой (например, дезаминазой APOBEC, pmCDA1, индуцированной активацией цитидиндезаминазой (AID)).

Примеры редакторов оснований включают, но не ограничиваются ими, BE1, BE2, BE3, HF-BE3, BE4, BE4max, BE4-Gam, YE1-BE3, EE-BE3, YE2-BE3, YEE-CE3, VQR-BE3, VRER-BE3, SaBE3, SaBE4, SaBE4-Gam, Sa(KKH)-BE3, Target-AID, Target-AID-NG, xBE3, eA3A-BE3, BE-PLUS, TAM, CRISPR-X, ABE7.9, ABE7.10, ABE7.10\*, xABE, ABESa, VQR-ABE, VRER-ABE, Sa(KKH)-ABE и CRISPR-SKIP. Дополнительные примеры редакторов оснований можно найти, например, в публикации США № 2018/0312825A1, в публикации США № 2018/0312828A1 и в публикации РСТ № WO 2018/165629A1, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобетения, редактор оснований был дополнительно модифицирован для ингибирования репарации с вырезанием оснований в сайте-мишени и индуцирования репарации ошибочного спаривания в клетках. Любая из описанных здесь молекул Cas9 может быть связана с доменом Gam (белком Ми бактериофага) для защиты молекулы Cas9 от расщепления и экзонуклеазной активности. См., например, Eid et al. *Biochem. J.* (2018) 475(11): 1955-1964.

В некоторых вариантах осуществления изобетения, молекула Cas9 принадлежит к классу 2 эндонуклеаз Cas типа V. Эндонуклеазы Cas класса 2 типа V могут быть дополнительно классифицированы как эндонуклеазы типа V-A, типа V-B, типа V-C и типа V-U. См., например, Stella et al. *Nature Structural and Molecular Biology* (2017). В некоторых вариантах осуществления изобетения, молекула Cas представляет собой эндонуклеазу Cas типа V-A, такую как нуклеаза Cpf1. В некоторых вариантах осуществления изобетения, молекула Cas9 представляет собой эндонуклеазу Cas типа V-B, такую как эндонуклеаза C2c1. См., например, Shmakov et al. *Mol. Cell.* (2015) 60: 385-397. В некоторых вариантах осуществления изобетения, молекула Cas представляет собой Mad7. Альтернативно или дополнительно, молекула Cas9 представляет собой нуклеазу Cpf1 или ее вариант. Как будет понятно специалисту в данной области, нуклеаза Cpf1 также может обозначаться как Cas12a. См., например, Strohkendl et al. *Mol. Cell.* (2018) 71: 1-9. В некоторых вариантах осуществления изобетения, композиция или способ, описанные в настоящей заявке, включают или экспрессируют в клетке-хозяине нуклеазу

Cpf1, происходящую от *Providentia* spp. или *Francisella* spp., *Acidaminococcus* sp. (AsCpf1), *Lachnospiraceae* bacterium (LpCpf1) или *Eubacterium rectale*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая нуклеазу Cpf1, может быть оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу Cpf1, дополнительно модифицируют для изменения активности белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, каталитически неактивные варианты молекул Cas (например, Cas9 или Cas12a) используют в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке. Каталитически неактивный вариант Cpf1 (Cas12a) может быть обозначен dCas12a. Как описано в настоящей заявке, каталитически неактивные варианты Cpf1 могут быть связаны с функциональным доменом с образованием редактора оснований. См., например, Rees et al. *Nature Reviews Genetics* (2018) 19: 770-788. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каталитически неактивная молекула Cas9 представляет собой dCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эндонуклеаза содержит dCas12a, связанную с одним или несколькими доменами ингибитора урацилгликозилазы (UGI). В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 содержит dCas12a, связанную с редактором адениновых оснований (ABE), например, ABE, происходящим от РНК-адениндезаминазы TadA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas содержит dCas12a, связанную с ферментом цитидиндезаминазой (например, деаминазой APOBEC, pmCDA1, индуцированной активацией цитидиндезаминазой (AID)).

Альтернативно или дополнительно, молекула Cas9 может представлять собой эндонуклеазу Cas14 или ее вариант. Эндонуклеазы Cas14 происходят от археобактерий и обычно имеют меньший размер (например, 400-700 аминокислот). Кроме того, эндонуклеазы Cas14 не требуют присутствия последовательности PAM. См., например, Harrington et al. *Science* (2018).

Любая из описанных здесь молекул Cas9 может быть модулирована для регуляции уровней экспрессии и/или активности молекулы Cas9 в нужное время. Так, например, может оказаться предпочтительным повысить уровень экспрессии и/или активности молекулы Cas9 во время определенной фазы (фаз) клеточного цикла. Было продемонстрировано, что уровни репарации на основе гомологии снижаются во время фазы G1 клеточного цикла, а поэтому повышение уровня экспрессии и/или активности молекулы Cas9 во время фазы S, фазы G2 и/или фазы M может повышать уровень репарации на основе гомологии после редактирования эндонуклеазой Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровни экспрессии и/или активности молекулы Cas9 повышаются во время S-фазы, G2-фазы и/или M-фазы клеточного цикла. В одном примере, молекула Cas9 связана с N-концевой областью геминина человека. См., например, Gutschner et al. *Cell Rep.* (2016) 14(6): 1555-1566. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровни экспрессии и/или активности молекулы Cas9



снижаются во время фазы G1. В одном примере, молекула Cas9 модифицирована таким образом, что она имеет пониженную активность во время фазы G1. См., например, Lomova et al. *Stem Cells* (2018).

Альтернативно или дополнительно, любая из описанных здесь молекул Cas9 может быть связана с эпигенетическим модификатором (например, ферментом, модифицирующим хроматин, например, ДНК-метиلاзой, гистон-деацетилазой). См., например, Kungulovski et al. *Trends Genet.* (2016) 32(2):101-113. Молекула Cas9, связанная с эпигенетическим модификатором, может называться «эпиэффектором» и может обеспечивать временную и/или транзистентную эндонуклеазную активность. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 представляет собой dCas9, связанную с модифицирующим хроматин ферментом.

#### *Нуклеазы «цинковые пальцы»*

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки или клеточные популяции, описанные в настоящей заявке, получают с применением технологии «цинковых пальцев» (ZFN). В некоторых вариантах осуществления изобретения, ZFN распознает домен-мишень, описанный в настоящей заявке, например, в Таблице 1. Обычно, геномное редактирование, опосредованное «цинковыми пальцами», включает использование нуклеазы «цинковые пальцы», которая обычно содержит ДНК-связывающий домен с «цинковыми пальцами» и нуклеазный домен. Домен связывания «цинковых пальцев» может быть сконструирован для распознавания и связывания с любым представляющим интерес доменом-мишенью, например, может быть разработан для распознавания последовательности ДНК длиной приблизительно от 3 нуклеотидов до приблизительно 21 нуклеотида или от приблизительно 8 до приблизительно 19 нуклеотидов. Домены, связывающиеся с «цинковыми пальцами», обычно содержат по меньшей мере три области распознавания «цинковых пальцев» (например, области «цинковых пальцев»).

Рестриктирующие эндонуклеазы (рестриктирующие ферменты), способные последовательность-специфически связываться с ДНК (в сайте распознавания) и расщеплять ДНК в сайте связывания или рядом с ним, известны специалистам в данной области и могут быть использованы для образования ZFN в целях их применения при редактировании генома. Так, например, рестриктирующие эндонуклеазы типа IIIS расщепляют ДНК в сайтах, удаленных от сайта распознавания, и имеют отдельные домены связывания и расщепления. В одном примере, домен расщепления ДНК может происходить от эндонуклеазы FokI.

#### **TALEN**

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки или клеточные популяции, описанные в настоящей заявке, получают с применением технологии TALEN. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TALEN распознает домен-мишень, описанный в настоящей заявке, например, в Таблице 1. В основном, TALEN представляют собой сконструированные рестриктирующие ферменты, которые могут специфически

связываться с нужной молекулой ДНК-мишени и расщеплять эту молекулу. TALEN обычно содержит ДНК-связывающий домен эффектора, подобного активатору транскрипции (TALE), связанный с доменом расщепления ДНК. ДНК-связывающий домен может содержать высококонсервативную последовательность из 33-34 аминокислот с дивергентным 2-аминокислотным RVD (повторяющимся вариабельным дипептидным мотивом) в положениях 12 и 13. Мотив RVD определяет специфичность связывания с последовательностью нуклеиновой кислоты и может быть сконструирован для специфического связывания с желаемой последовательностью ДНК. В одном примере, домен расщепления ДНК может происходить от эндонуклеазы FokI. В некоторых вариантах осуществления изобретения, домен FokI функционирует как димер посредством двух конструкций с уникальными ДНК-связывающими доменами для сайтов в геноме-мишени с правильной ориентацией и с нужным расстоянием между ними.

TALEN, специфичный для представляющего интерес гена-мишени, может быть использован внутри клетки для создания двухцепочечного разрыва (DSB). Мутация может быть введена в место разрыва, если механизмы репарации неправильно восстанавливают разрыв посредством негомологичного соединения концов. Так, например, неправильная репарация может привести к мутации со сдвигом рамки считывания. Альтернативно, чужеродная молекула ДНК, имеющая желаемую последовательность, может быть введена в клетку вместе с TALEN. В зависимости от последовательности чужеродной ДНК и хромосомной последовательности, этот процесс может быть применен для исправления дефекта или введения фрагмента ДНК в представляющий интерес ген-мишень, или для введения такого дефекта в эндогенный ген, и тем самым для снижения уровня экспрессии гена-мишени.

Некоторые иллюстративные и неограничивающие варианты эндонуклеаз и нуклеаз, подходящих для их использования вместе с описанными здесь способами получения гидовых РНК и способами генной инженерии были описаны выше. Дополнительные подходящие нуклеазы и варианты нуклеаз будут очевидны для специалистов в данной области исходя из настоящего описания и их знаний в данной области. Настоящее изобретение не ограничивается этими вариантами.

#### Последовательности и конфигурации гРНК

##### Общая конфигурация гРНК

гРНК может содержать ряд доменов. В одном варианте осуществления изобретения, мономолекулярная оцгРНК или химерная гРНК содержит, например, от 5' до 3':

нацеливающий домен (комплементарный или частично комплементарный последовательности нуклеиновой кислоты-мишени в гене-мишени, например, в гене CLL1);

первый комплементарный домен;

связывающий домен;

второй комплементарный домен (который комплементарен первому

комплементарному домену);

проксимальный домен; и  
необязательно хвостовой домен.

Каждый из этих доменов будет более подробно описан ниже.

Нацеливающий домен может содержать нуклеотидную последовательность, которая, например, по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% комплементарна, например, полностью комплементарна последовательности-мишени на нуклеиновой кислоте-мишени. Нацеливающий домен является частью молекулы РНК и, следовательно, обычно содержит урациловое основание (U), в то время как любая ДНК, кодирующая молекулу гРНК, будет содержать тиминное основание (T). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что в одном из вариантов осуществления изобретения, комплементарность нацеливающего домена с последовательностью-мишенью вносит определенный вклад в специфичность взаимодействия комплекса гРНК/молекула Cas9 с нуклеиновой кислотой-мишенью. Очевидно, что в паре нацеливающего домена и последовательности-мишени, урациловые основания в нацеливающем домене будут спариваться с адениновыми основаниями в последовательности-мишени. В одном варианте осуществления изобретения, сам домен-мишень содержит в направлении от 5' до 3': необязательный второй домен и коровый домен. В одном варианте осуществления изобретения, коровый домен полностью комплементарен последовательности-мишени. В одном варианте осуществления изобретения, нацеливающий домен имеет длину от 5 до 50 нуклеотидов. Нацеливающий домен может иметь длину от 15 до 25 нуклеотидов, от 18 до 22 нуклеотидов или от 19 до 21 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий домен имеет длину 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий домен имеет длину от 10 до 30 или от 15 до 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий домен содержит коровый домен и второй нацеливающий домен, например, как описано в Международной заявке WO2015157070, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. В одном варианте осуществления изобретения, коровый домен содержит от приблизительно 8 до приблизительно 13 нуклеотидов у 3'-конца нацеливающего домена (например, наибольшее количество нуклеотидов от 8 до 13 нуклеотидов нацеливающего домена у 3'-конца). В одном варианте осуществления изобретения, второй домен расположен у 5'-конца от корового домена. Во многих вариантах осуществления изобретения, коровый домен имеет точную комплементарность соответствующей области последовательности-мишени. В других вариантах осуществления изобретения, коровый домен может иметь 1 или более нуклеотидов, не комплементарных соответствующему нуклеотиду последовательности-мишени.

Первый комплементарный домен комплементарен второму комплементарному домену и, в одном варианте осуществления изобретения, имеет комплементарность со

вторым комплементарным доменом, достаточную для образования дуплексной области по меньшей мере в некоторых физиологических условиях. В одном варианте осуществления изобретения, первый комплементарный домен имеет длину от 5 до 30 нуклеотидов. В одном варианте осуществления изобретения, первый комплементарный домен содержит 3 субдомена, которые в направлении от 5' до 3' представляют собой: 5'-субдомен, центральный субдомен и 3'-субдомен. В одном варианте осуществления изобретения, 5'-субдомен имеет длину от 4 до 9, например, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 нуклеотидов. В одном варианте осуществления изобретения, центральный субдомен имеет длину 1, 2 или 3, например, 1 нуклеотид. В одном варианте осуществления изобретения, 3'-субдомен имеет длину от 3 до 25, например, от 4 до 22, от 4 до 18, или от 4 до 10, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Первый комплементарный домен может быть гомологичен природному первому комплементарному домену, или он может происходить от него. В одном варианте осуществления изобретения, он имеет по меньшей мере 50% гомологию с первым комплементарным доменом *S. pyogenes*, *S. aureus* или *S. thermophilus*.

Последовательность и размещение вышеупомянутых доменов более подробно описаны в заявке WO 2015157070, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки, включая стр. 88-112.

Связывающий домен служит для связывания первого комплементарного домена со вторым комплементарным доменом мономолекулярной гРНК. Связывающий домен может связываться с первым и вторым комплементарным доменом ковалентно или нековалентно. В одном варианте осуществления изобретения, эта связь является ковалентной. В одном варианте осуществления изобретения, связывающий домен представляет собой или содержит ковалентную связь, расположенную между первым комплементарным доменом и вторым комплементарным доменом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий домен содержит один или более, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерный домен содержит по меньшей мере одну ненуклеотидную связь, например, как описано в заявке WO 2018126176, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Второй комплементарный домен комплементарен, по меньшей мере частично, первому комплементарному домену, и в одном варианте осуществления изобретения, имеет комплементарность со вторым комплементарным доменом, достаточную для образования дуплексной области по меньшей мере в некоторых физиологических условиях. В одном варианте осуществления изобретения, второй комплементарный домен может включать последовательность, которая не комплементарна первому комплементарному домену, например, последовательность, которая выходит из дуплексной области. В одном варианте осуществления изобретения, второй комплементарный домен имеет длину от 5 до 27 нуклеотидов. В одном варианте осуществления изобретения, второй комплементарный домен имеет длину больше, чем

длина первой комплементарной области. В одном варианте осуществления изобретения, комплементарный домен имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В одном варианте осуществления изобретения, второй комплементарный домен содержит 3 субдомена, которые, в направлении от 5' к 3', представляют собой: 5'-субдомен, центральный субдомен и 3'-субдомен. В одном варианте осуществления изобретения, 5'-субдомен имеет длину от 3 до 25, например, от 4 до 22, от 4 до 18, или от 4 до 10, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В одном варианте осуществления изобретения, центральный субдомен имеет длину 1, 2, 3, 4 или 5, например, 3 нуклеотида. В одном варианте осуществления изобретения, 3'-субдомен имеет длину от 4 до 9, например, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 нуклеотидов. В одном варианте осуществления изобретения, 5'-субдомен и 3'-субдомен первого комплементарного домена соответственно комплементарны, например, полностью комплементарны 3'-субдомену и 5'-субдомену второго комплементарного домена.

В одном варианте осуществления изобретения, длина проксимального домена составляет от 5 до 20 нуклеотидов. В одном варианте осуществления изобретения, проксимальный домен может иметь гомологию с природным проксимальным доменом или может происходить от него. В одном варианте осуществления изобретения, он имеет по меньшей мере 50% гомологию с проксимальным доменом *S. pyogenes*, *S. aureus* или *S. thermophilus*.

Широкий спектр хвостовых доменов является подходящим для использования в гРНК. В одном варианте осуществления изобретения, хвостовой домен имеет длину 0 (отсутствует), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотиды хвостового домена происходят от последовательности, расположенной у 5'-конца природного хвостового домена или имеют гомологию с этой последовательностью. В одном варианте осуществления изобретения, хвостовой домен включает последовательности, которые комплементарны друг другу, и которые по меньшей мере в некоторых физиологических условиях образуют дуплексную область. В одном варианте осуществления изобретения, хвостовой домен отсутствует или имеет длину от 1 до 50 нуклеотидов. В одном варианте осуществления изобретения, хвостовой домен может иметь гомологию с природным проксимальным хвостовым доменом или может происходить от него. В одном варианте осуществления изобретения, он имеет по меньшей мере 50% гомологию с хвостовым доменом *S. pyogenes*, *S. aureus* или *S. thermophilus*. В одном варианте осуществления изобретения, хвостовой домен включает нуклеотиды у 3'-конца, которые образуются в результате транскрипции *in vitro* или *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модульная гРНК содержит:

первую цепь, содержащую, например, от 5' до 3':

нацеливающий домен (комплементарный нуклеиновой кислоте-мишени в гене CLL1) и

первый комплементарный домен; и  
 вторую цепь, содержащую предпочтительно от 5' до 3':  
 необязательно, удлинённый 5'-домен;  
 второй комплементарный домен;  
 проксимальный домен; и  
 необязательно хвостовой домен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является химически модифицированной. Так, например, гРНК может содержать одну или более модификаций, выбранных из модификации фосфоротиоатного остова, 2'-О-Ме-модифицированных сахаров (например, на одном или обоих 3'- и 5'-концах), 2'-F-модифицированного сахара, замены сахара рибозы бициклическим нуклеотидом-сEt, 3'-тио-PACE (MSP) или любой их комбинации. Подходящие модификации гРНК описаны, например, в публикациях Rahdar et al. PNAS December 22 2015 112 (51) E7110-E7117 и Hendel et al., Nat Biotechnol. 2015 Sep; 33(9): 985-989, каждая из которых в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанная здесь гРНК содержит один или более 2'-О-метил-3'-фосфотиоатных нуклеотидов, например, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5 или 6 2'-О-метил-3'-фосфотиоатных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК, описанная в настоящей заявке, содержит модифицированные нуклеотиды (например, 2'-О-метил-3'-фосфотиоатные нуклеотиды) в трех концевых положениях и у 5'-конца и/или в трех концевых положениях и у 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК может содержать один или более модифицированных нуклеотидов, например, как описано в Международных заявках WO/2017/214460, WO/2016/089433 и WO/2016/164356, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК, описанная в настоящей заявке, является химически модифицированной. Так, например, гРНК может содержать один или более 2'-О-модифицированных нуклеотидов, например, 2'-О-метилнуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит 2'-О-модифицированный нуклеотид, например, 2'-О-метилнуклеотид у 5'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит 2'-О-модифицированный нуклеотид, например, 2'-О-метилнуклеотид у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит 2'-О-модифицированный нуклеотид, например, 2'-О-метилнуклеотид у 5'- и 3'-концов гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-метил-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца гРНК и третьему нуклеотиду у 5'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-метил-модифицированной по нуклеотиду у 3'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-

метил-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца гРНК, нуклеотиду у 3'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-метил-модифицированной по второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК и по четвертому нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца гРНК не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца гРНК не содержит химически модифицированного сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-метил-модифицированной, по нуклеотиду у 5'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 2'-О-метилнуклеотид содержит фосфатную связь с соседним нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 2'-О-метилнуклеотид содержит фосфотриатную связь с соседним нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 2'-О-метилнуклеотид содержит связь тио-РАСЕ с соседним нуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК может содержать один или более 2'-О-модифицированных и 3'-модифицированных фосфором нуклеотидов, например, 2'-О-метил-3'-фосфотриатный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-фосфотриатный нуклеотид у 5'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-фосфотриатный нуклеотид у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-фосфотриатный нуклеотид у 5'- и 3'-концов гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит остов, в котором один или несколько мостиковых атомов кислорода были заменены атомом серы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфотриат-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца гРНК, по второму нуклеотиду у 5'-конца гРНК и третьему нуклеотиду у 5'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфотриат-модифицированной по нуклеотиду у 3'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфотриат-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца гРНК, по второму

нуклеотиду у 5'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца гРНК, нуклеотиду у 3'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат-модифицированной по второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца гРНК не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид на 3'-конце гРНК не содержит химически модифицированного сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат-модифицированным по нуклеотиду у 5'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца гРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК может содержать один или более 2'-О-модифицированных и 3'-модифицированных фосфором нуклеотидов, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-нуклеотид у 5'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-нуклеотид у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-нуклеотид у 5'- и 3'-концов гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит остов, в котором один или несколько немостиновых атомов кислорода заменены атомом серы и один или более немостиновых атомов кислорода заменены ацетатной группой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца гРНК, по второму нуклеотиду у 5'-конца гРНК и третьему нуклеотиду у 5'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по нуклеотиду у 3'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца гРНК, по второму нуклеотиду у 5'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца гРНК, нуклеотиду у 3'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по



второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца гРНК не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид на 3'-конце гРНК не содержит химически модифицированного сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца гРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца гРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца гРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца гРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит химически модифицированный остов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более немостиковых атомов кислорода заменены атомом серы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 5'-конца гРНК, второй нуклеотид у 5'-конца гРНК и третий нуклеотид у 5'-конца гРНК содержат фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца гРНК, второй нуклеотид у 3'-конца гРНК и третий нуклеотид у 3'-конца гРНК содержат фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 5'-конца гРНК, второй нуклеотид у 5'-конца гРНК, третий нуклеотид у 5'-конца гРНК, нуклеотид у 3'-конца гРНК, второй нуклеотид у 3'-конца гРНК, и третий нуклеотид у 3'-конца гРНК содержат фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй нуклеотид у 3'-конца гРНК, третий нуклеотид у 3'-конца гРНК и четвертый нуклеотид у 3'-конца гРНК содержат фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 5'-конца гРНК, второй нуклеотид у 5'-конца гРНК, третий нуклеотид у 5'-конца гРНК, второй нуклеотид у 3'-конца гРНК, третий нуклеотид у 3'-конца гРНК и четвертый нуклеотид у 3'-конца гРНК содержат фосфоротиоатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит тио-РАСЕ-связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК содержит остов, в котором один или более немостиковых атомов кислорода заменены атомом серы и один или более немостиковых атомов кислорода заменены ацетатной группой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 5'-конца гРНК, второй нуклеотид у 5'-конца гРНК и третий нуклеотид у 5'-конца гРНК содержат тио-РАСЕ-связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца гРНК, второй нуклеотид у 3'-конца гРНК и третий нуклеотид у 3'-конца гРНК содержат тио-РАСЕ-связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 5'-конца гРНК, второй нуклеотид у 5'-конца гРНК, третий нуклеотид у 5'-конца гРНК, нуклеотид у 3'-конца гРНК, второй нуклеотид у 3'-конца гРНК, и третий нуклеотид у 3'-конца гРНК содержат тио-РАСЕ-связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй нуклеотид у 3'-конца

гРНК, третий нуклеотид у 3'-конца гРНК и четвертый нуклеотид у 3'-конца гРНК содержат тио-РАСЕ-связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 5'-конца гРНК, второй нуклеотид у 5'-конца гРНК, третий нуклеотид у 5'-конца гРНК, второй нуклеотид у 3'-конца гРНК, третий нуклеотид у 3'-конца гРНК и четвертый нуклеотид у 3'-конца гРНК содержат тио-РАСЕ-связь.

Некоторые иллюстративные, но не ограничивающие варианты модификаций, например, химических модификаций, подходящих для использования в комбинации с описанными здесь гидовыми РНК и способами генной инженерии, описаны выше. Дополнительные подходящие модификации, например, химические модификации, будут очевидны для специалистов в данной области исходя из описания изобретения и знаний в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, модификации, описанные в публикации Hendel, A. et al., Nature Biotech., 2015, Vol. 33, № 9; в заявках WO/2017/214460; в WO/2016/089433; и/или в WO/2016/164356; которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

#### гРНК, нацеленные на CLL1

В настоящем описании представлен ряд подходящих гРНК, которые могут нацеливать эндонуклеазу на человеческий CLL1. В приведенной ниже Таблице 1 показаны домены-мишени в эндогенном CLL1 человека, которые могут связываться с описанными здесь гРНК.

Таблица 1. В настоящей заявке представлены примеры доменов-мишеней человеческого CLL1, связанных с различными гРНК. Для каждого домена-мишени, первая последовательность представляет собой последовательность ДНК из 20 нуклеотидов, соответствующую последовательности домена-мишени, на которую может быть нацелена подходящая гРНК, которая может содержать эквивалентную последовательность домена-мишени РНК (содержащую нуклеотиды РНК вместо нуклеотидов ДНК в последовательностях, представленных ниже), а вторая последовательность является ее обратным комплементом. Жирным шрифтом указано, что эта последовательность присутствует в последовательности кДНК CLL1 человека, представленной ниже как SEQ ID NO: 31.

| гРНК Name | Последовательности домена-мишени                                                          |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| гРНК А    | <b>CCCAGAAATTGGCAAATTTG</b> (SEQ ID NO: 1)<br>CAAATTTGCCAATTTCTGGG (SEQ ID NO: 11)        |
| гРНК В    | <b>ATTCCAGAACTCCAGTGAGA</b> (SEQ ID NO: 2)<br>TCTCACTGGAGTTCTGGAAT (SEQ ID NO: 12)        |
| гРНК С    | <b>GAGCTATATAGCAAAGAACA</b> (SEQ ID NO: 3)<br>TGTTCTTTGCTATATAGCTC (SEQ ID NO: 13)        |
| гРНК D    | <b>GGTGGCTATTGTTTGCAGTG</b> (SEQ ID NO: 4)<br><b>CACTGCAAACAATAGCCACC</b> (SEQ ID NO: 14) |

|         |                                                                                     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| гРНК E  | TTGTTTGCAGTGTGGTGGAG (SEQ ID NO: 5)<br><b>CTCCACCACACTGCAAACAA</b> (SEQ ID NO: 15)  |
| гРНК F  | TAGCTCACGACATAATTTGG (SEQ ID NO: 6)<br><b>CCAAATTATGTCTGTGAGCTA</b> (SEQ ID NO: 16) |
| гРНК G  | GGCTATTGTTTGCAGTGTGG (SEQ ID NO: 7)<br><b>CCACACTGCAAACAATAGCC</b> (SEQ ID NO: 17)  |
| гРНК H  | GGAGAGGTTCTGATCTTGT (SEQ ID NO: 8)<br><b>ACAAGATCAGGAACCTCTCC</b> (SEQ ID NO: 18)   |
| гРНК I  | <b>TGAATATCTCCAACAAGATC</b> (SEQ ID NO: 9)<br>GATCTTGTTGGAGATATTCA (SEQ ID NO: 19)  |
| гРНК J  | GTTGTAGAGAAATATTTCTC (SEQ ID NO: 10)<br><b>GAGAAATATTTCTCTACAAC</b> (SEQ ID NO: 20) |
| гРНК O2 | <b>ATATAATCAACTCCTCTGCC</b> (SEQ ID NO: 40)<br>GGCAGAGGAGTTGATTATAT (SEQ ID NO: 41) |
| гРНК P2 | AATAGACACTTACCAGGCAG (SEQ ID NO: 42)<br>CTGCCTGGTAAGTGTCTATT (SEQ ID NO: 43)        |

Таблица 2. В настоящей заявке представлены примеры последовательностей доменов-мишеней человеческого CLL1, связанных с различными гРНК. Для каждого домена-мишени, первая последовательность представляет собой последовательность ДНК-мишени, смежную с подходящей PAM в геномной последовательности CLL1 человека, а вторая последовательность представляет собой репрезентативную подходящую гРНК, нацеленную на последовательность домена-мишени.

| гРНК Name | Последовательности                                                          | PAM |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| гРНК A    | CCCAGAAATTGGCAAATTTG (SEQ ID NO: 1)<br>CCCAGAAAUUGGCAAUUUG (SEQ ID NO: 21)  | GGG |
| гРНК B    | ATTCCAGAACTCCAGTGAGA (SEQ ID NO: 2)<br>AUUCCAGAACUCCAGUGAGA (SEQ ID NO: 22) | TGG |
| гРНК C    | GAGCTATATAGCAAAGAACA (SEQ ID NO: 3)<br>GAGCUAUAUAGCAAAGAACA (SEQ ID NO: 23) | AGG |
| гРНК D    | GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4)<br>GGUGGCUAUUGUUUGCAGUG (SEQ ID NO: 24) | TGG |
| гРНК E    | TTGTTTGCAGTGTGGTGGAG (SEQ ID NO: 5)<br>UUGUUUGCAGUGUGGUGGAG (SEQ ID NO: 25) | AGG |
| гРНК F    | TAGCTCACGACATAATTTGG (SEQ ID NO: 6)<br>UAGCUCACGACAUAAUUUGG (SEQ ID NO: 26) | TGG |

|         |                                                                              |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| гРНК G  | GGCTATTGTTTGCAGTGTGG (SEQ ID NO: 7)<br>GGCUAUUGUUUGCAGUGUGG (SEQ ID NO: 27)  | TGG |
| гРНК H  | GGAGAGGTTCCTGATCTTGT (SEQ ID NO: 8)<br>GGAGAGGUUCCUGAUCUUGU (SEQ ID NO: 28)  | TGG |
| гРНК I  | TGAATATCTCCAACAAGATC (SEQ ID NO: 9)<br>UGAAUAUCUCCAACAAGAUC (SEQ ID NO: 29)  | AGG |
| гРНК J  | GTTGTAGAGAAATATTTCTC (SEQ ID NO: 10)<br>GUUGUAGAGAAAUAUUUCUC (SEQ ID NO: 30) | TGG |
| гРНК O2 | ATATAATCAACTCCTCTGCC (SEQ ID NO: 40)<br>AUAUAAUCAACUCCUCUGCC (SEQ ID NO: 44) | TGG |
| гРНК P2 | AATAGACACTTACCAGGCAG (SEQ ID NO: 42)<br>AAUAGACACUUAACAGGCAG (SEQ ID NO: 45) | AGG |

Таблица 6. В настоящей заявке представлены примеры последовательностей доменов-мишеней человеческого CLL1, связанных с различными гРНК. Для каждого домена-мишени представлена последовательность ДНК-мишени, смежная с подходящей РАМ в геномной последовательности CLL1 человека. гРНК, нацеленная на домен-мишень и представленная в настоящей заявке, может содержать эквивалентную последовательность РНК в своем нацеливающем домене.

|        | SEQ ID NO: | Последовательность   | РАМ |
|--------|------------|----------------------|-----|
| гРНК K | 67         | ATGCAGAAGTCAAATTTGAA | AGG |
| гРНК L | 68         | TCAAATTTGACTTCTGCATG | TGG |
| гРНК M | 69         | TTTGACTTCTGCATGTGGAT | AGG |
| гРНК N | 70         | GGATAGGTGAGTGTCTTTTG | TGG |
| гРНК O | 71         | TTCCATCTCACTGGAGTTC  | TGG |
| гРНК P | 72         | TGGGATTTTTTCCATCTCAC | TGG |
| гРНК Q | 73         | ATGGAAAAAATCCCAGAAAT | TGG |
| гРНК R | 74         | ATCCCAGAAATTGGCAAATT | TGG |
| гРНК S | 75         | TCCCAGAAATTGGCAAATTT | GGG |
| гРНК T | 76         | CCCCAAATTTGCCAATTTCT | GGG |
| гРНК U | 77         | TCCCCAAATTTGCCAATTC  | TGG |

|         |     |                      |     |
|---------|-----|----------------------|-----|
| rPHK V  | 78  | ATTGGCAAATTTGGGGAAAA | AGG |
| rPHK W  | 79  | AAAGGTAAGATTTTGAGTTA | TGG |
| rPHK X  | 80  | AGAGGGAGCTGGAGGTGCTG | TGG |
| rPHK Y  | 81  | CTCCAGCTCCCTCTCATGTA | TGG |
| rPHK Z  | 82  | CATACATGAGAGGGAGCTGG | AGG |
| rPHK A1 | 83  | CGCCATACATGAGAGGGAGC | TGG |
| rPHK B1 | 84  | GCTGGACGCCATACATGAGA | GGG |
| rPHK C1 | 85  | TGCTGGACGCCATACATGAG | AGG |
| rPHK D1 | 86  | AGAGTCAGAAACAAGGCTGC | TGG |
| rPHK E1 | 87  | GCACAGAAGAGTCAGAAACA | AGG |
| rPHK F1 | 88  | CTGTGCCTTCTGTTGCTCAT | TGG |
| rPHK G1 | 89  | CCTTCTGTTGCTCATTGGAT | TGG |
| rPHK H1 | 90  | CTTCTGTTGCTCATTGGATT | GGG |
| rPHK I1 | 91  | CCAATCCAATGAGCAACAGA | AGG |
| rPHK J1 | 92  | GCTCATTGGATTGGGAGTCT | TGG |
| rPHK K1 | 93  | ATATAGCTCACGACATAATT | TGG |
| rPHK L1 | 94  | AAGGTAATCTTGTATTCTCT | TGG |
| rPHK M1 | 95  | CAAGGCTTACATTTGTGCTC | TGG |
| rPHK N1 | 96  | ACAAATGTAAGCCTTGTCCA | AGG |
| rPHK O1 | 97  | GTAAGCCTTGTCCAAGGAGA | TGG |
| rPHK P1 | 98  | CTTGTCCAAGGAGATGGATT | TGG |
| rPHK Q1 | 99  | CAAATCCATCTCCTTGGACA | AGG |
| rPHK R1 | 100 | AAGGAGATGGATTTGGCATA | AGG |
| rPHK S1 | 101 | TTATGCCAAATCCATCTCCT | TGG |

|         |     |                      |     |
|---------|-----|----------------------|-----|
| rPHK T1 | 102 | TAAGTGATGATGTCCAAACA | TGG |
| rPHK U1 | 103 | ATGTTTGGACATCATCACTT | AGG |
| rPHK V1 | 104 | TGATGATGTCCAAACATGGC | AGG |
| rPHK W1 | 105 | AACATGGCAGGAGAGTAAAA | TGG |
| rPHK X1 | 106 | TTTTACTCTCCTGCCATGTT | TGG |
| rPHK Y1 | 107 | GCTGGCATTCTGAGCAGCAC | AGG |
| rPHK Z1 | 108 | GTTGTTTATCTTCAACAGGC | TGG |
| rPHK A2 | 109 | TTTTGTTGTTTATCTTCAAC | AGG |
| rPHK B2 | 110 | GATAAACAACAAAAATGCAT | TGG |
| rPHK C2 | 111 | AAAATGCATTGGTAAAGCCC | AGG |
| rPHK D2 | 112 | AGACTATCTGTATTTCTGT  | AGG |
| rPHK E2 | 113 | GGGATTTTATAAATTCCTAC | AGG |
| rPHK F2 | 114 | AGAGTAGATCATATGACTAT | TGG |
| rPHK G2 | 115 | ATAGTCATATGATCTACTCT | GGG |
| rPHK H2 | 116 | AATAGTCATATGATCTACTC | TGG |
| rPHK I2 | 117 | TAGATCATATGACTATTGGC | TGG |
| rPHK J2 | 118 | AGATCATATGACTATTGGCT | GGG |
| rPHK K2 | 119 | CCTGAAGAAGATTCCACTCG | TGG |
| rPHK L2 | 120 | CCACGAGTGGAATCTTCTTC | AGG |
| rPHK M2 | 121 | TTCCACTCGTGGTATGAGAG | TGG |
| rPHK N2 | 122 | ATCCACTCTCATACCACGAG | TGG |
| rPHK Q2 | 123 | AACAAGAATAGACACTTACC | AGG |
| rPHK R2 | 124 | AATTCTTTACTTTCTCTTTC | AGG |
| rPHK S2 | 125 | ATTCTTTACTTTCTCTTCA  | GGG |

|         |     |                       |     |
|---------|-----|-----------------------|-----|
| rPHK T2 | 126 | GACTTAAATAACATGTATTG  | TGG |
| rPHK U2 | 127 | CAATACATGTTATTTAAGTC  | AGG |
| rPHK V2 | 128 | AAGAATGATATGTGAGAAGA  | TGG |
| rPHK W2 | 129 | ATGGCCAATCCAGTGCAGCT  | TGG |
| rPHK X2 | 130 | AGAACCAAGCTGCACTGGAT  | TGG |
| rPHK Y2 | 131 | TATGTAGAACCAAGCTGCAC  | TGG |
| rPHK Z2 | 132 | AGCTTGGTTCTACATATTTT  | AGG |
| rPHK A3 | 133 | GCTTGGTTCTACATATTTTA  | GGG |
| rPHK B3 | 134 | TGGTTCTACATATTTTAGGG  | AGG |
| rPHK C3 | 135 | ACATATTTTAGGGAGGCATG  | AGG |
| rPHK D3 | 136 | TATTTTGAAGATCAGAGATG  | TGG |
| rPHK E3 | 137 | ATCTTCAAAATATCATGATT  | TGG |
| rPHK F3 | 138 | TCTTCAAAATATCATGATT   | GGG |
| rPHK G3 | 139 | TATCATGATTTGGGTTTTCC  | TGG |
| rPHK H3 | 140 | TCTCTTCTTGTTTTACTTCC  | AGG |
| rPHK I3 | 141 | CTGTCCACCTCTTTGCATTA  | AGG |
| rPHK J3 | 142 | CTTAATGCAAAGAGGTGGAC  | AGG |
| rPHK K3 | 143 | CCTCTTTGCATTAAGGTAGT  | TGG |
| rPHK L3 | 144 | ACTACCTTAATGCAAAGAGG  | TGG |
| rPHK M3 | 145 | CCAACCTACCTTAATGCAAAG | AGG |
| rPHK N3 | 146 | TTAAGGTAGTTGGTCCACCT  | TGG |
| rPHK O3 | 147 | GAAGGCTGGCATGACCAAGG  | TGG |
| rPHK P3 | 148 | GAGGAAGGCTGGCATGACCA  | AGG |
| rPHK Q3 | 149 | TTAATGTGTGAGAGGAAGGC  | TGG |

|         |     |                      |     |
|---------|-----|----------------------|-----|
| rPHK R3 | 150 | TTATTTAATGTGTGAGAGGA | AGG |
| rPHK S3 | 151 | AACATTATTTAATGTGTGAG | AGG |
| rPHK T3 | 152 | ATAATGTTTGTTCTCACAGA | AGG |
| rPHK U3 | 153 | TGTTTGTTCTCACAGAAGGT | AGG |
| rPHK V3 | 154 | GTTTGTTCTCACAGAAGGTA | GGG |
| rPHK W3 | 155 | ATTGTGCTTATTTTCATAAT | GGG |
| rPHK X3 | 156 | AATTGTGCTTATTTTCATAA | TGG |
| rPHK Y3 | 157 | GAGTTTTTGGAAGATGGAAA | AGG |
| rPHK Z3 | 158 | AGGTTTGAGTTTTTGGAAGA | TGG |
| rPHK A4 | 159 | CCAAAACTCAAACCTGTGA  | AGG |
| rPHK B4 | 160 | CAAAAACTCAAACCTGTGAA | GGG |
| rPHK C4 | 161 | CCTTCACAGGTTTGAGTTTT | TGG |
| rPHK D4 | 162 | TATTCTAACTTTCCTTCAC  | AGG |
| rPHK E4 | 163 | TCAGAAAATATGTAAGTCAC | TGG |
| rPHK F4 | 164 | CTGGAAGTGGGAGGATGGCT | CGG |
| rPHK G4 | 165 | GAGGTCTGGAAGTGGGAGGA | TGG |
| rPHK H4 | 166 | GAATGAGGTCTGGAAGTGGG | AGG |
| rPHK I4 | 167 | GTCGAATGAGGTCTGGAAGT | GGG |
| rPHK J4 | 168 | AGTCGAATGAGGTCTGGAAG | TGG |
| rPHK K4 | 169 | TCCAGACCTCATTCGACTTC | TGG |
| rPHK L4 | 170 | GCCAGAAGTCGAATGAGGTC | TGG |
| rPHK M4 | 171 | ATCTCGCCAGAAGTCGAATG | AGG |
| rPHK N4 | 172 | ACTCATTTAATTCGTTGGGT | CGG |
| rPHK O4 | 173 | CCAACGAATTAAATGAGTCC | TGG |



|         |     |                      |     |
|---------|-----|----------------------|-----|
| гРНК P4 | 174 | CAGGACTCATTTAATTCGTT | GGG |
| гРНК Q4 | 175 | CCAGGACTCATTTAATTCGT | TGG |
| гРНК R4 | 176 | AATAGGAGTACATCAAAGCC | AGG |
| гРНК S4 | 177 | TGTTTATTTATGTTTACAAT | AGG |

Последовательность кДНК CLL1 (NM\_138337.6) представлена ниже как SEQ ID NO: 31. Подчеркивание, выделение жирным шрифтом или курсивом указывают на области, комплементарные гРНК A, B, C, D, E, F, G, H, I, J или O2 (или их обратный комплемент). Жирным шрифтом и курсивом отмечены участки перекрывания между двумя или более такими областями.

GGCTCATTTGCAGACATATGGGTGATTGGTACAGTAGGTTTATAAACAGAAG  
TTTAAACTTGTAAGCTTAAGCTTCCGTTTATAAACAGAAGTTTAAAATTATAGGTCC  
TGTTTAACATTCAGCTCTGTAACTCACTCATCTTTTTGTGTTTTTACACTTTGTCAAG  
ATTTCTTTACATATTCATCAATGTCTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTCCA  
GAACTCCAGTGAGATGGAAAAAATCCCAGAAATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGCAC  
CTCCAGCTCCCTCTCATGTATGGCGTCCAGCAGCCTTGTTTCTGACTCTTCTGTGCCT  
TCTGTTGCTCATTGGATTGGGAGTCTTGGCAAGCATGTTTCACGTAACCTTGAAGAT  
AGAAATGAAAAAATGAACAACTACAAAACATCAGTGAAGAGCTCCAGAGAAAT  
ATTTCTCTACAACTGATGAGTAACATGAATATCTCCAACAAGATCAGGAACCTCTC  
CACCACACTGCAAACAATAGCCACCAAATTATGTCTGAGCTATATAGCAAAGAAC  
AAGAGCACAAATGTAAGCCTTGTCCAAGGAGATGGATTTGGCATAAGGACAGCTGT  
TATTTCCCTAAGTGATGATGTCCAAACATGGCAGGAGAGTAAATGGCCTGTGCTGCT  
CAGAATGCCAGCCTGTTGAAGATAAACAAACAAAAATGCATTGGAATTTATAAAATC  
CCAGAGTAGATCATATGACTATTGGCTGGGATTATCTCCTGAAGAAGATTCCACTCG  
TGGTATGAGAGTGGATAATATAATCAACTCCTCTGCCTGGGTTATAAGAAACGCACC  
TGACTTAAATAACATGTATTGTGGATATATAAATAGACTATATGTTCAATATTATCA  
CTGCACTTATAAAAAAAGAATGATATGTGAGAAGATGGCCAATCCAGTGCAGCTTG  
GTTCTACATATTTTAGGGAGGCATGAGGCATCAATCAAATACATTTAAGGAGTGTAG  
GGGGTGGGGGTTCTAGGCTATAGGTAAATTTAAATATTTTCTGGTTGACAATTAGTT  
GAGTTTGTCTGAAGACCTGGGATTTTATCATGCAGATGAAACATCCAGGTAGCAAGC  
TTCAGAGAGAATAGACTGTGAATGTTAATGCCAGAGAGGTATAATGAAGCATGTCC  
CACCTCCCCTTTCCATCATGGCCTGAACCCTGGAGGAAGAGGAAGTCCATTTCAGAT  
AGTTGTGGGGGGCCTTCGAATTTTCATTTTCATTTACGTTCTTCCCCTTCTGGCCAAG  
ATTTGCCAGAGGCAACATCAAAAACCAGCAAATTTTAATTTTGTCCCACAGCGTTGC  
TAGGGTGGCATGGCTCCCCATCTCGGGTCCATCCTATACTTCCATGGGACTCCCTAT  
GGCTGAAGGCCTTATGAGTCAAAGGACTTATAGCCAATTGATTGTTCTAGGCCAGGT  
AAGAATGGATATGGACATGCATTTATTACCTCTTAAAATTATTATTTTAAGTAAAAG  
CCAATAAACAAAAACGAAAAGGCAA (SEQ ID NO: 31)

Дополнительная кДНК изоформы CLL1 (ENST00000355690.8) представлена как:

GGAAGAACAGCCTTTCAAATTTGACTTCTGCATGTGGATAGATTTCTTTACAT  
 ATTCATCAATGTCTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTCCAGAACTCCAGTG  
 AGATGGAAAAAATCCCAGAAATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGCACCTCCAGCTCCC  
 TCTCATGTATGGCGTCCAGCAGCCTTGTTTCTGACTCTTCTGTGCCTTCTGTTGCTCA  
 TTGGATTGGGAGTCTTGGCAAGCATGTTTCACGTAACCTTTGAAGATAGAAATGAAAA  
 AAATGAACAAACTACAAAACATCAGTGAAGAGCTCCAGAGAAATATTTCTCTACAA  
 CTGATGAGTAACATGAATATCTCCAACAAGATCAGGAACCTCTCCACCACACTGCA  
 AACAATAGCCACCAAATTATGTCGTGAGCTATATAGCAAAGAACAAGAGCACAAAT  
 GTAAGCCTTGTTCCAAGGAGATGGATTTGGCATAAGGACAGCTGTTATTTCTAAGTG  
 ATGATGTCCAAACATGGCAGGAGAGTAAAATGGCCTGTGCTGCTCAGAATGCCAGC  
 CTGTTGAAGATAAACAACAAAAATGCATTGGAATTTATAAAATCCCAGAGTAGATC  
 ATATGACTATTGGCTGGGATTATCTCCTGAAGAAGATTCCACTCGTGGTATGAGAGT  
 GGATAATATAATCAACTCCTCTGCCTGGGTTATAAGAAACGCACCTGACTTAAATAA  
 CATGTATTGTGGATATATAAATAGACTATATGTTCAATATTATCACTGCACTTATAA  
 AAAAGAATGATATGTGAGAAGATGGCCAATCCAGTGCAGCTTGGTTCTACATATTT  
 TAGGGAGGCATGAGGCATCAATCAAATACATTTAAGGAGTGTAGGGGGGTGGGGGT  
 CTAGGCTATAGGTAAATTTAAATATTTTCTGGTTGACAATTAGTTGAGTTTGTCTGAA  
 GACCTGGGATTTTATCATGCAGATGAAACATCCAGGTAGCAAGCTTCAGAGAGAAT  
 AGACTGTGAATGTTAATGCCAGAGAGGTATAATGAAGCATGTCCACCTCCCACTTT  
 CCATCATGGCCTGAACCCTGGAGGAAGAGGAAGTCCATTCAGATAGTTGTGGGGGG  
 CCTTCGAATTTTCATTTTCATTTACGTTCTTCCCCTTCTGGCCAAGATTTGCCAGAGG  
 CAACATCAAAAACCAGCAAATTTTAATTTTGTCCCACAGCGTTGCTAGGGGTGGCATG  
 GCTCCCCATCTCGGGTCCATCCTATACTTCCATGGGACTCCCTATGGCTGAAGGCCTT  
 ATGAGTCAAAGGACTTATAGCCAATTGATTGTTCTAGGCCAGGTAAGAATGGATAT  
 GGACATGCATTTATTACCTCTTAAAATTATTATTTTAAGTAAAAGCCAATAAACAAA  
 AACGAAAAGGCAA (SEQ ID NO: 46)

Дополнительная кДНК изоформы CLL1 (NM\_001207010.2) представлена как:

CTATTTAGCATTGCTGCTGCCAGCCCCAACCACATTTCTGATTGCCTAGGAAG  
 AACAGCCTTTCAAATTTGACTTCTGCATGTGGATAGATTTCTTTACATATTCATCAAT  
 GTCTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTCCAGAACTCCAGTGAGATGGAAAA  
 AATCCCAGAAATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGCACCTCCAGCTCCCTCTCATGTATG  
 GCGTCCAGCAGCCTTGTTTCTGACTCTTCTGTGCCTTCTGTTGCTCATTGGATTGGGA  
 GTCTTGGCAAGCATGTTTCACGTAACCTTTGAAGATAGAAATGAAAAAATGAACAA  
 ACTACAAAACATCAGTGAAGAGCTCCAGAGAAATATTTCTCTACAACTGATGAGTA  
 ACATGAATATCTCCAACAAGATCAGGAACCTCTCCACCACACTGCAACAATAGCC  
 ACCAAATTATGTCGTGAGCTATATAGCAAAGAACAAGAGCACAAATGTAAGCCTTG  
 TCCAAGGAGATGGATTTGGCATAAGGACAGCTGTTATTTCTAAGTGATGATGTCCA  
 AACATGGCAGGAGAGTAAAATGGCCTGTGCTGCTCAGAATGCCAGCCTGTTGAAGA  
 TAAACAACAAAAATGCATTGGAATTTATAAAATCCCAGAGTAGATCATATGACTATT

GGCTGGGATTATCTCCTGAAGAAGATTCCACTCGTGGTATGAGAGTGGATAATATAA  
TCAACTCCTCTGCCTGGGTATAAGAAACGCACCTGACTTAAATAACATGTATTGTG  
GATATATAAATAGACTATATGTTCAATATTATCACTGCACTTATAAAAAAAGAATGA  
TATGTGAGAAGATGGCCAATCCAGTGCAGCTTGGTTCTACATATTTTAGGGAGGCAT  
GAGGCATCAATCAAATACATTTAAGGAGTGTAGGGGGTGGGGGTCTAGGCTATAG  
GTAAATTTAAATATTTTCTGGTTGACAATTAGTTGAGTTTGTCTGAAGACCTGGGATT  
TTATCATGCAGATGAAACATCCAGGTAGCAAGCTTCAGAGAGAATAGACTGTGAAT  
GTTAATGCCAGAGAGGTATAATGAAGCATGTCCACCTCCCCTTCCATCATGGCC  
TGAACCCTGGAGGAAGAGGAAGTCCATTGAGATAGTTGTGGGGGGCCTTCGAATTT  
TCATTTTCATTTACGTTCTTCCCCTTCTGGCCAAGATTTGCCAGAGGCAACATCAAAA  
ACCAGCAAATTTTAATTTTGTCCACAGCGTTGCTAGGGTGGCATGGCTCCCCATCT  
CGGGTCCATCCTATACTTCCATGGGACTCCCTATGGCTGAAGGCCTTATGAGTCAAA  
GGACTTATAGCCAATTGATTGTTCTAGGCCAGGTAAGAATGGATATGGACATGCATT  
TATTACCTCTTAAAATTATTATTTTAAGTAAAAGCCAATAAACAAAAACGAAAAGGC  
AA (SEQ ID NO: 270)

Дополнительная кДНК изоформы CLL1 (NM\_001300730.2) представлена как:

GGCTCATTTGCAGACATATGGGTGATTGGTACAGTAGGTTTATAAACAGAAG  
TTTAAACTTGTAAGCTTAAGCTTCCGTTTATAAACAGAAGTTTAAAATTATAGGTCC  
TGTTTAAACATTCAGCTCTGTAACTCACTCATCTTTTTGTGTTTTTACACTTTGTCAAG  
ATTTCTTTACATATTCATCAATGTCTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTCCA  
GAACTCCAGTGAGATGGAAAAAATCCCAGAAATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGCAC  
CTCCAGCTCCCTCTCATGTATGGCGTCCAGCAGCCTTGTTTCTGACTCTTCTGTGCCT  
TCTGTTGCTCATTGGATTGGGAGTCTTGGCAAGCATGTTTCACGTAACCTTTGAAGAT  
AGAAATGAAAAAAATGAACAACTACAAAACATCAGTGAAGAGCTCCAGAGAAAT  
ATTTCTCTACAACCTGATGAGTAACATGAATATCTCCAACAAGATCAGGAACCTCTCC  
ACCACACTGCAAACAATAGCCACCAAATTATGTCGTGAGCTATATAGCAAAGAACA  
AGAGCACAAATGTAAGCCTTGTCCAAGGAGATGGATTTGGCATAAGGACAGCTGTT  
ATTTCTTAAGTGATGATGTCCAAACATGGCAGGAGAGTAAAATGGCCTGTGCTGCTC  
AGAATGCCAGCCTGTTGAAGATAAACAACAAAAATGCATTGGAATTTATAAAATCC  
CAGAGTAGATCATATGACTATTGGCTGGGATTATCTCCTGAAGAAGATTCCACTCGT  
GGTATGAGAGTGGATAATATAATCAACTCCTCTGCCTGAAAATATCAAACGAAGAA  
AGAAACCAGAGTCTCAACCTGCTGGACACTATTGGAAGTCCATCATTTAACACGTTT  
TTAGTATATACTTTTAGCAGGAGACAGCTCTGAGTCAACTGTGTTGAGGTGCCACCA  
CAGCGAGTTTAGGCACTCAGATCCCTGCATACTCATCACATTGGGCCATAATGGCAA  
ATAGAATTTTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTGCTTTTTCTTTTACATAGAAATAGTAAGT  
GTAGGAGTGTGGGTCAGAAAGAAAAGGTGGCCCTACCTCTGATGGTTGGCAATGAT  
AGGATACAATGGGAGATAAGCTATCTACAAATGGAGTGGAGAAGGATATATATTTTC  
AAAGGCCTAATTTGTAGTGAAAGACTAGAGACAAAGGTAATGTGTGTGTCAGGAGA  
GAGTACAGATGGAATCTTGTTTTGCAAACGTAGAATATGTATGTGTTTGTAAATTATT  
GCAAATGGAATGGTAATCTATAATGGAATGGAAAACATTGTAGATATTTTCAGTTAT

CAAAAAGAAAAGTATATAATAATTGTATGTATGATATATATATGTGTGTGTGTGTGTATATATATCTTCACTTTATAACTCTGTGTTGTTTTGGGGTTTGTCTGAAAGGGGGTTGTAATAAATGACATCTGTACTATGTCACCACAAATAAATCTCATTCTTAACATTTAATTGATGAACTTA (SEQ ID NO: 271)

Дополнительная кДНК изоформы CLL1 (NM\_201623.4) представлена как:

GGCTCATTTGCAGACATATGGGTGATTGGTACAGTAGGTTTATAAACAGAAGTTTAAACTTGTAAGCTTAAGCTTCCGTTTATAAACAGAAGTTTAAAATTATAGGTCCGTTTAACATTCAGCTCTGTAACTCACTCATCTTTTTGTGTTTTTACACTTTGTCAAGATTTCTTTACATATTCATCAATGTCTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTCCAGAACTCCAGTGAGATGGAAAAAATCCCAGAAATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGTTCACGTAACCTTTGAAGATAGAAATGAAAAAATGAACAACTACAAAACATCAGTGAAAGAGCTCCAGAGAAATATTTCTCTACAACTGATGAGTAACATGAATATCTCCAACAAGATCAGGAACCTCTCCACCACACTGCAAACAATAGCCACCAAATTATGTCGTGAGCTATATAGCAAAGAACAAGAGCACAAATGTAAGCCTTGTTCCAAGGAGATGGATTTGGCA TAAGGACAGCTGTTATTTCTTAAGTGATGATGTCCAAACATGGCAGGAGAGTAAAA TGGCCTGTGCTGCTCAGAATGCCAGCCTGTTGAAGATAAACAACAAAAATGCATTG GAATTTATAAAATCCCAGAGTAGATCATATGACTATTGGCTGGGATTATCTCCTGAA GAAGATTCCACTCGTGGTATGAGAGTGGATAATATAATCAACTCCTCTGCCTGGGT ATAAGAAACGCACCTGACTTAAATAACATGTATTGTGGATATATAAATAGACTATAT GTTCAATATTATCACTGCACTTATAAAAAAGAATGATATGTGAGAAGATGGCCAA TCCAGTGACAGCTTGGTTCTACATATTTTAGGGAGGCATGAGGCATCAATCAAATACA TTTAAGGAGTGTAGGGGGTGGGGGTCTAGGCTATAGGTAAATTTAAATATTTTCTG GTTGACAATTAGTTGAGTTTGTCTGAAGACCTGGGATTTTATCATGCAGATGAAACA TCCAGGTAGCAAGCTTCAGAGAGAATAGACTGTGAATGTTAATGCCAGAGAGGTAT AATGAAGCATGTCCCACCTCCCCTTTCCATCATGGCCTGAACCCTGGAGGAAGAGG AAGTCCATTCAGATAGTTGTGGGGGGCCTTCGAATTTTCATTTTACGTTCTTC CCCTTCTGGCCAAGATTTGCCAGAGGCAACATCAAAAACCAGCAAATTTTAATTTTG TCCCACAGCGTTGCTAGGGTGGCATGGCTCCCCATCTCGGGTCCATCCTATACTTCC ATGGGACTCCCTATGGCTGAAGGCCTTATGAGTCAAAGGACTTATAGCCAATTGATT GTTCTAGGCCAGGTAAGAATGGATATGGACATGCATTTATTACCTCTTAAATTTATT ATTTTAAGTAAAAGCCAATAAACAACGAAAAGGCAA (SEQ ID NO: 272).

#### Композиции из двух гРНК и их применение

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гРНК, описанная в настоящей заявке (например, гРНК, представленная в Таблицах 2, 6 или 8), может быть использована в комбинации со второй гРНК, например, для нацеливания нуклеаз на два сайта в геноме. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения желательно получить гемопоэтическую клетку, дефицитную по CLL1 и по второму антигену клеточной поверхности, специфичному к линии дифференцировки, например, так, чтобы клетка могла быть резистентной к двум агентам: к агенту против CLL1 и к агенту, нацеленному на второй антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, желательно, чтобы было проведено контактирование клетки с двумя различными гРНК, нацеленными на различные области CLL1, в целях создания двух разрывов и делеции между двумя сайтами разрезания. Соответственно, в настоящей заявке представлены различные комбинации гРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, две или более (например, 3, 4 или более) гРНК, описанные в настоящей заявке, представлены в виде смеси. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждая гРНК находится в отдельном контейнере. В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь набор (например, набор, содержащий одну или несколько гРНК, представленных в Таблицах 2, 6 или 8) также содержит молекулу Cas9 или нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая и вторая гРНК представляют собой гРНК, представленные в Таблицах 2, 6, 8, или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и выбранный из: BCMA, CD19, CD20, CD30, ROR1, B7H6, B7H3, CD23, CD38, лектиноподобной молекулы C-типа-1, CS1, IL-5, L1-CAM, PSCA, PSMA, CD138, CD133, CD70, CD7, CD13, NKG2D, лиганда NKG2D, CLEC12A, CD11, CD123, CD56, CD34, CD14, CD66b, CD41, CD61, CD62, CD235a, CD146, CD326, LMP2, CD22, CD52, CD10, CD3/TCR, CD79/BCR и CD26.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и ассоциированный с раком определенного типа, где указанный антиген представляет собой, но не ограничивается ими, CD20, CD22 (неходжкинская лимфома, В-клеточная лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)), CD52 (В-клеточный ХЛЛ), CD33 (острый миелогенный лейкоз (ОМЛ)), CD10 (gp100) (общий (пре-В) острый лимфоцитарный лейкоз и злокачественная меланома), CD3/Т-клеточный рецептор (TCR) (Т-клеточная лимфома и лейкоз), CD79/В-клеточный рецептор (BCR) (В-клеточная лимфома и лейкоз), CD26 (эпителиальные и лимфоидные злокачественные новообразования), человеческий лейкоцитарный антиген (HLA)-DR, HLA-DP и HLA-DQ (лимфоидные злокачественные новообразования), RCAS1 (гинекологические карциномы, билиарные аденокарциномы и протоковые аденокарциномы поджелудочной железы), а также мембранный антиген, специфичный к предстательной железе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и выбранный из: CD7, CD13, CD19, CD22, CD20, CD25, CD32, CD38, CD44, CD45, CD47, CD56, 96, CD117, CD123,

CD135, CD174, CLL-1, фолатного  $\beta$ -рецептора, IL1RAP, MUC1, NKG2D/NKG2DL, TIM-3 или WT1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и выбранный из: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32a, CD32b, CD32c, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66F, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75S, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85C, CD85D, CD85E, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD99R, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD14, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD152, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158b1, CD158b2, CD158d, CD158e1/e2, CD158f, CD158g, CD158h, CD158i, CD158j, CD158k, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210a, CDw210b, CD212, CD213a1, CD213a2, CD215, CD217, CD218a, CD218b, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD252, CD253, CD254, CD256, CD257, CD258, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD272, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD288, CD289, CD290, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300a, CD300c, CD300e, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338,

CD339, CD340, CD344, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD359, CD360, CD361, CD362 или CD363.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и выбранный из: CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (также называемого подгруппой 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектиноподобной молекулы-1 C-типа (CLECL1); варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII); ганглиозида G2 (CD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlep(1-1)Cer); рецептора семейства TNF, ответственного за созревание В-клеток (BCMA), антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAc.alpha.-Ser/Thr)); специфичного для предстательной железы мембранного антигена (PSMA); рецептора-«сироты» 1, подобного тирозинкиназному рецептору 1 (ROR1); Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы рецептора альфа-2 интерлейкина-13 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора интерлейкина 11 альфа (IL-11Ra); антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA); сериновой протеазы 21 (тестизина или PRSS21); рецептора 2 фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR2); антигена Льюиса(Y); CD24; бета-рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR-бета); стадийспецифического эмбрионального антигена-4 (SSEA-4); CD20; фолатного рецептора альфа; тирозин-протеинкиназного рецептора ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, антигена, ассоциированного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простаза; кислой фосфатазы предстательной железы (PAP); мутированного фактора элонгации 2 (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста I (рецептора IGF-I), ангидразы угольной кислоты IX (CAIX), субъединицы протеасомы (просомы, макропаина) бета типа 9 (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); слитого белка онкогена, состоящего из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолога 1 онкогена вируса мышинного лейкоза Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа A (EphA2); фукозил-GM1; адгезивной молекулы сиалил-Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlep(1-1)Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2-ганглиозида (OAcGD2); фолатного рецептора бета; эндотелиального маркера опухоли 1 (TEM1/CD248); антигена, ассоциированного с опухолевым эндотелиальным маркером 7 (TEM7R); клаудина 6 (CLDN6); рецептора тиреотропного гормона (TSHR); рецептора, связанного с G-белком, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D); открытой рамки считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; антигена, специфичного для плаценты 1 (PLAC1); гексасахаридной части гликоцерамида globoH

(GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); рецептора 1 клеточного вируса гепатита А (HAVCR1); адренорецептора бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); рецептора 20, связанного с G-белком (GPR20); комплекса антигена 6 лимфоцитов; локуса K9 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR-гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); антигена рака яичек 1 (NY-ESO-1); антигена рака яичек 2 (LAGE-1a); антигена 1, ассоциированного с меланомой (MAGE-A1), гена 6 варианта транслокации ETS, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-AML); белка спермы 17 (SPA17); антигена семейства X, члена 1A (XAGE1); рецептора 2 клеточной поверхности, связывающегося с ангиопоэтином (Tie 2); антигена-1 меланомы и рака яичек (MAD-CT-1); антигена-2 меланомы и рака яичек (MAD-CT-2); Fos-ассоциированного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутанта p53; простеина; сурвивина; теломеразы; антигена-1 карциномы предстательной железы (PSTA-1 или галектина 8), антигена меланомы, распознаваемого Т-клетками 1 (MelanA или MART1); мутанта крысиной саркомы (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точки разрыва участка транслокации саркомы; ингибитора апоптоза, ассоциированного с меланомой (ML-1AP); ERG (трансмембранной протеазы, слитого гена серина 2 (TMPRSS2) ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); спаренного белка-бокса Pax-3 (PAX3); рецептора андрогена; циклина B1; гомолога, происходящего от нейробластомы, вызываемой онкогенным вирусом птичьего миелоцитоматоза v-мус (MYCN); члена семейства гомологов Ras C (RhoC); белка 2, родственного тирозиназе (TRP-2); цитохрома P450 1B1 (CYP1B1); фактора, подобного CCCTC-связывающему фактору (белка «цинковый палец») (BORIS или компонента регулятора участков импринтинга), антигена плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками 3 (SART3); спаренного белка-бокса Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TES1); специфичной для лимфоцитов протеинтирозинкиназы (LCK); белка киназного якоря 4 (AKAP-4); точки разрыва X синовиальной саркомы 2 (SSX2); рецептора конечных продуктов с повышенным уровнем гликозилирования (RAGE-1); почечного убихитина 1 (RU1); почечного убихитина 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека E6 (HPV E6); вируса папилломы человека E7 (HPV E7); кишечной карбоксиэстеразы; мутированного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; ассоциированного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); члена 2 подсемейства A рецептора, подобного иммуноглобулину лейкоцитов (LILRA2); члена f семейства, подобного молекуле CD300 (CD300LF); члена A семейства 12 доменов лектина C-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка, подобного рецептору гормона муцина, содержащего EGF-подобный модуль 2 (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); белка 5, подобного Fc-рецептору (FCRL5); и полипептида 1, подобного иммуноглобулину лямбда (IGLL1).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет



собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и выбранный из: CD11a, CD18, CD19, CD20, CD31, CD34, CD44, CD45, CD47, CD51, CD58, CD59, CD63, CD97, CD99, CD100, CD102, CD123, CD127, CD133, CD135, CD157, CD172b, CD217, CD300a, CD305, CD317, CD321 и CLL1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и выбранный из: CD123, CLL1, CD38, CD135 (FLT3), CD56 (NCAM1), CD117 (c-KIT), FR  $\beta$  (FOLR2), CD47, CD82, TNFRSF1B (CD120B), CD191, CD96, PTPRJ (CD148), CD70, LILRB2 (CD85D), CD25 (IL2R-альфа), CD44, CD96, лиганда NKG2D, CD45, CD7, CD15, CD19, CD20, CD22, CD37 и CD82.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и выбранный из: CD7, CD11a, CD15, CD18, CD19, CD20, CD22, CD25, CD31, CD34, CD37, CD38, CD44, CD45, CD47, CD51, CD56, CD58, CD59, CD63, CD70, CD82, CD85D, CD96, CD97, CD99, CD100, CD102, CD117, CD120B, CD123, CD127, CD133, CD135, CD148, CD157, CD172b, CD191, CD217, CD300a, CD305, CD317, CD321, CLL1, FR $\beta$  (FOLR2) или лиганда NKG2D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на CD33. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК нацелена на CD123.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, описанную в настоящей заявке (например, гРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая гРНК содержит последовательность, представленную в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 1-10, 40 или 42, а вторая гРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 9, а вторая гРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет

собой гРНК CLL1, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 10, а вторая гРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 11, а вторая гРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая гРНК представляет собой гРНК CLL1, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 12, а вторая гРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая гРНК представляет собой гРНК, описанную в любой из заявок WO2017/066760, WO2019/046285, WO/2018/160768 или в публикации Borot et al. PNAS, June 11 2019, 116 (24) 11978-11987, которые в полном объеме вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Таблица А. Репрезентативные последовательности-мишени CD33 человека. За некоторыми последовательностями-мишенями следует последовательность РАМ, обозначенная в тексте пробелом. Подходящие гРНК, связывающиеся с последовательностями-мишенями, обычно содержат нацеливающий домен, содержащий нуклеотидную последовательность РНК, эквивалентную соответствующей последовательности-мишени (за исключением РАМ).

| Мишень для гРНК    | Последовательности-мишени | SEQ ID NO: |
|--------------------|---------------------------|------------|
| hCD33              | ACCTGTCAGGTGAAGTTCGC TGG  | 178        |
| hCD33              | TGGCCGGGTTCTAGAGTGCC AGG  | 179        |
| hCD33              | GGCCGGGTTCTAGAGTGCCA GGG  | 180        |
| hCD33              | CACCGAGGAGTGAGTAGTCC TGG  | 181        |
| hCD33              | TCCAGCGAACTTCACCTGAC AGG  | 182        |
| CD33 (в интроне 1) | GCTGTGGGGAGAGGGGTTGT      | 183        |
| CD33 (в интроне 1) | CTGTGGGGAGAGGGGTTGTC      | 184        |
| CD33 (в интроне 1) | TGGGGAAACGAGGGTCAGCT      | 185        |
| CD33 (в интроне 1) | GGGCCCCTGTGGGGAAACGA      | 186        |
| CD33 (в интроне 1) | AGGGCCCCTGTGGGGAAACG      | 187        |
| CD33 (в интроне 1) | GCTGACCCTCGTTTCCCCAC      | 188        |
| CD33 (в интроне 1) | CTGACCCTCGTTTCCCCACA      | 189        |
| CD33 (в интроне 1) | TGACCCTCGTTTCCCCACAG      | 190        |
| CD33 (в интроне 1) | CCATAGCCAGGGCCCCTGTG      | 191        |
| CD33 (в интроне 2) | GCATGTGACAGGTGAGGCAC      | 192        |
| CD33 (в интроне 2) | TGAGGCACAGGCTTCAGAAG      | 193        |
| CD33 (в интроне 2) | AGGCTTCAGAAGTGGCCGCA      | 194        |
| CD33 (в интроне 2) | GGCTTCAGAAGTGGCCGCAA      | 195        |
| CD33 (в интроне 2) | GTACCCATGAACTTCCTTG       | 196        |
| CD33 (в интроне 2) | GTGGCCGCAAGGGAAGTTCA      | 197        |

|                    |                                 |     |
|--------------------|---------------------------------|-----|
| CD33 (в интроне 2) | TGGCCGCAAGGGAAGTTCAT            | 198 |
| CD33 (в интроне 2) | GGAAGTTCATGGGTACTGCA            | 199 |
| CD33 (в интроне 2) | TTCATGGGTACTGCAGGGCA            | 200 |
| CD33 (в интроне 2) | CTAAACCCCTCCCAGTACCA            | 201 |
| CD33 (в интроне 1) | CACTCACCTGCCCCACAGCAG           | 202 |
| CD33 (в интроне 1) | CCCTGCTGTGGGCAGGTGAG            | 203 |
| CD33 (в интроне 1) | TGGGCAGGTGAGTGGCTGTG            | 204 |
| CD33 (в интроне 1) | GGTGAGTGGCTGTGGGGAGA            | 205 |
| CD33 (в интроне 1) | GTGAGTGGCTGTGGGGAGAG            | 206 |
| CD33 (экзон 2)     | ATCCATAGCCAGGGCCCCTG            | 207 |
| CD33 (экзон 2)     | TCCATAGCCAGGGCCCCTGT            | 208 |
| CD33 (экзон 2)     | CCATAGCCAGGGCCCCTGTG            | 191 |
| CD33 (экзон 2)     | TCGTTTCCCCACAGGGGCC             | 209 |
| CD33 (экзон 2)     | TGGCTATGGATCCAAATTTC            | 210 |
| CD33 (экзон 2)     | TGGGGAAACGAGGGTCAGCT            | 185 |
| CD33 (экзон 2)     | GGGCCCTGTGGGGAAACGA             | 186 |
| CD33 (экзон 2)     | AGAAATTTGGATCCATAGCC <b>AGG</b> | 211 |
| CD33 (экзон 3)     | ATCCCTGGCACTCTAGAACC CGG        | 212 |
| CD33 (экзон 3)     | CCTCACTAGACTTGACCCAC AGG        | 213 |

#### Клетки, содержащие две или более мутаций

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированная клетка, описанная в настоящей заявке, содержит две или более мутаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированная клетка, описанная в настоящей заявке, содержит две мутации, где первая мутация присутствует в CLL1, а вторая мутация присутствует во втором антигене клеточной поверхности, специфичном к линии дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такая клетка может быть резистентной к двум агентам: агенту против CLL1 и агенту, нацеленному на второй антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такая клетка может быть получена с использованием двух или более гРНК, описанных в настоящей заявке, например, гРНК, представленной в Таблице 2, и второй гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такая клетка может быть получена с использованием двух или более описанных здесь гРНК, например, гРНК, представленной в Таблице 6, и второй гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такая клетка может быть получена с использованием двух или более описанных здесь гРНК, например, гРНК, представленной в Таблице 8, и второй гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка может быть получена с использованием, например, ZFN или TALEN. В настоящей заявке также представлены популяции, содержащие описанные здесь клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая мутация присутствует в гене, кодирующем антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки, например, один из перечисленных в предыдущем разделе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая мутация присутствует в сайте, указанном в Таблице А.

Обычно, мутация, введенная с применением способов и композиций,

представленных в настоящей заявке, например, мутация в гене-мишени, таком как, например, в CLL1 и/или в любом другом гене-мишени, упомянутом в настоящей заявке, приводит к потере функции генного продукта, кодируемого геном-мишенью, например, в случае мутации в гене CLL1, к потере функции белка CLL1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, потеря функции представляет собой снижение уровня экспрессии генного продукта, например снижение до более низкого уровня экспрессии или полное прекращение экспрессии генного продукта. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация приводит к экспрессии нефункционального варианта генного продукта. Так, например, в случае мутации, генерирующей преждевременный стоп-кодон в кодирующей последовательности, усеченный генный продукт, или, в случае мутации, генерирующей нонсенс- или миссенс-мутацию, генный продукт может иметь измененную аминокислотную последовательность, что делает этот генный продукт нефункциональным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, функцией генного продукта является связывание с партнером по связыванию или распознавание партнера по связыванию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, снижение уровня экспрессии продукта гена, например, CLL1, второго антигена клеточной поверхности, специфичного к линии дифференцировки или того и другого, составляет 50% или менее, 40% или менее, 30% или менее, 20% или менее, 10% или менее, 5% или менее, 2% или менее, или 1% или менее от уровня в клетках-аналогах дикого типа или в несконструированных клетках.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% копий CLL1 в популяции клеток, полученных с применением описанных здесь способов и/или композиций, имеют мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% копий второго антигена клеточной поверхности, специфичного к линии дифференцировки, в популяции клеток, имеют мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% копий CLL1 и второго антигена клеточной поверхности, специфичного к линии дифференцировки, в популяции клеток, имеют мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция включает одну или более клеток дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция содержит одну или более клеток, включающих одну копию CLL1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция включает одну или более клеток, которые содержат одну копию второго антигена клеточной поверхности, специфичного для линии дифференцировки, дикого типа.

### Клетки

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетку (например, HSC или НРС), имеющую модификацию CLL1, получают с использованием нуклеазы и/или гРНК, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетку (например, HSC или НРС), имеющую модификацию CLL1 и модификацию второго антигена клеточной поверхности, специфичного для линии дифференцировки, получают с использованием нуклеазы и/или гРНК, описанных в настоящей заявке. Очевидно, что клетка может быть получена путем контактирования самой клетки с нуклеазой и/или гРНК, или клетка может быть дочерней клеткой клетки, которая была подвергнута контактированию с нуклеазой и/или гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанная здесь клетка (например, HSC) способна восстанавливать гемопоэтическую систему индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка, описанная в настоящей заявке (например, HSC), способна выполнять одну или несколько функций (например, все эти функции), а именно: приживание у человека, продуцирование клеток миелоидного происхождения и продуцирование клеток лимфоидного происхождения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка, описанная в настоящей заявке, представляет собой человеческую клетку, имеющую мутацию в экзоне 2 CLL1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка, описанная в настоящей заявке, представляет собой человеческую клетку, имеющую мутацию в экзоне 4 CLL1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток, описанная в настоящей заявке, включает гемопоэтические стволовые клетки (HSC), гемопоэтические клетки-предшественники (НРС) или те и другие (HSPC). В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки представляют собой CD34<sup>+</sup>-клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка содержит только одну генетическую модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка генетически модифицирована только в локусе CLL1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка генетически модифицирована во втором локусе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка не содержит трансгенный белок, например, не содержит CAR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированная клетка, описанная в настоящей заявке, практически не содержит белка CLL1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированная клетка, описанная в настоящей заявке, по существу не содержит белок CLL1 дикого типа, но содержит мутантный белок CLL1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутантный белок CLL1 не связывается с агентом, который нацелен на CLL1, и который может быть использован в терапевтических целях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки представляют собой гемопоэтические клетки, например, гемопоэтические стволовые клетки. Гемопоэтические стволовые клетки (HSC) обычно способны продуцировать как миелоидные, так и

лимфоидные клетки-предшественники, которые в дальнейшем дают начало развитию миелоидных клеток (например, моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, базофилов, дендритных клеток, эритроцитов, тромбоцитов и т.п.) и лимфоидных клеток (например, Т-клеток, В-клеток, NK-клеток), соответственно. HSC характеризуются экспрессией маркера клеточной поверхности CD34 (например, CD34+), который может быть использован для идентификации и/или выделения HSC, и отсутствием маркеров клеточной поверхности, ассоциированных с коммитированием в линию дифференцировки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток, описанная в настоящей заявке, включает множество гемопоэтических стволовых клеток; в некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток, описанная в настоящей заявке, включает множество гемопоэтических клеток-предшественников; а в некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток, описанная в настоящей заявке, включает множество гемопоэтических стволовых клеток и множество гемопоэтических клеток-предшественников.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HSC берут у индивидуума, такого как человек. Способы получения HSC описаны, например, в документе PCT/US2016/057339, который в полном объеме вводится в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, HSC представляют собой HSC периферической крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумами-млекопитающими являются приматы, кроме человека, грызуны (например, мыши или крысы), крупный рогатый скот, свиньи, лошади или домашние животные. В некоторых вариантах осуществления изобретения, HSC берут у человека, такого как человек со злокачественным новообразованием кроветворной системы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, HSC берут у здорового донора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, HSC берут у индивидуума, которому впоследствии будут введены иммунные клетки, экспрессирующие химерные рецепторы. HSC, которые вводят тому же индивидууму, у которого они были взяты, называются аутологичными клетками, тогда как HSC, которые были взяты у индивидуума, не являющимся индивидуумом, которому будут введены эти клетки, называются аллогенными клетками.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% копий CLL1 в популяции клеток имеют мутацию. Так, например, популяция может включать множество различных мутаций CLL1, и каждая мутация из этого множества вносит свой вклад в процент копий CLL1 в популяции клеток, имеющих мутацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессию CLL1 в генетически сконструированной гемопоэтической клетке сравнивают с экспрессией CLL1 в природной гемопоэтической клетке (например, в аналоге дикого типа). В некоторых вариантах осуществления изобретения, генетическая модификация приводит к снижению

уровня экспрессии CLL1 по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% по сравнению с экспрессией CLL1 на природной гемопоэтической клетке (например, аналоге дикого типа). Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, генетически модифицированная гемопоэтическая клетка экспрессирует менее, чем 20%, менее, чем 19%, менее, чем 18%, менее, чем 17%, менее, чем 16%, менее, чем 15%, менее, чем 14%, менее, чем 13%, менее, чем 12%, менее, чем 11%, менее, чем 10%, менее, чем 9%, менее, чем 8%, менее, чем 7%, менее, чем 6%, менее, чем 5%, менее, чем 4%, менее, чем 3%, менее, чем 2%, или менее, чем 1% CLL1 по сравнению с природной гемопоэтической клеткой (например, аналогом дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, генетическая модификация приводит к снижению уровня экспрессии CLL1 дикого типа по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% по сравнению с экспрессией CLL1 дикого типа на природной гемопоэтической клетке (например, аналоге дикого типа). Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, генетически модифицированная гемопоэтическая клетка экспрессирует менее, чем 20%, менее, чем 19%, менее, чем 18%, менее, чем 17%, менее, чем 16%, менее, чем 15%, менее, чем 14%, менее, чем 13%, менее, чем 12%, менее, чем 11%, менее, чем 10%, менее, чем 9%, менее, чем 8%, менее, чем 7%, менее, чем 6%, менее, чем 5%, менее, чем 4%, менее, чем 3%, менее, чем 2%, или менее, чем 1% CLL1 по сравнению с природной гемопоэтической клеткой (например, аналогом дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, генетическая модификация приводит к снижению уровня экспрессии антигена клеточной поверхности, специфичного к линии дифференцировки дикого типа (например, CLL1) по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% по сравнению с подходящим контролем (например, клеткой или множеством клеток). В некоторых вариантах осуществления изобретения, подходящий контроль включает уровень антигена клеточной поверхности, специфичного к линии дифференцировки дикого типа, оцененный или ожидаемый во множестве немодифицированных клеток, взятых у того же индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, подходящий контроль включает уровень антигена клеточной поверхности, специфичного к линии

дифференцировки дикого типа, оцененный или ожидаемый во множестве клеток, взятых у здорового индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, подходящий контроль включает уровень антигена клеточной поверхности, специфичного к линии дифференцировки дикого типа, оцененный или ожидаемый в популяции клеток из пула, взятого у здоровых индивидуумов (например, 10, 20, 50 или 100 человек). В некоторых вариантах осуществления изобретения, подходящий контроль включает уровень антигена клеточной поверхности, специфичного к линии дифференцировки дикого типа, оцененный или ожидаемый у индивидуума, нуждающегося в лечении, описанном в настоящей заявке, например, терапии против CLL1, например, у индивидуума страдающего раком, клетки которого экспрессируют CLL1.

#### Способы лечения и введения

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективное количество CLL1-модифицированных клеток, описанных в настоящей заявке, вводят индивидууму в сочетании с терапией против CLL1, например, против рака, вызываемого CLL1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективное количество клеток, содержащих модифицированный CLL1 и модифицированный второй антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки, вводят в сочетании с терапией против CLL1, например, против рака, вызываемого CLL1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапия против CLL1 включает введение антитела, биспецифического активатора Т-клеток, ADC или иммунной клетки, экспрессирующей CAR.

Очевидно, что если агенты (например, CLL1-модифицированные клетки и терапевтические средства против CLL1) вводят в комбинации, то агент может быть введен в одно и то же время или в разное время с небольшими временными интервалами. Кроме того, эти агенты могут быть смешаны или введены в отдельных объемах. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, комбинированное введение включает введение в рамках одного и того же курса лечения, например, в ходе лечения рака с помощью терапии против CLL1, где индивидууму может быть введено эффективное количество CLL1-модифицированных клеток одновременно или последовательно, например, до, во время или после проведения терапии против CLL1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь агент, нацеленный на CLL1, представляет собой иммунную клетку, экспрессирующую химерный рецептор, содержащий антигенсвязывающий фрагмент (например, одноцепочечное антитело), способный связываться с CLL1. Иммунная клетка может представлять собой, например, Т-клетку (например, CD34<sup>+</sup>-клетку или CD8<sup>+</sup>-Т-клетку) или NK-клетку.

Химерный антигенный рецептор (CAR) может содержать рекомбинантный полипептид, включающий по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, например, происходящий от стимулирующей



молекулы. В одном из вариантов осуществления изобретения, цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или более функциональных сигнальных доменов, происходящих по меньшей мере от одной костимулирующей молекулы, такой как 4-1BB (то есть, CD137), CD27 и/или CD28, или фрагментов этих молекул. Внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR может содержать CLL1-связывающий фрагмент антитела. Фрагмент антитела может содержать одну или более CDR, переменную область (или ее части), константную область (или ее части) или комбинации любых из вышеперечисленных областей.

Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот типичных переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела против человеческого CLL1 представлены ниже. В аминокислотных последовательностях, последовательности CDR показаны жирным шрифтом.

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела против CLL1 (SEQ ID NO: 32)

DIQLQESGPGLVKPSQSLTCSVT**GYSITS**AYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISY  
**DGRNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAKEGDYDVGNY**YAMD  
 YWGQGTSTVTVSS

Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела против CLL1 (SEQ ID NO: 33)

ENVLTQSPAIMASPGKVTMT**CRASSNVISSYV**HWYQQRSGASPKLWIYSTSN  
**LASGV**PARFSGSGSGTSYSLTISVEAEDAATYYC**QQYSGYPL**TFGAGTKLEL

Дополнительные последовательности анти-CLL1 антитела описаны, например, в патенте US8536310, который в полном объеме вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Связывающий фрагмент антитела против CLL1, используемый для конструирования агента, нацеленного на CLL1, как описано в настоящей заявке, может содержать такие же области CDR тяжелой и/или легкой цепи, как и в SEQ ID NO:32 и SEQ ID NO:33. Такие антитела могут содержать варианты аминокислотных остатков в одной или нескольких каркасных областях. В некоторых случаях, фрагмент антитела против CLL1 может содержать переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, которая по меньшей мере на 70% (например, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более) идентична последовательности SEQ ID NO: 32 и/или может содержать переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 70% (например, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более) идентична последовательности SEQ ID NO:33.

Репрезентативные последовательности компонентов химерного рецептора представлены ниже в Таблице 3.

**Таблица 3: Примеры компонентов химерного рецептора**

| Компонент химерного рецептора | Аминокислотная последовательность                               |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Антигенсвязывающий фрагмент   | Легкая цепь-GSTSSGSGKPGSGEGSTKG<br>(SEQ ID NO: 34)-тяжелая цепь |

|                                                                                                                                            |                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Костимулирующий домен 4-1BB                                                                                                                | KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC<br>SCRFPEEEEGGCE (SEQ ID NO: 214)                                                                                    |
| Костимулирующий домен CD28                                                                                                                 | IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP<br>SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLLV<br>TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRR<br>PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID<br>NO: 35)         |
| Костимулирующий домен ICOS<br>(жирный шрифт), трансмембранный<br>домен ICOS (курсив) и часть<br>внеклеточного домена ICOS<br>(подчеркнута) | <u>LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQL</u><br><u>KFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKK</u><br><b>YSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRL</b><br><b>TDVTL</b> (SEQ ID NO: 36)  |
| Костимулирующий домен ICOS                                                                                                                 | CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 37)                                                                                             |
| Химера CD28/ICOS (часть ICOS<br>подчеркнута), включая шарнирный<br>домен (курсив) и трансмембранный<br>домен (жирный шрифт) CD28           | IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP<br>PLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLLV<br><b>TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMFMRV</b><br><u>NTAKKSRLTDVTL</u> (SEQ ID NO: 38)          |
| Трансмембранный домен CD8 $\alpha$<br>курсив) и часть внеклеточного<br>домена CD8 $\alpha$ (подчеркнута)                                   | <u>TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA</u><br><u>AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL</u><br>LLSLVITLYC (SEQ ID NO: 215)                                       |
| Цитоплазматический сигнальный<br>домен CD3 $\zeta$                                                                                         | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG<br>RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKN<br>PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER<br>RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM<br>QALPPR (SEQ ID NO: 39) |

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR содержит костимулирующий домен 4-1BB (например, как показано в Таблице 3), трансмембранный домен CD8 $\alpha$  и часть внеклеточного домена CD8 $\alpha$  (например, как показано в Таблице 3), и цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$  (например, как показано в Таблице 3).

Типичное количество клеток, например, иммунных клеток или гемопоэтических клеток, вводимых млекопитающему (например, человеку), может составлять, например, от одного миллиона до 100 миллиардов клеток; однако, количества ниже или выше этого приблизительного диапазона также входят в объем настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, агент, нацеленный на CLL1, представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). ADC может представлять собой молекулу, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с молекулой токсина или лекарственного средства. Связывание антитела или его фрагмента с соответствующим антигеном позволяет доставлять молекулу токсина или лекарственного средства к клетке, которая презентует антиген на своей поверхности (например, клетке-мишени), что приводит к гибели клетки-мишени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий фрагмент конъюгата антитело-лекарственное средство имеет такие же CDR тяжелой цепи, как и переменная область тяжелой цепи, представленная SEQ ID NO: 32, и такие же CDR легкой цепи, как и переменная область легкой цепи, представленная SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий фрагмент конъюгата «антитело-лекарственное средство» имеет переменную область тяжелой цепи, представленную SEQ ID NO: 32, и такую же переменную область легкой цепи, представленную SEQ ID NO: 33.

Токсины или лекарственные средства, совместимые с конъюгатами антитело-лекарственное средство, известны и будут очевидны для специалистов в данной области. См., например, Peters et al. *Biosci. Rep.*(2015) 35(4): e00225; Beck et al. *Nature Reviews Drug Discovery* (2017) 16:315-337; Marin-Acevedo et al. *J. Hematol. Oncol.*(2018)11: 8; Elgundi et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2017) 122: 2-19.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, конъюгат антитело-лекарственное средство может дополнительно содержать линкер (например, пептидный линкер, такой как расщепляемый линкер), связывающий молекулу антитела и лекарственного средства.

Примеры конъюгатов «антитело-лекарственное средство» включают, но не ограничиваются ими, брентуксимаб ведотин, глембатуумаб ведотин/CDX-011, депатуксизумаб мафодотин/ABT-414, PSMA ADC, полатузумаб ведотин/RG7596/DCDS4501A, денинтузумаб мафодотин/SGN-CD19A, AGS-16C3F, CDX-014, RG7841/DLYE5953A, RG7882/DMUC406A, RG7986/DCDS0780A, SGN-LIV1A, энфортумаб ведотин/ASG-22ME, AG-15ME, AGS67E, телисотузумаб ведотин/ABBV-399, ABBV-221, ABBV-085, GSK1-2, тисотумаб ведотин/HuMax-TF-ADC, HuMax-Ax1-ADC, пинатузумаб ведотин/RG7593/DCDT2980S, лифастузумаб ведотин/RG7599/DNIB0600A, индусатумаб ведотин/MLN-0264/TAK-264, вандортузумаб ведотин/RG70450/DSTP3/RG7458/DMUC5754A, RG7600/DMOT4039A, RG7336/DEDN6526A, ME1547, PF-06263507/ADC 5T4, трастузумаб эмтансин/T-DM1, мирветуксимаб соравтанзин/IMGN853, колтуксимаб равтанзин/SAR3419, наратуксимаб эмтансин/IMGN529, индатуксимаб равтанзин/BT-062, анетумаб равтансин/BAY 94-9343, SAR408701, SAR428926, AMG 224, PCA062, HKT288, LY3076226, SAR566658, лорвотузумаб мертанзин/IMGN901, кантузумаб мертанзин/SB-408075, кантузумаб равтанзин/IMGN242, лапритуксимаб эмтанзин/IMGN289, IMGN388, биватузумаб мертанзин, AVE9633, Biib015, MLN2704, AMG 172, AMG 595, LOP 628, вадастуксимаб талирин/SGN-CLL1A, SGN-CD70A, SGN-CD19B, SGN-CD123A, SGN-CD352A, ровальпитузумаб тезири/SC16LD6.5, SC-002, SC-003, ADCT-301/HuMax-TAC-PBD, ADCT-402, MEDI3726/ADC-401, IMGN779, IMGN632, гемтузумаб озогамицин, инотузумаб озогамицин/CMC-544, PF-06647263, CMD-193, CMB-401, трастузумаб дуокармазин/SYD985, BMS-936561/MDX-1203, сацитузумаб говитекан/IMMU-132, лабетузумаб говитекан/IMMU-130, DS-8201a, U3-1402, милатузумаб

доксорубицин/IMMU-110/hLL1-DOX, BMS-986148, RC48-ADC/гертузумаб-vc-MMAE, PF-06647020, PF-06650808, PF-06664178/RN927C, лупартумаб амадотин/BAY1129980, апрутумаб иксадотин/BAY1187982, ARX788, AGS62P1, XMT-1522, AbGn-107, MEDI4276, DSTA4637S/RG7861. В одном примере, конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой гемтузумаб озогамицин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывание конъюгата антитело-лекарственное средство с эпитопом белка, специфичного к поверхности клеток линии дифференцировки, индуцирует интернализацию конъюгата «антитело-лекарственное средство», и лекарственное средство (или токсин) может высвобождаться внутриклеточно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывание конъюгата антитело-лекарственное средство с эпитопом белка, специфичного к поверхности клеток линии дифференцировки, индуцирует интернализацию токсина или лекарственного средства, что позволяет токсину или лекарственному средству уничтожать клетки, экспрессирующие белок, специфичный к линии дифференцировки (клеток-мишеней). В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывание конъюгата антитело-лекарственное средство с эпитопом белка, специфичного к поверхности клеток линии дифференцировки, индуцирует интернализацию токсина или лекарственного средства, что позволяет регулировать активность клетки, экспрессирующей белок, специфичный к линии дифференцировки (клеток-мишеней). Тип токсина или лекарственного средства, используемого в описанных здесь конъюгатах антитело-лекарственное средство, не ограничивается каким-либо конкретным типом.

#### *Заболевания и/или расстройства, ассоциированные с CLL1*

Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композициям и к способам лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CLL1, или состояния, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CLL1, включая, например, пролиферативное заболевание, такое как рак или злокачественное новообразование (например, злокачественное новообразование кроветворной системы), или предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, злокачественное новообразование кроветворной системы или гематологическое заболевание ассоциируется с экспрессией CLL1. Злокачественное новообразование кроветворной системы было описано как злокачественная аномалия, поражающая гемопоэтические клетки (например, клетки крови, включая клетки-предшественники и стволовые клетки). Примерами злокачественных новообразований кроветворной системы являются, но не ограничиваются ими, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, лейкоз или множественная миелома. Примерами лейкозов являются, но не ограничиваются ими, острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфобластный лейкоз и хронический лимфолейкоз.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, участвующие в

гемопозитическом злокачественном новообразовании, являются резистентными к стандартным или известным терапевтическим средствам, используемым для лечения злокачественного новообразования. Так, например, клетки (например, раковые клетки) могут быть резистентными к химиотерапевтическому агенту и/или к CAR-T-клеткам, используемым для лечения злокачественного новообразования.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). ОМЛ характеризуется как гетерогенное, клональное, неопластическое заболевание, возникающее из трансформированных клеток, которые постепенно приобретают критические генетические изменения, нарушающие ключевые пути регуляции дифференцировки и роста. (Dohner et al., NEJM, (2015) 373:1136). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь предполагают, что в некоторых вариантах осуществления изобретения, CLL1 экспрессируется на клетках миелоидного лейкоза, а также на нормальных миелоидных и моноцитарных предшественниках и является привлекательной мишенью для терапии ОМЛ.

В некоторых случаях, индивидуум может сначала реагировать на терапию (например, при злокачественном новообразовании кроветворной системы), а затем у него может возникнуть рецидив. Любые из описанных здесь способов или популяций генетически сконструированных гемопозитических клеток могут быть применены для уменьшения или предотвращения рецидива злокачественного новообразования кроветворной системы. Альтернативно или дополнительно, любые из описанных здесь способов могут включать введение любой из популяций описанных здесь генетически сконструированных гемопозитических клеток и иммунотерапевтического агента (например, цитотоксического агента), который нацелен на клетки, ассоциированные со злокачественным новообразованием кроветворной системы, и последующее введение одного или более дополнительных иммунотерапевтических средств при рецидивах злокачественного новообразования кроветворной системы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, у индивидуума возникает рецидив или он предрасположен к рецидиву злокачественного новообразования кроветворной системы (например, ОМЛ) после проведения одного или более предшествующих видов лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы, описанные в настоящей заявке, снижают риск рецидива или тяжесть рецидива у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, злокачественное новообразование кроветворной системы или гематологическое расстройство, ассоциированное с CLL1, представляет собой предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз. Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гематологические заболевания, характеризующиеся неупорядоченным и неэффективным кроветворением или кровоснабжением. Таким образом, количество и качество кроветворных клеток необратимо снижаются. У некоторых пациентов с МДС может развиться тяжелая анемия, в то время как у других пациентов, такое заболевание протекает бессимптомно. Схема классификации МДС

известна специалистам в данной области, и установлена в соответствии с критериями, определяющими соотношение или частоту конкретных типов клеток крови, например, миелобластов, моноцитов и предшественников эритроцитов. МДС включает рефрактерную анемию, рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами, рефрактерную анемию с избытком бластов, рефрактерную анемию с избытком бластов на стадии трансформации, хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХМЛ). В некоторых вариантах осуществления избежания, МДС может прогрессировать до острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1: Генетическое редактирование CLL1 в клетках человека

#### *Создание конструкций оцгРНК*

оцгРНК, указанные в Таблице 4, были сконструированы путем мануальной оценки на наличие SpCas9 PAM (5'-NGG-3') в непосредственной близости от области-мишени и расставлены по приоритетам в соответствии с предсказанной специфичностью путем минимизации потенциальных нецелевых участков в геноме человека с помощью алгоритма поиска в режиме онлайн (например, алгоритма Benchling, Doench et al 2016, Hsu et al. 2013). Все сконструированные синтетические оцгРНК были получены с использованием химически модифицированных нуклеотидов в трех концевых положениях на 5'- и 3'-концах. Модифицированные нуклеотиды содержат 2'-О-метил-3'-фосфориоат (сокращенно обозначаемый «ms»), а ms-оцгРНК были очищены с помощью ВЭЖХ. Белок Cas9 был приобретен у Aldervon.

**Таблица 4:** Последовательности доменов-мишеней CLL1 человека, которые могут быть связаны с подходящими гРНК. Соответствующая гРНК обычно содержит нацеливающий домен, который может содержать эквивалентную последовательность РНК.

| Название гРНК | Последовательность                  | PAM | Экзон   |
|---------------|-------------------------------------|-----|---------|
| гРНК А        | CCCAGAAATTGGCAAATTTG (SEQ ID NO: 1) | GGG | Экзон 2 |
| гРНК В        | ATTCCAGAACTCCAGTGAGA (SEQ ID NO: 2) | TGG | Экзон 2 |
| гРНК С        | GAGCTATATAGCAAAGAACA (SEQ ID NO: 3) | AGG | Экзон 4 |
| гРНК D        | GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 4) | TGG | Экзон 4 |
| гРНК E        | TTGTTTGCAGTGTGGTGGAG (SEQ ID NO: 5) | AGG | Экзон 4 |
| гРНК F        | TAGCTCACGACATAATTTGG (SEQ ID NO: 6) | TGG | Экзон 4 |
| гРНК G        | GGCTATTGTTTGCAGTGTGG (SEQ ID NO: 7) | TGG | Экзон 4 |

|        |                                      |     |         |
|--------|--------------------------------------|-----|---------|
| гРНК H | GGAGAGGTTTCCTGATCTTGT (SEQ ID NO: 8) | TGG | Экзон 4 |
| гРНК I | TGAATATCTCCAACAAGATC (SEQ ID NO: 9)  | AGG | Экзон 4 |
| гРНК J | GTTGTAGAGAAATATTTCTC (SEQ ID NO: 10) | TGG | Экзон 4 |

#### *Культивирование человеческих CD34<sup>+</sup>-клеток и электропорация*

Криоконсервированные человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки были приобретены у Nemasare и разморожены в соответствии с инструкциями производителя. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки культивировали в течение 2 дней в среде GMP SCGM (CellGenix), дополненной человеческими цитокинами (Flt3, SCF и TPO, все они были закуплены у Peprotech). Белок Cas9 и ms-оцгРНК (в массовом соотношении 1:1) смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут перед электропорацией. CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с рибонуклеопротеиновым комплексом Cas9 (RNP) с использованием Lonza 4D-Nucleofector и набора P3 Primary Cell Kit (программа CA-137). Клетки культивировали при 37°C до проведения анализа. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью Cellometer и путем окрашивания ViaStain AOPI (Nexcelom Biosciences).

#### *Анализ геномной ДНК*

Геномную ДНК экстрагировали из клеток через 2 дня после электропорации с использованием набора для выделения ДНК prepGEM (ZyGEM). Представляющую интерес геномную область амплифицировали с помощью ПЦР.

ПЦР-ампликоны анализировали путем секвенирования по Сэнгеру (Genewiz), а частоту модификации аллелей вычисляли с использованием TIDE (отслеживания инсерций-делеций по разложению).

#### *Анализ колониеобразующих единиц (KOE) in vitro*

Через два дня после электропорации, 500 CD34<sup>+</sup>-клеток высевали в 1,1 мл метилцеллюлозы (MethoCult H4034 Optimum, Stem Cell Technologies) на 6-луночные планшеты в двух повторностях и культивировали в течение двух недель. Затем колонии подсчитывали и оценивали с помощью StemVision (Stem Cell Technologies).

#### Результаты

Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием белка Cas9 и указанной гРНК, нацеленной на CLL1, как описано выше.

Процент редактирования определяли как % инсерций-делеций (% INDEL) по оценке с помощью TIDE (фигуры 1 и 2С).

Как показано на фигуре 1, гРНК D, F и G показали высокую долю инсерций-делеций в диапазоне приблизительно 80-100% клеток. Для сравнения, гРНК A и H давали гораздо более низкие доли инсерций-делеций в диапазоне приблизительно 10-20% клеток. гРНК B, C, E и I показали промежуточную долю инсерций-делеций в диапазоне приблизительно 30-60% клеток.

гРНК D CLL1 дополнительно использовали для оценки жизнеспособности клеток и

дифференцировки *in vitro* (фигура 2A). Как показано на фигуре 2B, клетки, подверженные электропорации с использованием гРНК D, показали жизнеспособность, сравнимую с жизнеспособностью клеток негативного контроля, через 48 часов после электропорации. Эти клетки также продемонстрировали высокую эффективность редактирования локуса CLL1/CLEC12A с процентом инсерций-делетий приблизительно 70% (фигура 2C). Кроме того, как показано на фигуре 2D, клетки, подвергшиеся электропорации с использованием гРНК D, были способны дифференцироваться *in vitro*. В частности, значительное количество колоний BFU-E и CFU-G/M/GM образовывалось из клеток, в которые вводили гРНК D. Более низкие уровни образования колоний CFU-GEMM также наблюдались в клетках, подвергнутых электропорации с использованием гРНК D.

**Пример 2: Получение и оценка клеток, отредактированных по двум антигенам клеточной поверхности**

*Результаты*

Уровни CD33, CD123 и CLL1 (CLEC12A) на клеточной поверхности определяли в неотредактированных клетках MOLM-13 и в клетках THP-1 (в обеих линиях человеческих клеток ОМЛ) с помощью проточной цитометрии. Клетки MOLM-13 имели высокие уровни CD33 и CD123 и уровни CLL1 от умеренных до низких. Клетки HL-60 имели высокие уровни CD33 и CLL1 и низкие уровни CD123 (фигура 3).

CD33 и CLL1 мутировали в HL-60 с использованием гРНК и Cas9, как описано в настоящей заявке, а затем CD33- и CLL1-модифицированные клетки очищали методом проточной цитометрии и определяли уровни CD33 и CLL1 на клеточной поверхности. Уровни CD33 и CLL1 были высокими в клетках HL-60 дикого типа; редактирование CD33 давало низкие уровни только CD33; редактирование CLL1 давало низкие уровни только CLL1, а редактирование CD33 и CLL1 давало низкие уровни CD33 и CLL1 (фигура 4). Затем, отредактированные клетки тестировали на резистентность к эффекторным клеткам CART с помощью анализа на цитотоксичность *in vitro*, как описано в настоящей заявке. Все четыре типа клеток (дикого типа, CD33<sup>-/-</sup>, CLL1<sup>-/-</sup> и CD33<sup>-/-</sup>CLL1<sup>-/-</sup>) демонстрировали низкие уровни специфического цитолиза в контрольных условиях имитации CAR (фигура 5, крайний левый набор столбцов). CD33-CAR-клетки эффективно уничтожали клетки дикого типа и CLL1<sup>-/-</sup>-клетки, в то время как CD33<sup>-/-</sup>- и CD33<sup>-/-</sup>CLL1<sup>-/-</sup>-клетки продемонстрировали статистически значимую устойчивость к CD33-CAR (фигура 5, второй набор столбцов). CLL1-CAR-клетки эффективно уничтожали клетки дикого типа и CD33<sup>-/-</sup>-клетки, в то время как CLL1<sup>-/-</sup>- и CD33<sup>-/-</sup>CLL1<sup>-/-</sup>-клетки продемонстрировали статистически значимую устойчивость к CLL1-CAR (фигура 5, третий набор столбцов). Пул CD33-CAR- и CLL1-CAR-клеток эффективно уничтожал клетки дикого типа, CD33<sup>-/-</sup>-клетки и CLL1<sup>-/-</sup>-клетки, в то время как CD33<sup>-/-</sup>CLL1<sup>-/-</sup>-клетки продемонстрировали статистически значимую резистентность к пулу CAR-клеток (фигура 5, самый правый набор столбцов). Этот эксперимент показал, что нокаут двух антигенов (CD33 и CLL1) защищает клетки от CAR-клеток, нацеленных на оба антигена. Кроме того, популяция отредактированных клеток содержала достаточно высокую долю клеток, которые были



отредактированы по обоим аллелям обоих антигенов, и имели достаточно низкие уровни антигенов клеточной поверхности, в результате чего была достигнута статистически значимая устойчивость к обоим типам CAR-клеток.

Эффективность редактирования генов в человеческих CD34<sup>+</sup>-клетках определяли количественно с помощью анализа TIDE, как описано в настоящей заявке. В эндогенном локусе CD33 наблюдалась эффективность редактирования приблизительно 70-90%, если CD33 подвергался воздействию отдельно или в комбинации с CD123 или CLL1 (фигура 6, левый график). В эндогенном локусе CD123 наблюдалась эффективность редактирования приблизительно 60%, если CD123 подвергался воздействию отдельно или в комбинации с CD33 или CLL1 (фигура 6, центральный график). В эндогенном локусе CLL1 наблюдалась эффективность редактирования приблизительно 40-70%, если CLL1 подвергался воздействию отдельно или в комбинации с CD33 или CD123 (фигура 6, правый график). Этот эксперимент показал, что человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки могут редактироваться с высокой частотой в двух локусах антигенов клеточной поверхности.

Потенциал дифференцировки человеческих CD34<sup>+</sup>-клеток с отредактированными генами оценивали с помощью анализа на образование колоний, как описано в настоящей заявке. Клетки, отредактированные по CD33, CD123 или CLL1, индивидуально или во всех попарных комбинациях, продуцировали колонии BFU-E, что указывает на то, что эти клетки сохраняют значительный потенциал дифференцировки в этом анализе (фигура 7A). Отредактированные клетки также продуцировали колонии CFU-G/M/GM, что указывает на то, что в этом анализе, клетки сохраняют потенциал дифференцировки, который статистически неотличим от неотредактированного контроля (фигура 7B). Отредактированные клетки также продуцировали детектируемые колонии CFU-GEMM (фигура 7C). Колониеобразующие единицы (КОЕ)-G/M/GM относятся к колониям CFU-G (гранулоцитов), CFU-M (макрофагов) и CFU-GM (гранулоцитов/макрофагов). Колонии CFU-GEMM (гранулоцитов/эритроидов/макрофагов/мегакариоцитов) возникают из менее дифференцированных клеток, являющихся предшественниками клеток, дающих начало колониям CFU-GM. Взятые вместе, анализы на дифференцировку показали, что человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки, отредактированные в двух локусах, сохраняют способность дифференцироваться в клетки различных типов.

#### *Материалы и методы*

##### *Клеточные линии ОМЛ*

Линия клеток ОМЛ человека HL-60 была получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки HL-60 культивировали в модифицированной по способу Исков среде Дульбекко (IMDM, Gibco) с добавлением 20% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки HyClone (GE Healthcare). Линия клеток ОМЛ человека MOLM-13 была получена от AddexBio Technologies. Клетки MOLM-13 культивировали в среде RPMI-1640 (ATCC) с добавлением 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки HyClone (GE Healthcare).

##### *Руководство по получению гидовой РНК*

Все оцгРНК были сконструированы путем мануальной оценки на наличие SpCas9 PAM (5'-NGG-3') в непосредственной близости от области-мишени и расставлены по приоритетам в соответствии с предсказанной специфичностью путем минимизации потенциальных нецелевых участков в геноме человека с помощью алгоритма поиска в режиме онлайн (Benchling, Doench et al 2016, Hsu et al. 2013). Все сконструированные синтетические оцгРНК были приобретены у Synthego и содержали химически модифицированные нуклеотиды в трех концевых положениях на 5'- и 3'-концах. Модифицированные нуклеотиды содержали 2'-О-метил-3'-фосфортиоат (сокращенно обозначаемый «ms»), а ms-оцгРНК очищали с помощью ВЭЖХ. Белок Cas9 был приобретен у Aldervon. Обычно, гРНК, описанные в приведенных здесь примерах, представляют собой оцгРНК, содержащие последовательность нацеливающего домена из 20 нуклеотидов, последовательность повторов crРНК из 12 нуклеотидов, последовательность тетрапетли из 4 нуклеотидов и последовательность tracrРНК из 64 нуклеотидов.

**Таблица 5:** Последовательности доменов-мишеней CD33, CD123 или CLL-1 человека, которые могут связываться с подходящими гРНК. Также представлены соседние последовательности PAM. Подходящая гРНК обычно содержит нацеливающий домен, который может содержать последовательность РНК, эквивалентную последовательности домена-мишени.

| Ген-мишень | Последовательность                          | PAM | Расположение мишени |
|------------|---------------------------------------------|-----|---------------------|
| CD33       | CCCCAGGACTACTCACTCC<br>T<br>(SEQ ID NO: 64) | CGG | Экзон 3 CD33        |
| CD123      | TTTCTTGAGCTGCAGCTGG<br>G<br>(SEQ ID NO: 65) | CGG | Экзон 5 CD123       |
|            | AGTTCCCACATCCTGGTGC<br>G<br>(SEQ ID NO: 66) | GGG | Экзон 6 CD123       |
| CLL1       | GGTGGCTATTGTTTGCAGT<br>G<br>(SEQ ID NO: 4)  | TGG | Экзон 4 CLL1        |

#### *Электропорация клеточной линии ОМЛ*

Белок Cas9 и ms-оцгРНК (в массовом соотношении 1:1) смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут до электропорации. Клетки MOLM-13 и HL-60 подвергали электропорации с рибонуклеопротеиновым комплексом Cas9 (RNP) с использованием системы электропорации MaxCyte ATx с программами TNP-1 и Opt-3, соответственно. Клетки инкубировали при 37°C в течение 5-7 дней до

проведения сортирования методом проточной цитометрии.

#### *Культивирование человеческих CD34<sup>+</sup>-клеток и электропорация*

Криоконсервированные человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки были приобретены у Nemascare и разморожены в соответствии с инструкциями производителя. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки культивировали в течение 2 дней в среде GMP SCGM (CellGenix), дополненной человеческими цитокинами (Flt3, SCF и TPO, все они были закуплены у Peprotech). CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием RNP Cas9 (белка Cas9 и ms-оцгРНК в массовом отношении 1:1) с использованием Lonza 4D-Nucleofector и набора P3 Primary Cell (программа CA-137). Для электропорации, проводимой с использованием двух ms-оцгРНК, добавляли равное количество каждой ms-оцгРНК. Клетки культивировали при 37°C до проведения анализа.

#### *Анализ геномной ДНК*

Геномную ДНК экстрагировали из клеток через 2 дня после электропорации с использованием набора для выделения ДНК prepGEM (ZyGEM). Представляющую интерес геномную область амплифицировали с помощью ПЦР. ПЦР-ампликоны анализировали путем секвенирования по Сэнгеру (Genewiz), а частоту модификации аллелей вычисляли с использованием программы TIDE (отслеживания инсерций-делеций по разложению), доступной в Интернете на сайте [tide.deskgen.com](http://tide.deskgen.com).

#### *Анализ колониеобразующих единиц (KOE) in vitro*

Через два дня после электропорации, 500 CD34<sup>+</sup>-клеток высевали в 1,1 мл метилцеллюлозы (MethoCult H4034 Optimum, Stem Cell Technologies) на 6-луночные планшеты в двух повторностях и культивировали в течение двух недель. Затем колонии подсчитывали и оценивали с помощью StemVision (Stem Cell Technologies).

#### *Проточный цитометрический анализ и сортирование*

Конъюгированные с флуорохромом антитела против человеческого CD33 (P67.6), CD123 (9F5) и CLL1 (REA431) были приобретены у компаний Biolegend, BD Biosciences и Miltenyi Biotec, соответственно. Все антитела тестировали с использованием соответствующих изотипических контролей. Окрашивание клеточной поверхности проводили путем инкубирования клеток со специфическими антителами в течение 30 минут на льду в присутствии человеческого TruStain FcX. Для всех окрашиваний, погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию DAPI (Biolegend). Все образцы были собраны и проанализированы на проточном цитометре Attune NxT (ThermoFisher Scientific) и с помощью программы FlowJo (TreeStar).

Для сортирования методом проточной цитометрии, клетки окрашивали антителами, конъюгированными с флуорохромом, с последующей сортировкой на клеточном сортере MoFlo Astrios Cell Sorter (Beckman Coulter).

#### *CAR-конструкции и продуцирование лентивирусов*

CAR второго поколения были сконструированы для нацеливания на CD33 и CLL-1, за исключением антитела против CD33-CAR-T, используемого в мультиплексном эксперименте по оценке цитотоксичности CD33/CLL-1. Каждый CAR состоял из

внечелочного антигенсвязывающего домена scFv и содержал сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , шарнирные и трансмембранные области CD8 $\alpha$ , костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$ . Последовательность scFv против CD33 была получена из клона P67.6 (Mylotarg), а последовательность scFv против CLL-1 была получена из клона 1075.7. Анти-CD33 антитело имеет ориентацию scFv от тяжелой к легкой цепи, а конструкция CAR против CLL1 имеет ориентацию от легкой к тяжелой цепи. Тяжелая и легкая цепи были соединены линкером (GGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 63). Последовательности кДНК CAR для каждой мишени субклонировали в сайт множественного клонирования экспрессионного вектора pCDH-EF1 $\alpha$ -MCS-T2A-GFP и получали лентивирус в соответствии с протоколом производителя (System Biosciences). Лентивирус может быть получен путем временной трансфекции клеток 293TN (System Biosciences) с использованием липофектамина 3000 (ThermoFisher). Конструкция CAR была получена путем клонирования легкой и тяжелой цепей анти-CD33 scFv (клон My96) в шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен ICOS, сигнальный домен ICOS, сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$  в лентивирусной плазмиде pHIV-Zsgreen.

#### *Трансдукция и размножение CAR-клеток*

Первичные Т-клетки человека выделяли из Leuko Pak (Stem Cell Technologies) путем разделения на магнитных шариках с использованием микрошариков с антителами против CD4 и против CD8 в соответствии с протоколом производителя (Stem Cell Technologies). Очищенные CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки смешивали в отношении 1:1 и активировали с использованием связанных гранул Dynabeads, содержащих антитела против CD3/CD28 (Thermo Fisher) в отношении гранул к клеткам 1:1. Используемая среда для культивирования Т-клеток представляла собой среду для размножения Т-клеток CTS Optimizer, дополненную заменителем сыворотки иммунных клеток, L-глутамином и GlutaMAX (все они были закуплены у Thermo Fisher) и 100 МЕ/мл IL-2 (Peprotech). Трансдукцию Т-клеток проводили через 24 часа после активации путем центрифужной инокуляции в присутствии полибрена (Sigma). CAR-Т-клетки культивировали в течение 9 дней перед криоконсервацией. Перед проведением всех экспериментов, Т-клетки размораживали и выдерживали при 37°C в течение 4-6 часов.

#### *Анализ на цитотоксичность CAR-Т на основе проточной цитометрии*

Цитотоксичность клеток-мишеней определяли путем сравнения выживаемости клеток-мишеней с выживаемостью клеток негативного контроля. Для проведения мультиплексных анализов на цитотоксичность CD33/CLL1, в качестве клеток-мишеней для мультиплексных анализов на цитотоксичность CD33/CLL-1 использовали клетки HL60 дикого типа и отредактированные по CRISPR/Cas9. Линии клеток Raji дикого типа (ATCC) использовали в качестве негативного контроля для обоих экспериментов. Клетки-мишени и клетки негативного контроля окрашивали фиолетовым CellTrace Violet (CTV) и CFSE (Thermo Fisher), соответственно, согласно инструкциям производителя. После окрашивания, клетки-мишени и клетки негативного контроля смешивали в отношении 1:1.

В качестве эффекторных Т-клеток использовали CAR-Т-клетки против CD33 или CLL1. В качестве контроля использовали нетрансдуцированные Т-клетки (ложные CAR-Т). Для групп CARpool, соответствующие CAR-Т-клетки смешивали в отношении 1:1. Эффекторные Т-клетки совместно культивировали со смесью клеток-мишеней/клеток негативного контроля в отношении эффекторных клеток к мишеням 1:1 в двух повторностях. Группа смеси клеток-мишеней/клеток негативного контроля, взятая отдельно без эффекторных Т-клеток, была включена в качестве контроля. Клетки инкубировали при 37°C в течение 24 часов перед проведением проточного цитометрического анализа. Иодид пропидия (ThermoFisher) использовали в качестве красителя на жизнеспособность. Для оценки специфического клеточного лизиса использовали отношение живой клетки-мишени к живой клетке негативного контроля (называемой целевой фракцией). Специфический лизис клеток вычисляли по формуле ((целевая фракция без эффекторных клеток - целевая фракция с эффекторными клетками)/(целевая фракция без эффекторов))  $\times$  100%.

### **Пример 3: Конструирование и скрининг гРНК на редактирование CLL1 в клетках человека**

#### *Создание конструкций оцгРНК*

гРНК, исследуемые в этом примере, были сконструированы путем оценки SpCas9 PAM в непосредственной близости от области-мишени. Были извлечены все последовательности размером 20 п.о. в кодирующей области с SpCas9 PAM (5'-NGG-3') на 3'-конце. С применением этих методов было сконструировано всего 123 гРНК, нацеленных на домены-мишени человеческого CLL1, как описано в Таблицах 2 и 6.

#### *Скрининг гРНК в клетках ТНР-1*

123 гРНК были отфильтрованы в соответствии с алгоритмом предсказания нецелевых участков (исходя из количества ошибочных спариваний), который позволял идентифицировать 66 гРНК для дальнейшего исследования в клетках ТНР-1. Линия клеток ОМЛ человека ТНР-1 была получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки ТНР-1 культивировали и подвергали электропорации с использованием рибонуклеопротеиновых комплексов RNP, состоящих из белка Cas9 и гРНК (смешанных в массовом отношении 1:1). Геномную ДНК экстрагировали из клеток, и представляющую интерес область генома амплифицировали с помощью ПЦР для всех 66 исследованных гРНК. Затем ампликоны ПЦР анализировали путем секвенирования по Сэнгеру для определения частоты редактирования (ICE или интерференции редактирования CRISPR) с двум повторностями, как показано в Таблице 7. В первом повторе, частота редактирования была определена для всех гРНК, которые были амплифицированы и секвенированы. Во втором повторе, частота редактирования была определена для 42/66 гРНК, и результаты для каждой гРНК были сопоставимы в двух повторях. Как показано в Таблице 7, 20 исследованных гРНК имели значение ICE или частоту редактирования  $\geq$  80.

#### **Таблица 7. Частота редактирования гРНК, предназначенных для нацеливания**

## на человеческий CLL1 в клетках ТНР-1

| гРНК    | SEQ ID NO: | Последовательность          | Репликат 1 |                | Репликат 2 |                |
|---------|------------|-----------------------------|------------|----------------|------------|----------------|
|         |            |                             | ICE        | R <sup>2</sup> | ICE        | R <sup>2</sup> |
| гРНК В  | 22         | AUUC CAGA ACUCCAGU<br>GAGA  | 62         | 0,94           | 71         | 0,95           |
| гРНК Q  | 216        | AUGG AAAAAA UCCCAG<br>AAAU  | 37         | 0,97           | 36         | 0,98           |
| гРНК R  | 217        | AUCC CAGAAA UUGGCA<br>AAUU  | 0          | 1              | 4          | 0,99           |
| гРНК S  | 218        | UCC CAGAAA UUGGCAA<br>AUUU  | 21         | 0,98           | 21         | 0,98           |
| гРНК A  | 21         | CCC AGAAA UUGGCAAA<br>UUUG  | 16         | 0,98           | 17         | 0,99           |
| гРНК V  | 219        | AUUG GC AAAU UUGGGG<br>AAAA | 27         | 0,98           | 28         | 0,98           |
| гРНК U  | 220        | UCCCC AAAU UGCCAA<br>UUUC   | 0          | 1              | 0          | 1              |
| гРНК P  | 221        | UGGG AUUUUU UCCAUC<br>UCAC  | 71         | 0,93           | -          | -              |
| гРНК O  | 222        | UUUC CAUCUC ACUGGA<br>GUUC  | 79         | 0,97           | 80         | 0,96           |
| гРНК Y  | 223        | CUCC AGC UCCCUCUCA<br>UGUA  | 95         | 0,95           | 96         | 0,96           |
| гРНК F1 | 224        | CUGUG CCUUCUGUUGC<br>UCAU   | 28         | 0,97           | 42         | 0,96           |
| гРНК G1 | 225        | CCUUCUGUUGC UCAUU<br>GGAU   | 76         | 0,95           | 75         | 0,97           |
| гРНК H1 | 226        | CUUCUGUUGC UCAUUG<br>GAUU   | 73         | 0,96           | 71         | 0,94           |
| гРНК J1 | 227        | GCUCAUUGGAUUGGGA<br>GUCU    | 91         | 0,93           | 94         | 0,94           |
| гРНК I1 | 228        | CCAAUCCAAUGAGCAA<br>CAGA    | 66         | 0,94           | 74         | 0,94           |
| гРНК E1 | 229        | GCACAGAAGAGUCAGA            | 89         | 0,97           | 91         | 0,97           |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | AACA                     |    |      |    |      |
| rPHK D1 | 230 | AGAGUCAGAAACAAGG<br>CUGC | 28 | 0,98 | 29 | 0,97 |
| rPHK C1 | 231 | UGCUGGACGCCAUACA<br>UGAG | 88 | 0,94 | 90 | 0,94 |
| rPHK B1 | 232 | GCUGGACGCCAUACAU<br>GAGA | 81 | 0,94 | 84 | 0,93 |
| rPHK A1 | 233 | CGCCAUACAUGAGAGG<br>GAGC | 56 | 0,95 | 63 | 0,96 |
| rPHK Z  | 234 | CAUACAUGAGAGGGAG<br>CUGG | 80 | 0,94 | 83 | 0,94 |
| rPHK X  | 235 | AGAGGGAGCUGGAGGU<br>GCUG | 96 | 0,96 | 95 | 0,96 |
| rPHK I  | 29  | UGAAUAUCUCCAACAA<br>GAUC | 78 | 0,95 | 76 | 0,95 |
| rPHK C  | 23  | GAGCUAUAUAGCAAAG<br>AACA | 81 | 0,95 | 85 | 0,96 |
| rPHK K1 | 236 | AUAUAGCUCACGACAU<br>AAUU | 55 | 0,98 | 53 | 0,97 |
| rPHK F  | 26  | UAGCUCACGACAUAAU<br>UUGG | 94 | 0,97 | 95 | 0,98 |
| rPHK D  | 24  | GGUGGCUAUUGUUUGC<br>AGUG | 86 | 0,95 | 85 | 0,92 |
| rPHK G  | 27  | GGCUAUUGUUUGCAGU<br>GUGG | 94 | 0,97 | 95 | 0,96 |
| rPHK E  | 25  | UUGUUUGCAGUGUGGU<br>GGAG | 50 | 0,97 | 51 | 0,97 |
| rPHK H  | 28  | GGAGAGGUUCCUGAUC<br>UUGU | 83 | 0,95 | 82 | 0,95 |
| rPHK J  | 30  | GUUGUAGAGAAAUAUU<br>UCUC | 84 | 0,96 | 88 | 0,96 |
| rPHK N1 | 237 | ACAAAUGUAAGCCUUG<br>UCCA | 42 | 0,96 | 86 | 0,96 |
| rPHK O1 | 238 | GUAAGCCUUGUCCAAG         | 77 | 0,97 | 58 | 0,96 |

|         |     |                           |    |      |    |      |
|---------|-----|---------------------------|----|------|----|------|
|         |     | GAGA                      |    |      |    |      |
| rPHK P1 | 239 | CUUGUCCAAGGAGAUG<br>GAUU  | 93 | 0,96 | 94 | 0,94 |
| rPHK R1 | 240 | AAGGAGAUGGAUUUGG<br>CAUA  | 57 | 0,92 | 59 | 0,93 |
| rPHK T1 | 241 | UAAGUGAUGAUGUCCA<br>AACA  | 36 | 0,97 | 41 | 0,97 |
| rPHK V1 | 242 | UGAUGAUGUCCAAACA<br>UGGC  | 60 | 0,96 | 59 | 0,96 |
| rPHK W1 | 243 | AACAUGGCAGGAGAGU<br>AAAA  | 58 | 0,96 | 66 | 0,97 |
| rPHK B2 | 244 | GAUAAACAACAAAAAU<br>GCAU  | 0  | 1    | 0  | 1    |
| rPHK C2 | 245 | AAA AUGCAUUGGUAAA<br>GCCC | 85 | 0,93 | 92 | 0,96 |
| rPHK A2 | 246 | UUUUGUUGUUUAUCUU<br>CAAC  | 0  | 1    | 0  | 1    |
| rPHK Z1 | 247 | GUUGUUUAUCUUCAAC<br>AGGC  | 0  | 1    | 3  | 0,99 |
| rPHK Y1 | 248 | GCUGGCAUUCUGAGCA<br>GCAC  | 69 | 0,97 | 72 | 0,95 |
| rPHK X1 | 249 | UUUUACUCUCCUGCCA<br>UGUU  | 55 | 0,95 | -  | -    |
| rPHK U1 | 250 | AUGUUUGGACAUCAUC<br>ACUU  | 72 | 0,95 | -  | -    |
| rPHK S1 | 251 | UUAUGCCAAAUCCAUC<br>UCCU  | 77 | 0,97 | -  | -    |
| rPHK Q1 | 252 | CAA AUCCAUCUCCUUG<br>GACA | 42 | 0,96 | -  | -    |
| rPHK M1 | 253 | CAAGGCUUACA UUUGU<br>GCUC | 37 | 0,94 | -  | -    |
| rPHK F2 | 254 | AGAGUAGAUCAU AUGA<br>CUAU | 56 | 0,96 | -  | -    |
| rPHK I2 | 255 | UAGAUCAUAUGACUAU          | 6  | 0,99 | -  | -    |



|         |     |                           |    |      |   |   |
|---------|-----|---------------------------|----|------|---|---|
|         |     | UGGC                      |    |      |   |   |
| rPHK J2 | 256 | AGAUCAUAUGACUAUU<br>GGCU  | 82 | 0,96 | - | - |
| rPHK K2 | 257 | CCUGAAGAAGAUUCCA<br>CUCG  | 85 | 0,95 | - | - |
| rPHK M2 | 258 | UUCCACUCGUGGUAUG<br>AGAG  | 54 | 0,94 | - | - |
| rPHK O2 | 44  | AUAUAAUCAACUCCUC<br>UGCC  | 88 | 0,97 | - | - |
| rPHK P2 | 45  | AAUAGACACUUACCAG<br>GCAG  | 96 | 0,96 | - | - |
| rPHK N2 | 259 | AUCCACUCUCAUACCA<br>CGAG  | 35 | 0,96 | - | - |
| rPHK L2 | 260 | CCACGAGUGGAAUCUU<br>CUUC  | 36 | 0,96 | - | - |
| rPHK H2 | 261 | AAUAGUCAUAUGAUCU<br>ACUC  | 10 | 0,99 | - | - |
| rPHK G2 | 262 | AUAGUCAUAUGAUCUA<br>CUCU  | 28 | 0,98 | - | - |
| rPHK E2 | 263 | GGGAUUUUUAUAAAUUC<br>CUAC | 0  | 1    | - | - |
| rPHK T2 | 264 | GACUUAUUUAACAUGU<br>AUUG  | 50 | 0,96 | - | - |
| rPHK V2 | 265 | AAGAAUGAUUAUGUGAG<br>AAGA | 0  | 1    | - | - |
| rPHK W2 | 266 | AUGGCCAAUCCAGUGC<br>AGCU  | 88 | 0,96 | - | - |
| rPHK Y2 | 267 | UAUGUAGAACCAAGCU<br>GCAC  | 60 | 0,97 | - | - |
| rPHK X2 | 268 | AGAACCAAGCUGCACU<br>GGAU  | 79 | 0,97 | - | - |
| rPHK U2 | 269 | CAAUACAUGUUAUUUA<br>AGUC  | 37 | 0,97 | - | - |

*Скрининг rPHK в первичных человеческих стволовых CD34<sup>+</sup>-клетках и в клетках-предшественниках (HSPC)*

Первичные человеческие CD34<sup>+</sup>-HSPC культивировали и подвергали электропорации с использованием рибонуклеопротеинового комплекса RNP, состоящего из белка Cas9 и одной из 14 гРНК, перечисленных в Таблице 8. Эти 14 скринированных гРНК включают гРНК, которые были выбраны в результате скрининга, проведенного в клетках ТНР-1, и/или гРНК, которые имели благоприятный нецелевой профиль.

**Таблица 8.** Последовательности доменов-мишеней для гРНК CLL1, скринированные в человеческих CD34<sup>+</sup>-клетках. Соответствующие гРНК содержали нацеливающий домен, состоящий из эквивалентной последовательности РНК. Номенклатура области-мишени основана на изоформе CLL1 ENST00000355690.8.

| гРНК    | SEQ ID NO: | Последовательность        | PAM | Область-мишень |
|---------|------------|---------------------------|-----|----------------|
| гРНК А  | 1          | CCCAGAAATTGGCAAATT<br>TG  | GGG | Экзон 2        |
| гРНК В  | 2          | ATTCCAGAACTCCAGTGA<br>GA  | TGG | Экзон 2        |
| гРНК С  | 3          | GAGCTATATAGCAAAGA<br>ACA  | AGG | Экзон 4        |
| гРНК D  | 4          | GGTGGCTATTGTTTGCAG<br>TG  | TGG | Экзон 4        |
| гРНК E  | 5          | TTGTTTGCAGTGTGGTGG<br>AG  | AGG | Экзон 4        |
| гРНК F  | 6          | TAGCTCACGACATAATTT<br>GG  | TGG | Экзон 4        |
| гРНК G  | 7          | GGCTATTGTTTGCAGTGT<br>GG  | TGG | Экзон 4        |
| гРНК H  | 8          | GGAGAGGTTCCTGATCTT<br>GT  | TGG | Экзон 4        |
| гРНК I  | 9          | TGAATATCTCCAACAAGA<br>TC  | AGG | Экзон 4        |
| гРНК J  | 10         | GTTGTAGAGAAATATTTTC<br>TC | TGG | Экзон 4        |
| гРНК K2 | 119        | CCTGAAGAAGATTCCACT<br>CG  | TGG | Экзон 6        |
| гРНК O2 | 40         | ATATAATCAACTCCTCTG<br>CC  | TGG | Экзон 6        |
| гРНК P1 | 98         | CTTGTCCAAGGAGATGGA<br>TT  | TGG | Экзон 5        |

|         |    |                          |     |         |
|---------|----|--------------------------|-----|---------|
| гРНК P2 | 42 | AATAGACACTTACCAGGC<br>AG | AGG | Экзон 6 |
|---------|----|--------------------------|-----|---------|

Частота редактирования этих гРНК в первичных человеческих CD34<sup>+</sup>-HSPC была вычислена и представлена на фигуре 8 и фигуре 9. Из 14 протестированных гРНК, 5 продемонстрировали эффективность редактирования выше 80% (фигура 8 и фигура 9). Эти гРНК включали гРНК D, гРНК F, гРНК G, гРНК O2 и гРНК P2, а их вычисленная средняя эффективность редактирования показана в Таблице 9.

**Таблица 9.** Средняя эффективность редактирования гРНК, скринированных в первичных человеческих CD34<sup>+</sup>-HSPC

| Гидовая РНК | Средняя эффективность редактирования |
|-------------|--------------------------------------|
| гРНК D      | 86,9                                 |
| гРНК F      | 85,7                                 |
| гРНК G      | 85,1                                 |
| гРНК O2     | 90,7                                 |
| гРНК P2     | 86,7                                 |

Распределения INDEL (инсерций/делеций) для гРНК D, гРНК F, гРНК G, гРНК O2 и гРНК P2, оцененные в первичных человеческих CD34<sup>+</sup>-клетках, были количественно определены и представлены на фигуре 10. Каждая гРНК приводила к INDEL в диапазоне от -21 до +1. гРНК D приводила к INDEL различных размеров, включая -21, -9, -7, -5, -1, 0 и +1, где INDEL +1 встречалась с наибольшей частотой. гРНК F приводила к INDEL различных размеров, включая -3, -2, -1, 0 и +1, где INDEL -1 встречалась с наибольшей частотой. гРНК G приводила к INDEL различных размеров, включая -10, -7, -5, -2, -1 и +1, где INDEL -2 встречалась с наибольшей частотой. гРНК O2 приводила к INDEL различных размеров, включая -6, 0 и +1, где INDEL +1 встречалась с наибольшей частотой. гРНК P2 приводила к INDEL различных размеров, включая -6, -4, -3, -2, -10 и +1, где INDEL -4 встречалась с наибольшей частотой.

Нецелевые эффекты гРНК D, гРНК F, гРНК G, гРНК O2 и гРНК P2 также были предсказаны, как показано в Таблице 10. Приоритет гРНК был отдан исходя из минимизации нецелевых эффектов. Эти нецелевые прогнозы были основаны на комплементарности последовательностей с допустимым ошибочным спариванием до 1 нуклеотида между РАМ и мишенью или ошибочным спариванием или разрывом до 3 нуклеотидов между гидовой молекулой и мишенью.

**Таблица 10.** Нецелевые прогнозы для гРНК, нацеленных на человеческий CLL1

| Гидовая РНК | Без ошибочных спариваний/разрывов в РАМ       |   | 1 ошибочное спаривание/разрыв в РАМ           |   |
|-------------|-----------------------------------------------|---|-----------------------------------------------|---|
|             | # ошибочных спариваний/разрывов в гидовой РНК |   | # ошибочных спариваний/разрывов в гидовой РНК |   |
|             | 2                                             | 3 | 2                                             | 3 |

|         |   |     |    |     |
|---------|---|-----|----|-----|
| гРНК G  | 8 | 224 | 11 | 319 |
| гРНК D  | 4 | 214 | 8  | 364 |
| гРНК F  | 1 | 98  | 5  | 217 |
| гРНК O2 | 2 | 168 | 20 | 441 |
| гРНК P2 | 8 | 349 | 18 | 478 |

Среди других гРНК, нацеленных на CLL1 человека и исследованных в этом примере, три гРНК (гРНК D, гРНК F и гРНК O2) продемонстрировали особенно эффективное целевое редактирование в первичных человеческих CD34<sup>+</sup>-HSPC, низкий уровень предсказанных нецелевых эффектов и желаемое распределение INDEL.

#### **Пример 4: Оценка CLL1-KO-CD34<sup>+</sup>-клеток *in vivo***

##### *Редактирование в человеческих CD34<sup>+</sup>-HSPC*

гРНК (Synthego) конструировали, как описано в Примере 1 и в Примере 3. Затем человеческие CD34<sup>+</sup>-HSPC редактировали с помощью CRISPR/Cas9, как описано в Примере 1, например, с использованием гидовой РНК F, нацеленной на CLL1. Были также получены неотредактированные, контрольные HPSC (EP Ctrl), подвергнутые электропорации.

После редактирования *ex vivo*, геномную ДНК собирали из клеток, амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами, фланкирующими область-мишень, очищали и анализировали для определения их эффективности редактирования в CD34<sup>+</sup>-HSPC. Как показано в Таблице 11, гРНК F обладает высокой эффективностью редактирования, а именно, 75,4%.

**Таблица 11. Эффективность редактирования генов с использованием гРНК CLL1**

| CD34 <sup>+</sup> -HSPC                                      | Эффективность редактирования |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------|
| EP, только контроль                                          | N/A                          |
| Отредактированные с использованием гРНК F, нацеленной на CLL | 75,4% (TIDE)                 |

##### *Исследование эффективности приживления и персистенции CLL1-KO-CD34<sup>+</sup>-клеток *in vivo**

Самкам необлученных мышей NOD, B6.SCID Il2γ<sup>-/-</sup>-Kit(W41/W41) (NBSGW) (n=15) трансплантировали CLL1-KO-HSPC, отредактированные с использованием гРНК F, или неотредактированные (EP Ctrl) (фигура 11). Через 8 и 12 недель после приживления, у каждой мыши брали периферическую кровь для анализа с помощью FACS для оценки приживления. На 16 неделе после приживления, мышей умерщвляли и брали кровь, селезенку и костный мозг для FACS-анализа на дифференцировку множества клеточных линий (фигура 11).

##### *Результаты для образцов клеток, взятых из костного мозга привитых животных*

На 16-й неделе после приживления вычисляли показатели химеризма человеческих лейкоцитов у мышей как процент человеческих  $CD45^+-(hCD45^+)$ -клеток в общей популяции  $CD45^+$ -клеток (сумма  $CD45^+$ -клеток человека и мыши) в двух группах мышей ( $n=15$  мышей/группу), которые получали неотредактированные контрольные клетки (EP Ctrl) или CLL1-КО-клетки, отредактированные с использованием гРНК F (фигура 12A). Как показано на фигуре 12A, химеризм в костном мозге был эквивалентен в контрольной группе и в группе с нокаутом CLL1, что указывает на наличие частоты встречаемости в ядро-содержащем костном мозге.

Кроме того, на 16 неделе после приживления количественно определяли процент  $hCD45^+$ -клеток, которые также были позитивными по человеческому  $CD34$  ( $hCD34^+$ ) в костном мозге (фигура 12B). Как показано на фигуре 12B, процент клеток, экспрессирующих  $hCD45^+$ , а также  $hCD34^+$ , был эквивалентен в контрольной группе или в группе с нокаутом CLL1.

На 16-й неделе после приживления, в костном мозге количественно оценивали процент  $hCD45^+$ -клеток, которые представляли собой В-клетки, Т-клетки, моноциты, нейтрофилы, обычные дендритные клетки (сDC), плазмоцитоидные дендритные клетки (pDC), эозинофилы, базофилы и тучные клетки (фигура 12C). Процентное содержание этих различных подтипов иммунных клеток было одинаковым у контрольной группы и у группы с нокаутом CLL1. Эти данные указывают на восстановление клеток кроветворной системы человека из отредактированных CLL1-КО-клеток у мышей.

Процентное содержание CLL1-КО-клеток, которые представляли собой  $hCD45^+$ -клетки, количественно определяли в костном мозге контрольных мышей и у мышей с привитыми CLL1-КО-клетками на 16-й неделе после трансплантации (фигура 12D). Процент  $hCLL1^+hCD45^+$ -клеток был значительно ниже в CLL1-КО-клетках, отредактированных с использованием гРНК F, по сравнению с контрольной группой, что указывает на потерю CLL1 из ядерных клеток крови в этих группах. Эти данные также демонстрируют долгосрочную персистентность CLL1-КО-HSC в костном мозге мышей NBSGW.

#### **Пример 5: Оценка CLL1-КО- $CD34^+$ -клеток in vitro**

##### *Редактирование в человеческих $CD34^+$ -HSPC*

гРНК (Synthego) конструировали, как описано в Примере 1 и в Примере 3. Затем человеческие  $CD34^+$ -HSPC редактировали с помощью CRISPR/Cas9, как описано в Примере 1, например, с использованием гидовой РНК F, нацеленной на CLL1, а также был включен неотредактированный контроль, подвергнутый электропорации (EP Ctrl).

После редактирования ex vivo, геномную ДНК собирали из клеток, амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами, фланкирующими область-мишень, очищали и анализировали с помощью TIDE для определения эффективности редактирования в  $CD34^+$ -HSPC. Как показано в Таблице 13A, гРНК F давала частоту редактирования 79,2%. Экспрессию CLL1 на клеточной поверхности также определяли количественно с помощью FACS в CLL1-КО-клетках, отредактированных с

использованием гРНК F, в неотредактированном контроле (EP ctrl) или в контроле FMO (флуоресценция -1). CD34<sup>+</sup>-HSPC, отредактированные с использованием гРНК F, продемонстрировали более низкую экспрессию CLL1 по сравнению с неотредактированным контролем (EP ctrl) (фигура 13A).

Неотредактированные контрольные клетки (EP ctrl) или CLL1-КО-клетки, отредактированные с помощью гРНК F, культивировали в среде для миелоидной дифференцировки, индуцируя либо гранулоцитарные (Фигура 13B), либо моноцитарные (фигура 13C) линии дифференцировки, и количество клеток определяли в течение определенного периода времени. CLL1-КО-клетки продемонстрировали рост клеток, сравнимый с ростом неотредактированных контрольных клеток в среде для дифференцировки культуры гранулоцитов (фигура 13B) и моноцитов (Фигура 13C).

Кроме того, процент клеток, которые были дифференцированы в CLL<sup>+</sup>-гранулоциты (фигура 14A, сверху), или клеток, которые были дифференцированы в CLL1<sup>+</sup>-моноциты (фигура 14A, внизу), количественно определяли на день 0, 7 и 14 после редактирования и культивирования неотредактированных контрольных клеток или CLL1-КО-клеток, отредактированных с использованием гРНК F. Гранулоциты и моноциты, полученные из CLL1-КО-клеток, продемонстрировали устойчивую потерю экспрессии CLL1 с течением времени по сравнению с неотредактированными контрольными клетками (фигура 14A). Также оценивали способность CLL1-КО-клеток дифференцироваться в миелоидные клетки *in vitro*. Процент CD15-позитивных (фигура 14B, сверху слева) или CD11b-позитивных гранулоцитов (фигура 14B, сверху справа) определяли количественно на 0, 7 и 14 день после редактирования и культивирования неотредактированных контрольных клеток или CLL1-КО-клеток, отредактированных с помощью гРНК F. На экспрессию этих гранулоцитарных маркеров не влияла потеря CLL1. Процент CD14-позитивных (фигура 14B, внизу слева) или CD11b-позитивных моноцитов (фигура 14B, внизу справа) определяли количественно на 0, 7 и 14 день после редактирования и культивирования неотредактированных контрольных клеток или CLL1-КО-клеток, отредактированных с помощью гРНК F. Подобно маркерам гранулоцитов, экспрессия этих маркеров моноцитов не зависела от потери CLL1. Экспрессия CD33 (маркера миелоидных клеток) и HLA-DR (ответственных за презентацию антигена) также не изменялась при разрушении CLL1. Эти данные показали, что потеря CLL1 не влияет на миелоидную дифференцировку *in vitro*.

Функцию CLL1-КО-клеток также оценивали *in vitro*. Процент фагоцитоза, осуществляемого гранулоцитами (фигура 15, сверху) и моноцитами (фигура 15, внизу), был количественно определен в популяции контрольных клеток и в популяциях CLL1-КО-клеток. Активность фагоцитоза была эквивалентна у контрольных и у CLL1-КО-клеток как для гранулоцитов, так и для моноцитов, что указывает на то, что CLL1-КО-клетки сохраняли фагоцитозную активность (фигура 15). Также оценивали способность CLL1-КО-клеток продуцировать воспалительные цитокины при стимуляции. Гранулоциты (фигура 16A) и моноциты (фигура 16B), полученные из

неотредактированных контрольных клеток или CLL1-KO-клеток, отредактированных с использованием гРНК F, не были стимулированы или были стимулированы LPS или R848. Уровни IL-6 (фигура 16A или 16B, слева) и TNF- $\alpha$  (фигура 16A или 16B, справа) были затем количественно оценены. CLL1-KO-гранулоциты и моноциты продемонстрировали интактное продуцирование воспалительных цитокинов при стимуляции агонистом TLR, и продуцирование цитокинов было эквивалентным продуцированию цитокинов неотредактированными контрольными клетками. Продуцирование других цитокинов, включая IL-1 $\beta$  и MIP-1 $\alpha$ , также не изменялось при разрушении CLL1. В целом, эти данные показали, что потеря CLL1 не влияла на функцию миелоидных клеток *in vitro*.

Потенциал дифференцировки CD34<sup>+</sup>-CLL1-KO-клеток с генами, отредактированными с использованием гРНК F, также оценивали с помощью анализа на образование колоний. После электропорации, отредактированные CD34<sup>+</sup>-клетки высевали и культивировали в течение двух недель. Затем колонии подсчитывали и оценивали с помощью StemVision (Stem Cell Technologies). Клетки, отредактированные по CLL1 с использованием гРНК F (частота редактирования 79,2%), продуцировали меньше колоний BFU-E, CFU-G/M/GM и CFU-GEMM по сравнению с неотредактированными контрольными клетками (фигура 17A). Однако, клетки, отредактированные по CLL1, давали такое же распределение и процентное содержание колоний BFU-E (колоний клеток, дифференцированных из клеток-предшественников эритроидного ряда), колоний CFU-G/M/GM и колоний CFU-GEMM, как и неотредактированные контрольные клетки, что указывает на то, что CLL1-отредактированные клетки сохраняют значительный потенциал дифференцировки в этом анализе (фигура 17B). Колониеобразующие единицы (КОЕ)-G/M/GM представляет собой колонии CFU-G (гранулоцитов), CFU-M (макрофагов) и CFU-GM (гранулоцитов/макрофагов). Колонии CFU-GEMM (гранулоцитов/эритроидов/макрофагов/мегакариоцитов) возникают из менее дифференцированных клеток, являющихся предшественниками клеток, дающих начало колониям CFU-GM. В целом, анализы на дифференцировку показали, что человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки, отредактированные в локусе CLL1, сохраняют способность дифференцироваться в клетки различных типов.

#### **Пример 6. Оценка резистентности клеток с отредактированным CLL1 к эффекторным клеткам CART.**

В этом примере описана оценка резистентности CLL1-отредактированных клеток к эффекторным клеткам CART, нацеленным на CLL1. CLL1-KO-клетки, в которых отсутствует экспрессия CLL1, устойчивы к уничтожению CLL1 CAR по сравнению с CLL1<sup>+</sup>-клетками дикого типа, как было определено с помощью анализов, описанных в настоящей заявке.

##### *Редактирование в человеческих CD34<sup>+</sup>-HSPC*

гРНК (Synthego) конструировали как описано в Примере 3. Затем человеческие CD34<sup>+</sup>-HSPC редактировали с помощью CRISPR/Cas9, как описано в Примере 1, с использованием гРНК, нацеленных на CLL1, например, гРНК, нацеленных на CLL1, как

показано в Таблицах 2, 6 или 8.

#### *CAR-конструкции и продуцирование лентивируса*

CAR второго поколения были сконструированы для нацеливания на CLL1. CAR состоял из внеклеточного антигенсвязывающего домена scFv и содержал сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , шарнирные и трансмембранные области CD8 $\alpha$ , костимулирующий домен 4-1BB или CD28 и сигнальный домен CD3 $\zeta$ . Антитело против CLL1 CAR содержало последовательность scFv против CLL1 и было получено из клона 1075.7 в ориентации от тяжелой к легкой цепи. Тяжелая и легкая цепи были соединены линкером (GGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 63). Последовательность кДНК CAR CLL1 была субклонирована в сайт множественного клонирования экспрессионного вектора pCDH-EF1 $\alpha$ -MCS-T2A-GFP, а затем был получен лентивирус в соответствии с протоколом производителя (System Biosciences). Лентивирус может быть получен путем временной трансфекции клеток 293TN (System Biosciences) с использованием липофектамина 3000 (ThermoFisher).

#### *Трансдукция и размножение CAR-клеток*

Первичные Т-клетки человека выделяли из Leuko Pak (Stem Cell Technologies) путем разделения на магнитных шариках с использованием микрошариков с антителами против CD4 и против CD8 в соответствии с протоколом производителя (Stem Cell Technologies). Очищенные CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки смешивали в отношении 1:1 и активировали с использованием связанных гранул Dynabeads, содержащих антитела против CD3/CD28 (Thermo Fisher) в отношении гранул к клеткам 1:1. Используемая среда для культивирования Т-клеток представляла собой среду для размножения Т-клеток CTS Optimizer, дополненную заменителем сыворотки иммунных клеток, L-глутамином и GlutaMAX (все они были закуплены у Thermo Fisher) и 100 МЕ/мл IL-2 (Peprotech). Трансдукцию Т-клеток проводили через 24 часа после активации путем центрифужной инокуляции в присутствии полибрена (Sigma). CAR-Т-клетки культивировали в течение 9 дней перед криоконсервацией. Перед проведением всех экспериментов, Т-клетки размораживали и выдерживали при 37°C в течение 4-6 часов.

#### *Анализ на цитотоксичность CAR-T на основе проточной цитометрии*

Цитотоксичность клеток-мишеней определяли путем сравнения выживаемости клеток-мишеней с выживаемостью клеток негативного контроля. Для проведения анализов на CLL1, в качестве клеток-мишеней использовали клетки дикого типа и отредактированные по CRISPR/Cas9 человеческие CD34<sup>+</sup>-HSPC. Линии клеток Raji дикого типа (ATCC) использовали в качестве негативного контроля. Клетки-мишени и клетки негативного контроля окрашивали фиолетовым CellTrace Violet (CTV) и CFSE (Thermo Fisher), соответственно, согласно инструкциям производителя. После окрашивания, клетки-мишени и клетки негативного контроля смешивали в отношении 1:1.

В качестве эффекторных Т-клеток использовали CAR-Т-клетки против CLL1. В качестве контроля использовали нетрансдуцированные Т-клетки (ложные CAR-Т). Эффекторные Т-клетки совместно культивировали со смесью клеток-мишеней/клеток



негативного контроля в отношении эффекторных клеток к мишеням 1:1 в двух повторностях. Группа смеси клеток-мишеней/клеток негативного контроля, взятая отдельно без эффекторных Т-клеток, была включена в качестве контроля. Клетки инкубировали при 37°C в течение 24 часов перед проведением проточного цитометрического анализа. Иодид пропидия (ThermoFisher) использовали в качестве красителя на жизнеспособность. Для оценки специфического клеточного лизиса использовали отношение живой клетки-мишени к живой клетке негативного контроля (называемой целевой фракцией). Специфический лизис клеток вычисляли по формуле ((целевая фракция без эффекторных клеток - целевая фракция с эффекторными клетками)/(целевая фракция без эффекторов))  $\times$  100%.

Описанный выше анализ показал, что CLL1-KO-HPSC (и их потомство) являются резистентными к уничтожению, опосредованному антителами против CLL1 CAR-T, в то время как неотредактированные контрольные HPSC (и их потомство) были восприимчивы к уничтожению, опосредованному антителами против CLL1 CAR-T.

### **Пример 7: Лечение гематологического заболевания**

В настоящей заявке описана репрезентативная схема лечения острого миелоидного лейкоза или МДС с применением описанных здесь способов, клеток и агентов. Вкратце, сначала идентифицируют индивидуума с ОМЛ или МДС, который является кандидатом на трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). Затем идентифицируют подходящего донора HSC, например, HLA-совместимого донора, и у этого донора берут HSC или, если это необходимо, аутологичные HSC.

Полученные таким образом HSC редактируют в соответствии с протоколами и с применением описанных здесь стратегий и композиций, например, подходящей гидовой РНК, нацеленной на домен-мишень CLL1, как описано в любой из Таблиц 2, 6 или 8. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, редактирование осуществляют с использованием гРНК, содержащей нацеливающий домен, описанный в настоящей заявке для гРНК D, гРНК F или гРНК O2. Вкратце, целевую модификацию (делецию, усечение, замену) CLL1 вводят посредством редактирования гена CRISPR с использованием подходящей гидовой РНК и подходящей РНК-зависимой нуклеазы, например, нуклеазы Cas9, что будет приводить к потере экспрессии CLL1 по меньшей мере в 80% отредактированной популяции HSC.

Индивидуум, страдающий ОМЛ или МДС, может быть предварительно обследован в соответствии с клиническим стандартом лечения, который может включать, например, вливание химиотерапевтических агентов (например, этопозиды, циклофосфамида) и/или облучение. Однако, в зависимости от состояния здоровья индивидуума и степени прогрессирования заболевания у индивидуума, такое предварительное обследование можно не проводить.

Индивидууму проводят иммунотерапию, нацеленную на CLL1, например, терапию CAR-T-клетками, нацеленными на CLL1. Отредактированные HSC, взятые у донора, или отредактированные HSC, взятые у индивидуума, вводят индивидууму и проводят

наблюдение за приживлением, выживанием и/или дифференцировкой HSC в зрелые клетки гемопоэтических линий у индивидуума. Иммуноterapia, нацеленная на CLL1, селективно нацелена на CLL1-экспрессирующие злокачественные или предраковые клетки, и уничтожает эти клетки, а также она может воздействовать на некоторые здоровые клетки, экспрессирующие CLL1, у индивидуума, но не нацелена на отредактированные HSC или их потомство у индивидуума, поскольку эти клетки являются резистентными к нацеливанию и уничтожению посредством иммунотерапии, нацеленной на CLL1.

Состояние здоровья и прогрессирование заболевания у индивидуума регулярно отслеживают после проведения иммунотерапии и введения отредактированных HSC для подтверждения снижения числа злокачественных или предраковых клеток, экспрессирующих CLL1, и для подтверждения успешного приживления отредактированных HSC и их потомства.

### **Эквиваленты и область применения**

Специалистам в данной области известны или они могут самостоятельно определить путем проведения не более чем рутинных экспериментов многие эквиваленты репрезентативных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящей заявке. Объем настоящего изобретения не ограничивается вышеприведенным описанием.

Артикли «a», «an» и «the» могут употребляться для обозначения одного или более, чем одного объекта, если это не оговорено особо или явно не противоречит контексту описания.

В формуле изобретения или описании изобретения, где встречается союз «или» между двумя или более членами группы, подразумевается, что в данном случае присутствуют один, более одного или все члены группы, если это не оговорено особо или из контекста не следует иное. Описание группы, которая включает союз «или» между двумя или более членами этой группы, представляет собой варианты осуществления изобретения, в которых присутствует только один член группы, варианты осуществления изобретения, в которых присутствует более, чем один член группы, и варианты осуществления изобретения, в которых присутствуют все члены группы. Для краткости, эти варианты осуществления изобретения не были описаны здесь по отдельности, но следует отметить, что каждый из этих вариантов осуществления представлен в настоящей заявке и может быть конкретно заявлен или отвергнут.

Следует отметить, что настоящее изобретение охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или более ограничений, элементов, пунктов или описательных терминов из одного или более пунктов формулы изобретения или из одной или нескольких соответствующих частей описания введены в другой пункт. Так, например, пункт формулы изобретения, который зависит от другого пункта формулы изобретения, может быть изменен так, чтобы он включал одно или более ограничений, имеющихся в любом другом пункте формулы изобретения, зависящем от этого базового пункта. Кроме того, если в пунктах формулы изобретения упоминается композиция, то

это означает, что в них включены способы получения или применения композиции в соответствии с любым из способов получения или применения, раскрытых в настоящей заявке, или в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, если это не оговорено особо, или если для специалиста в данной области не будет очевидно, что в данном случае возникнет противоречие или несоответствие.

Если элементы представлены в виде списков, то это означает, что в этих списках раскрываются все возможные отдельные элементы или подгруппы элементов, и что любой элемент или подгруппа элементов могут быть удалены из этой группы. Также следует отметить, что термин «содержащий» является неограничивающим и допускает включение дополнительных элементов, признаков или стадий. Следует отметить, что, обычно, если вариант осуществления изобретения упоминается как содержащий определенные элементы, признаки или стадии, то он также охватывает варианты осуществления изобретения, которые состоят или по существу состоят из таких элементов, признаков или стадий. Для краткости, эти варианты осуществления изобретения не были описаны здесь по отдельности, но следует отметить, что каждый из этих вариантов осуществления изобретения представлен в настоящей заявке и может быть конкретно заявлен или отвергнут.

Там, где указаны диапазоны, включены конечные точки. Кроме того, следует отметить, что, если не указано иное или если из контекста описания и/или из интерпретации специалиста в данной области не следует иное, то в некоторых вариантах осуществления изобретения, значения, выраженные в виде диапазонов, могут принимать любое конкретное значение в пределах указанных диапазонов до десятых долей нижней границы диапазона, если из контекста явно не следует иное. Для краткости, в настоящем описании, значения в каждом диапазоне не были указаны отдельно, но при этом, следует понимать, что каждое из этих приведенных здесь значений может быть конкретно заявлено или опровергнуто. Также следует отметить, что, если не указано иное или из контекста и/или интерпретации специалиста в данной области не следует иное, то значения, выраженные в виде диапазонов, могут относиться к любому поддиапазону в пределах данного диапазона, где конечные точки поддиапазона выражены с точностью до десятой доли значения нижней границы диапазона.

Все упомянутые здесь публикации, патентные заявки, патенты и другие документы (например, регистрационные номера базы данных последовательностей) в полном объеме включены посредством ссылки. Так, например, все последовательности GenBank, Unigene и Entrez, упомянутые здесь, например, в любой таблице, включены в качестве ссылки. Если это не оговорено особо и не указано иное, регистрационные номера последовательностей, указанные в настоящей заявке, в том числе в любой представленной здесь таблице, относятся к записям базы данных по состоянию на 28 августа 2019 г. Если один ген или белок указан со ссылкой на множество регистрационных номеров последовательностей, то это означает, что охватываются все варианты последовательностей.

Кроме того, следует отметить, что любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения может быть конкретно исключен из любого одного или нескольких пунктов формулы изобретения. Там, где указаны диапазоны значений, любое значение в пределах этих диапазонов может быть конкретно исключено из любого одного или нескольких пунктов формулы изобретения. Для краткости, все варианты осуществления изобретения, из которых были исключены один или несколько элементов, признаков, целей или аспектов, здесь точно не указаны.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 21.
2. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 22.
3. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 23.
4. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 24.
5. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 25.
6. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 26.
7. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27.
8. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 28.
9. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 29.
10. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 30.
11. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 44.
12. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 45.
13. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 257.
14. гРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 239.
15. гРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью из Таблицы 1, 2, 6 или 8.
16. гРНК, содержащая нацеливающий домен, способный регулировать расщепление или редактирование домена-мишени из Таблицы 1, 2, 6 или 8.
17. гРНК по любому из пп. 1-16, которая содержит первый комплементарный домен; связывающий домен; второй комплементарный домен, комплементарный первому комплементарному домену; и проксимальный домен.
18. гРНК по любому из пп. 1-17, которая представляет собой одноцепочечную гидовую РНК (оцгРНК).
19. гРНК по любому из пп. 1-18, которая содержит один или более 2'О-метил-нуклеотидов.

20. гРНК по любому из пп. 1-19, которая содержит одну или более фосфортиоатных или тио-РАСЕ-связей.

21. Способ получения генетически сконструированной клетки, включающий:

(i) получение клетки (например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника дикого типа), и

(ii) введение в клетку (а) гРНК по любому из пп. 1-17; и (b) молекулы Cas9, которая связывается с гРНК,

и тем самым продуцирование генетически сконструированной клетки.

22. Способ по п.21, где молекула Cas содержит эндонуклеазу SpCas9, эндонуклеазу SaCas9 или эндонуклеазу Cpf1.

23. Способ по п. 21 или 22, где (i) и (ii) вводят в клетку в виде предварительно образованного рибонуклеопротеинового комплекса.

24. Способ по п. 21, где рибонуклеопротеиновый комплекс вводят в клетку посредством электропорации.

25. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, полученная способом по п. 21.

26. Популяция клеток, содержащая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников по п. 25.

27. Популяция клеток по п.26, которая дополнительно включает одну или более клеток, содержащих один или более немодифицированных генов CLL1.

28. Популяция клеток по п. 26 или 27, которая экспрессирует менее 20% CLL1, экспрессируемого популяцией клеток-аналогов дикого типа.

29. Популяция клеток по любому из пп. 26-28, которая включает как гемопоэтические стволовые клетки, так и гемопоэтические клетки-предшественники.

30. Популяция клеток по любому из пп. 26-29, которая дополнительно содержит вторую мутацию в гене, кодирующем антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и отличающийся от CLL1.

31. Популяция клеток по п. 30, где ген, кодирующий антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и отличающийся от CLL1, представляет собой CD33 или CD123.

32. Способ, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, клеточной популяции по любому из пп. 26-31.

33. Способ по п. 32, где у индивидуума имеется злокачественное новообразование кроветворной системы.

34. Способ по п. 32 или 33, который дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества агента, нацеленного на CLL1, где указанный агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CLL1.

По доверенности

ФИГ.1

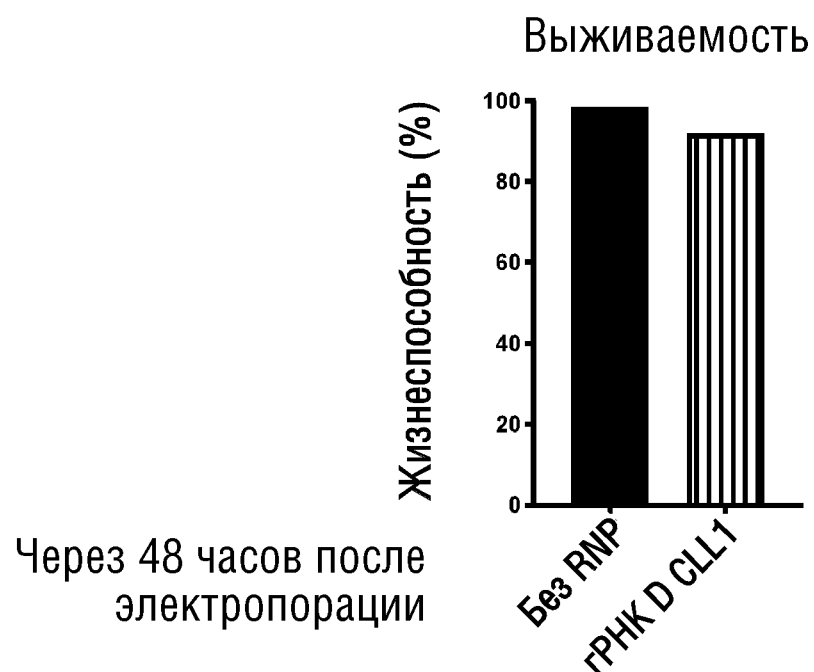


N = 2

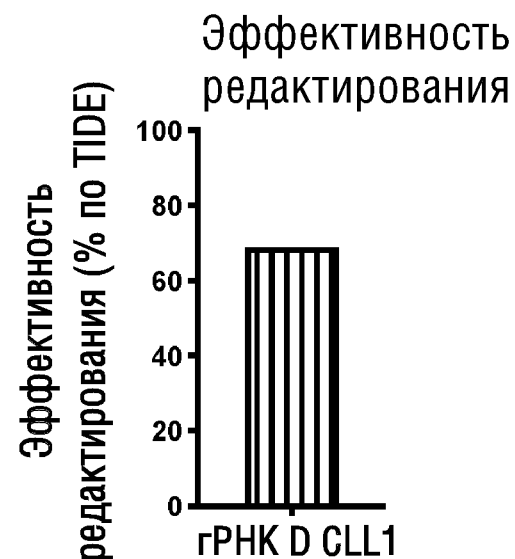
ФИГ.2А



ФИГ.2В

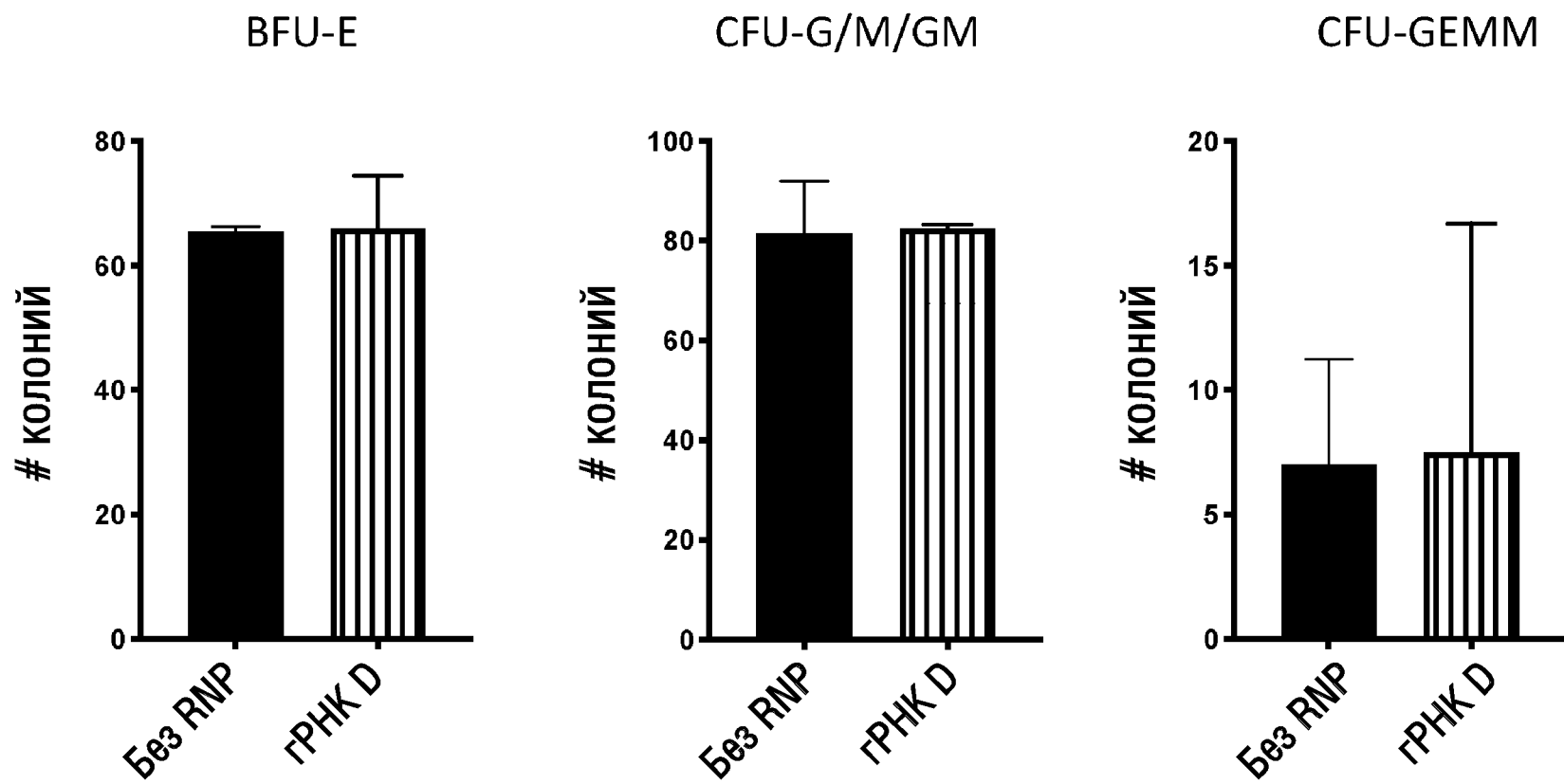


ФИГ.2С

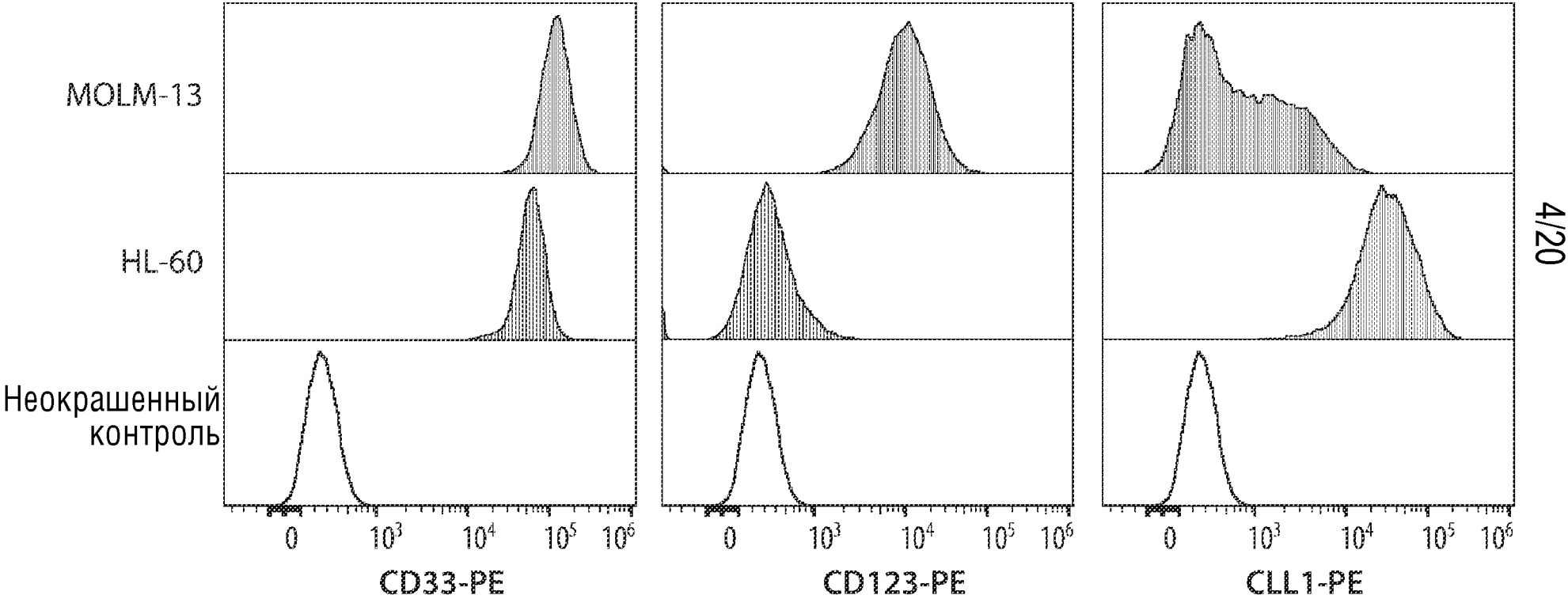




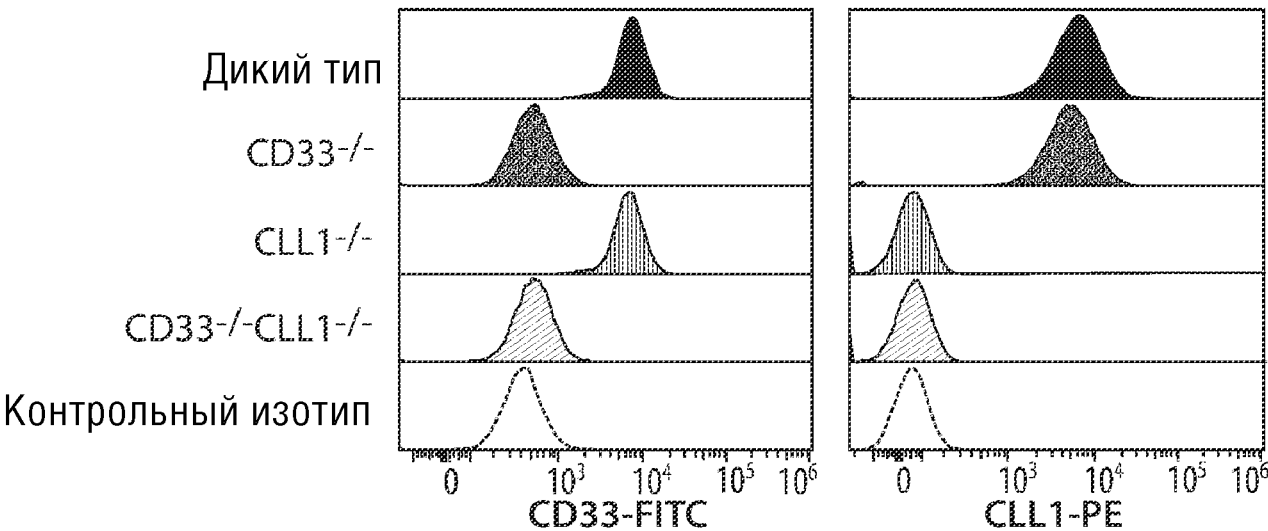
ФИГ.2D



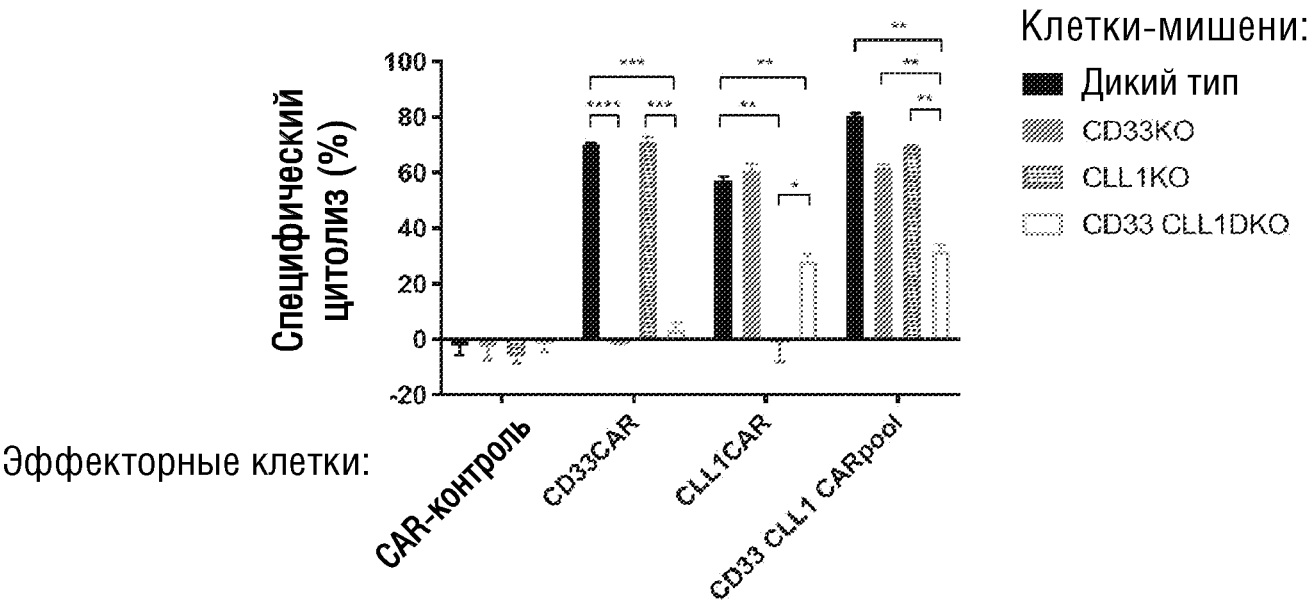
ФИГ.3



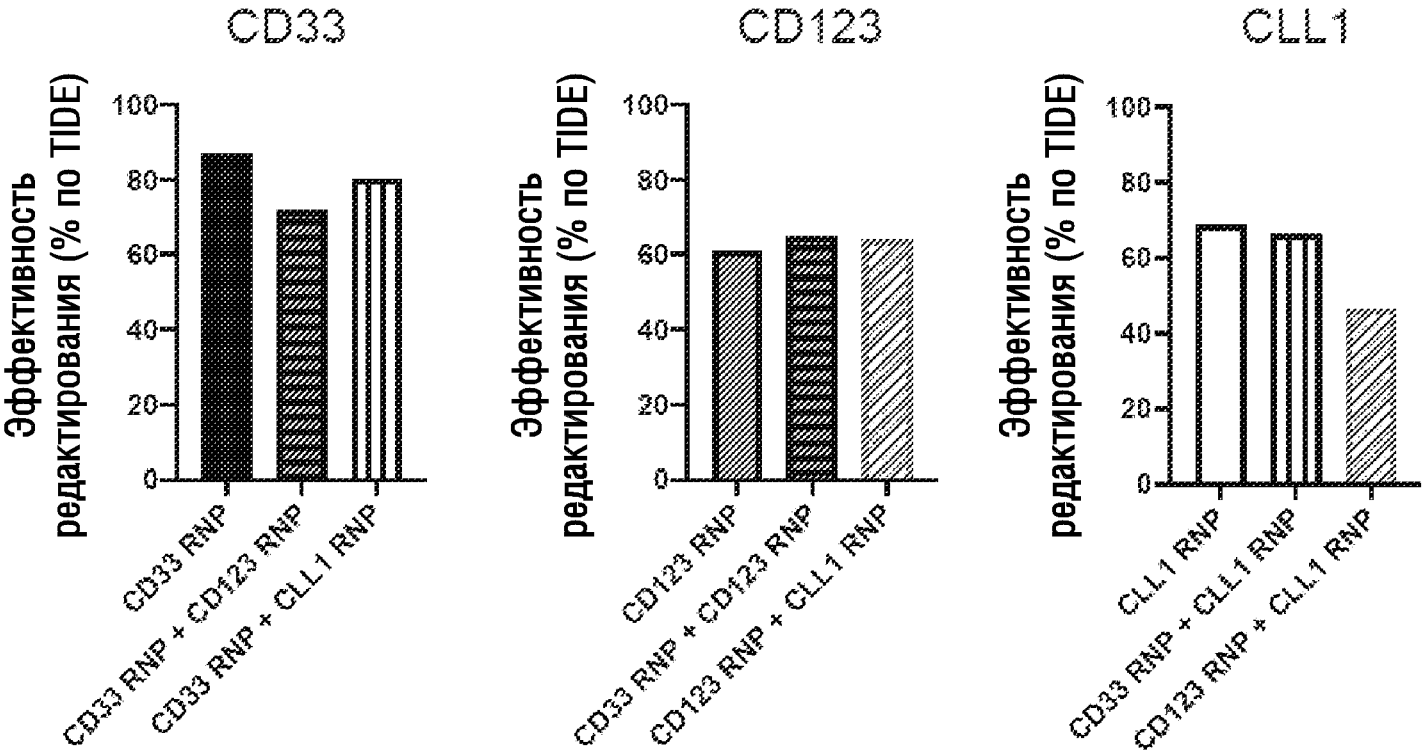
ФИГ.4



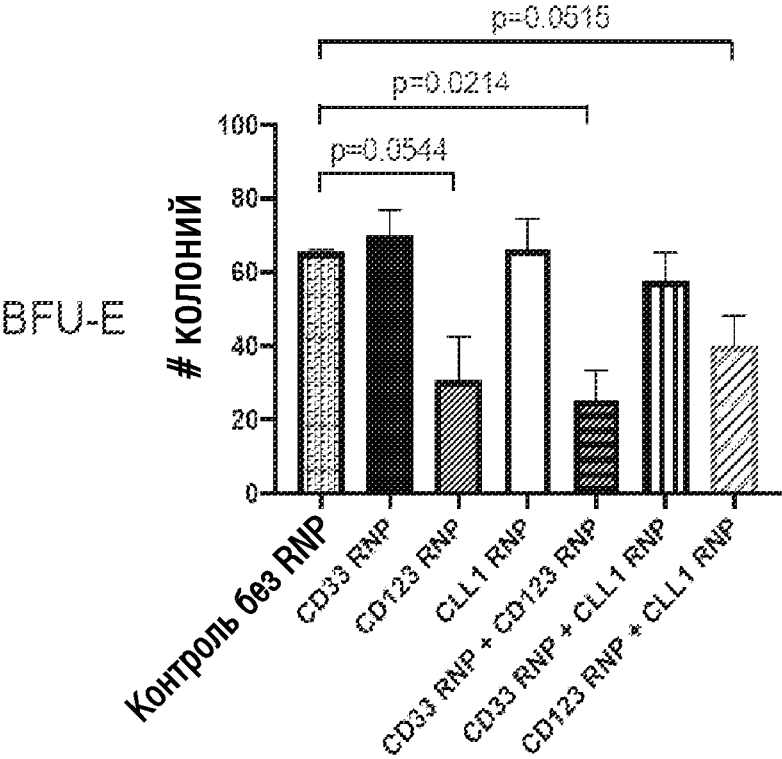
ФИГ.5



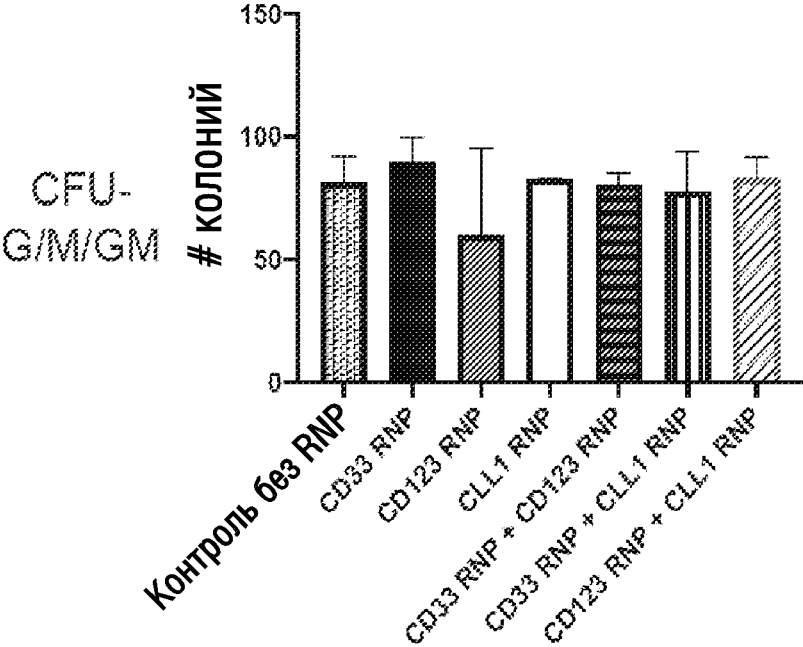
ФИГ.6



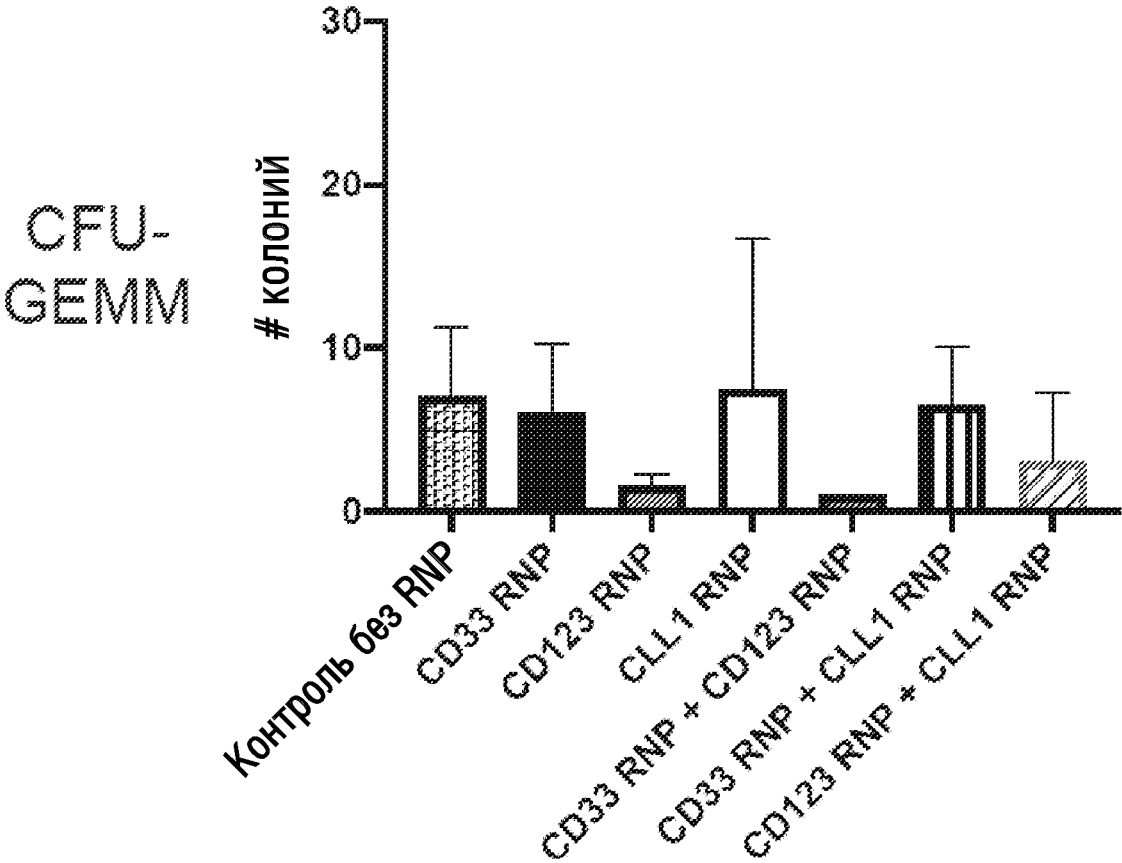
ФИГ.7А



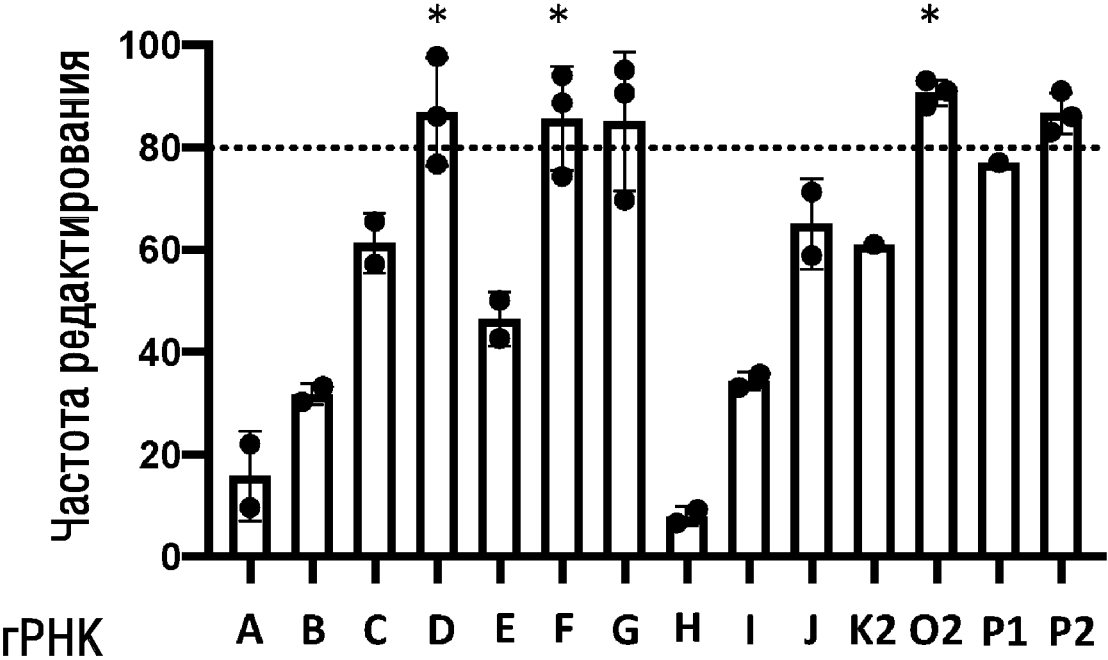
ФИГ.7В



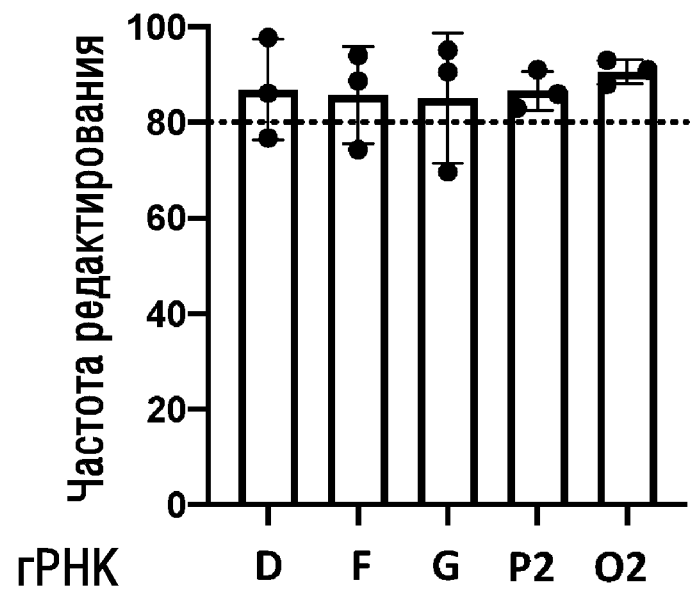
ФИГ.7С



ФИГ.8

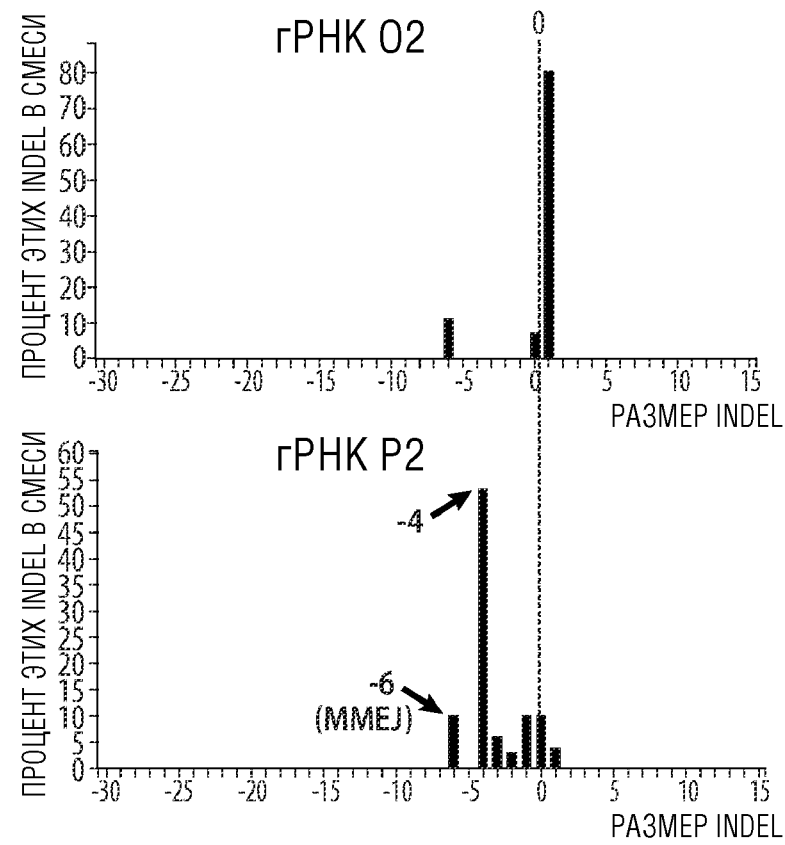
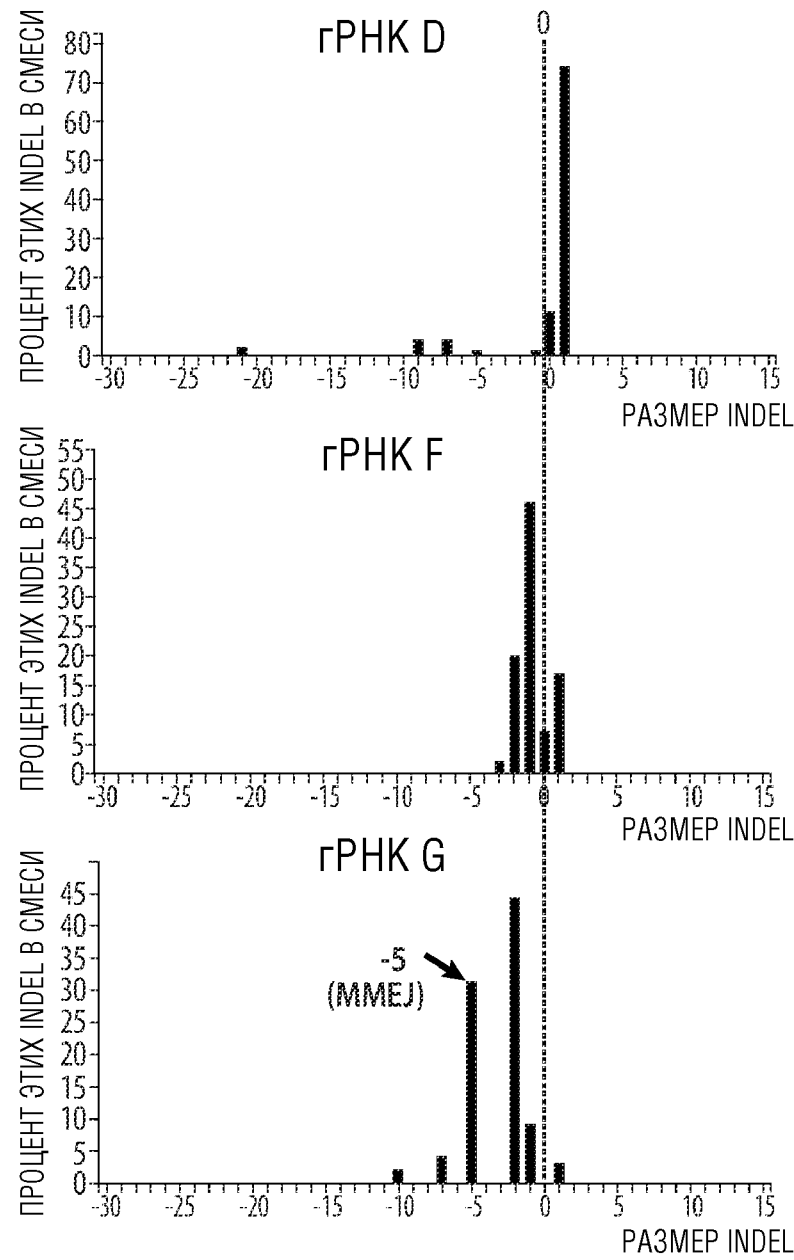


ФИГ.9

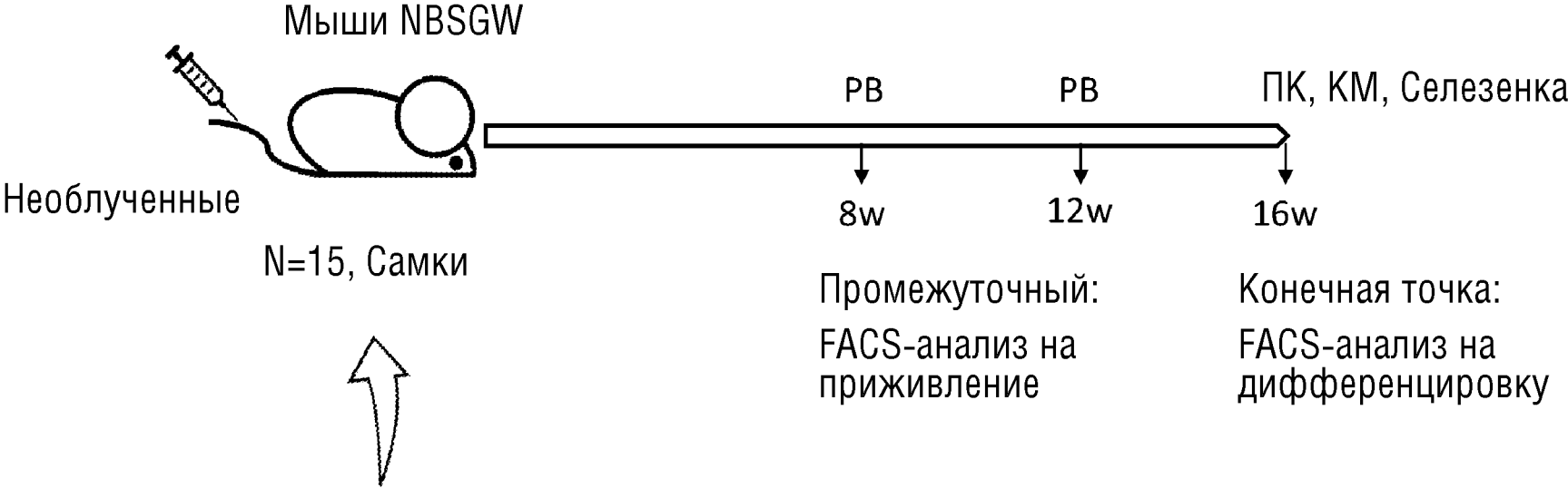




ФИГ.10

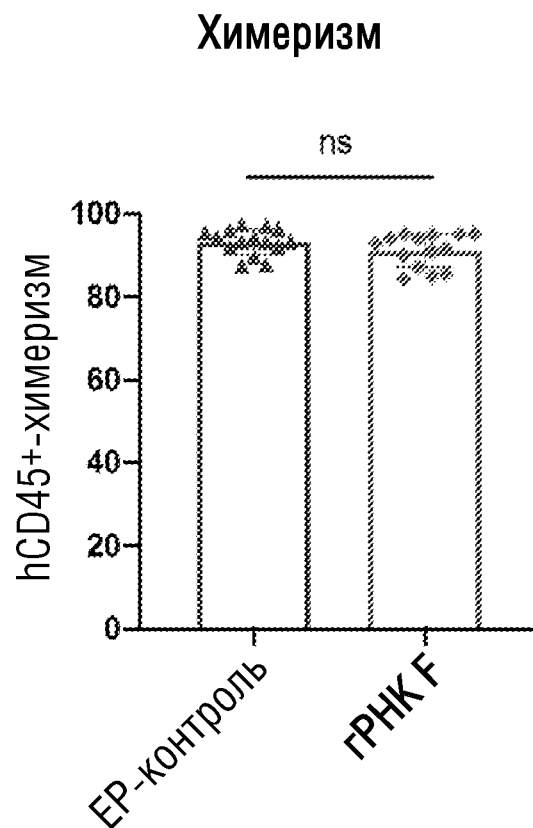


ФИГ.11

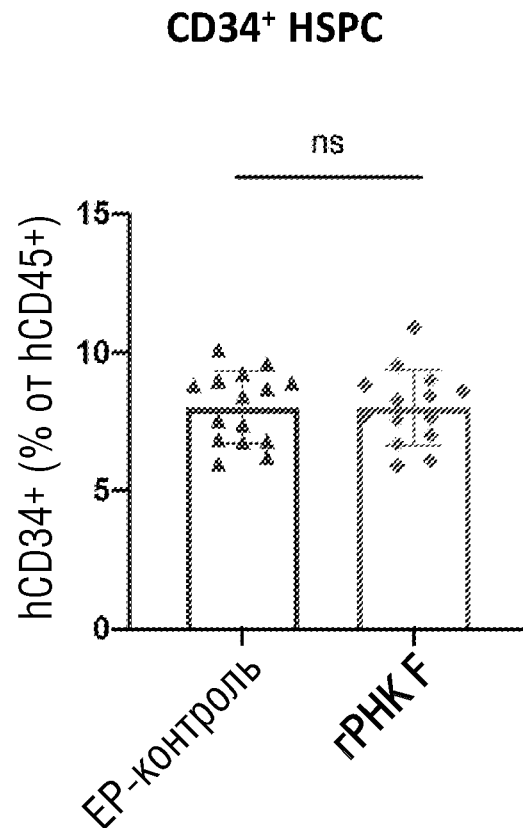


|                                                               |
|---------------------------------------------------------------|
| CD34 <sup>+</sup> HSPCs                                       |
| Только EP-контроль                                            |
| Отредактированные с использованием гРНК F CLL1 (все изоформы) |

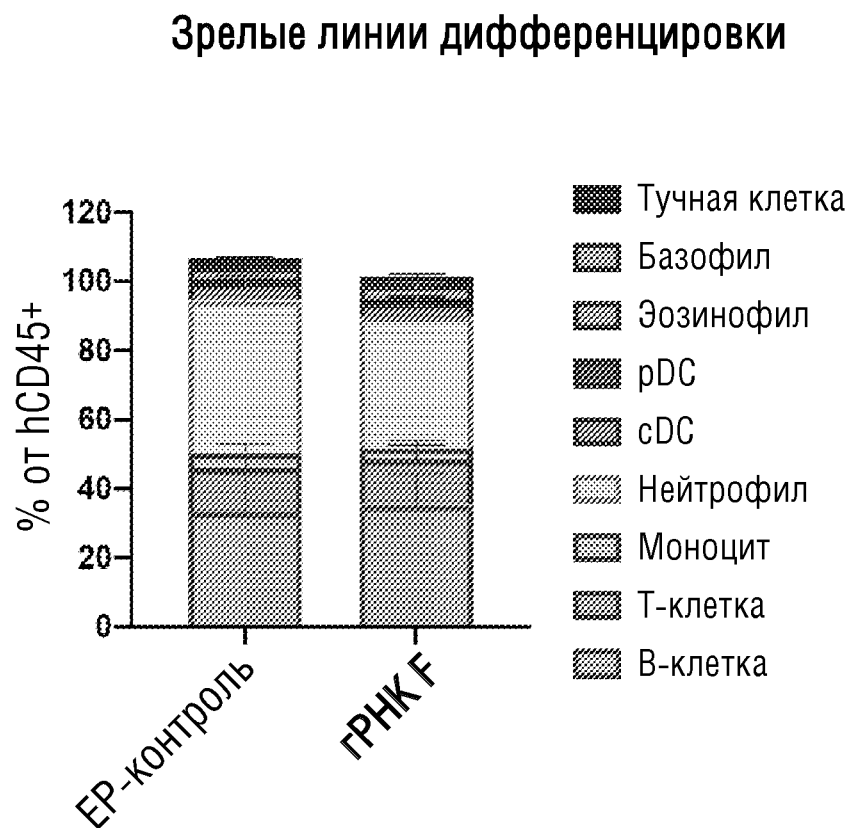
ФИГ.12А



ФИГ.12В



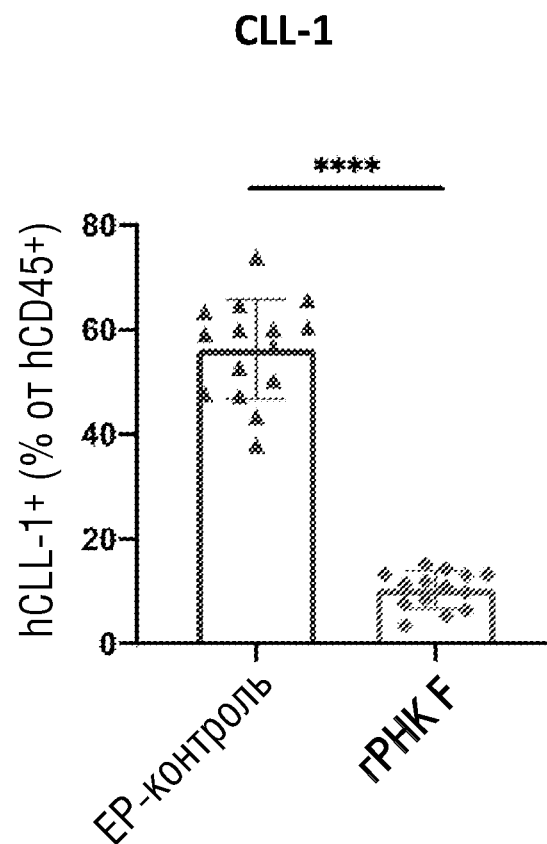
ФИГ.12С



13/20

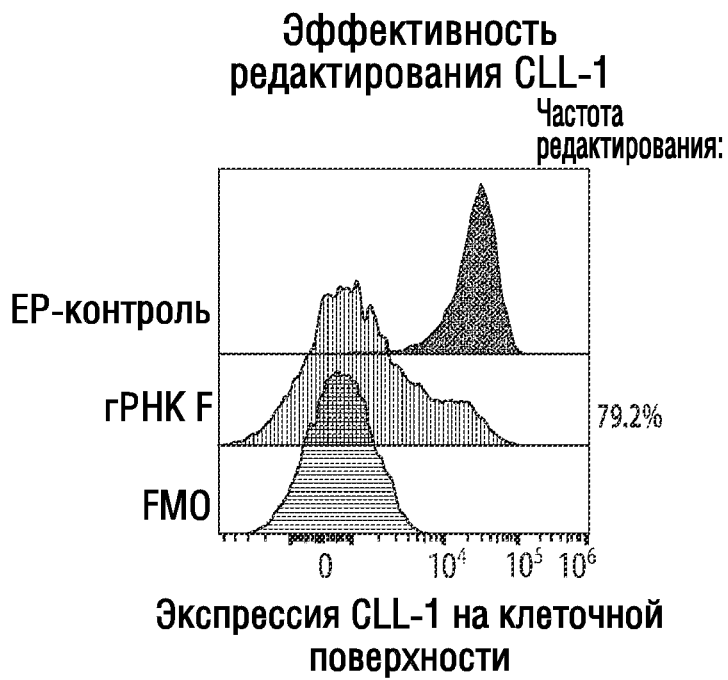
Анализ костного мозга через 16 недель после приживления  
N=15, среднее ± ст.от.; непарный однофакторный ANOVA

ФИГ.12D

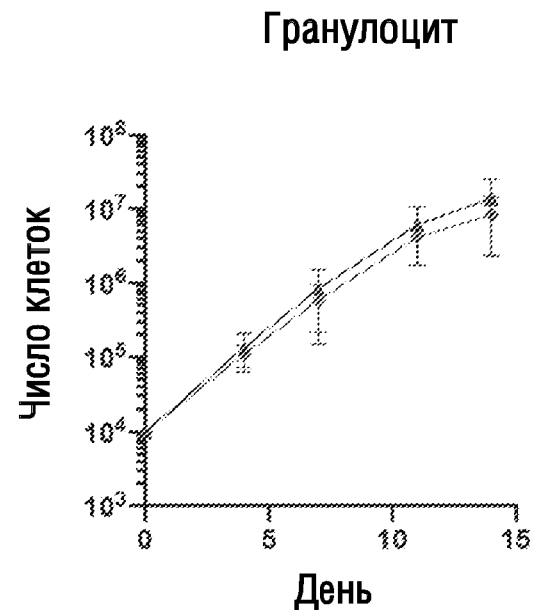


Анализ костного мозга через 16 недель после приживления  
N=15, среднее  $\pm$  ст.от.; непарный однофакторный ANOVA

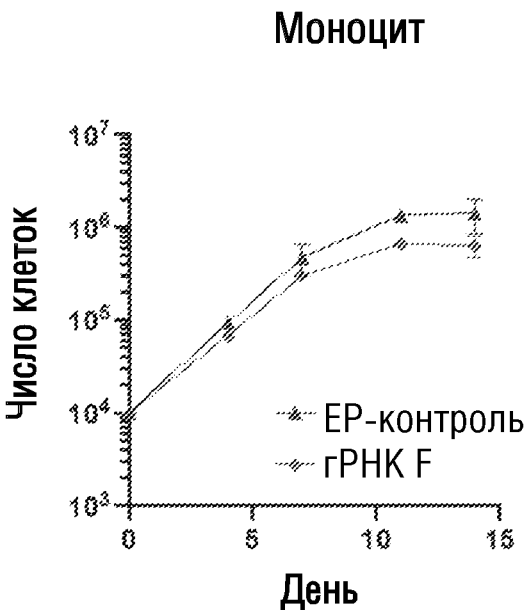
ФИГ.13А



ФИГ.13В

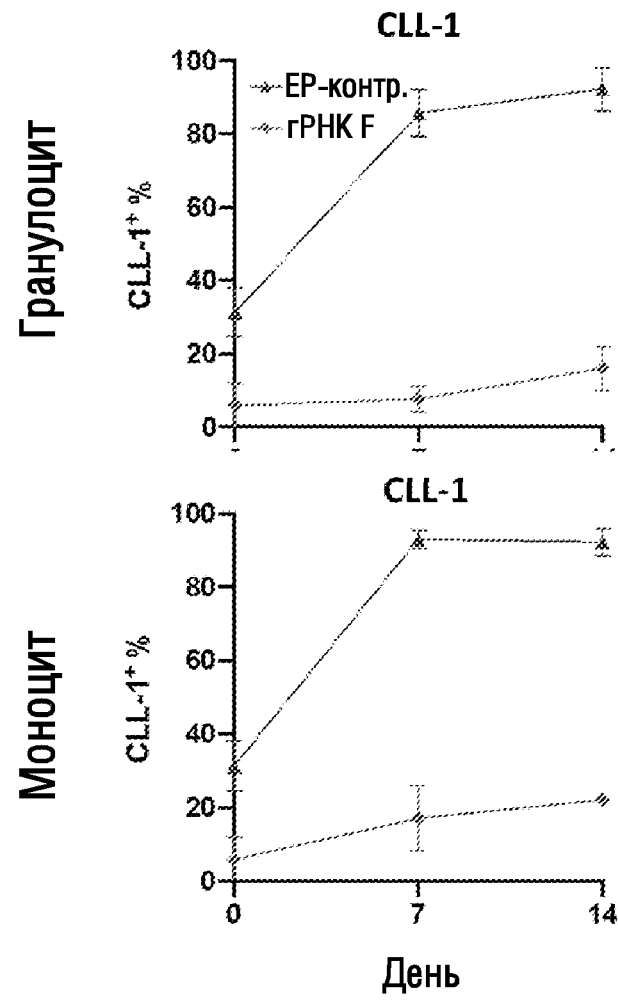


ФИГ.13С

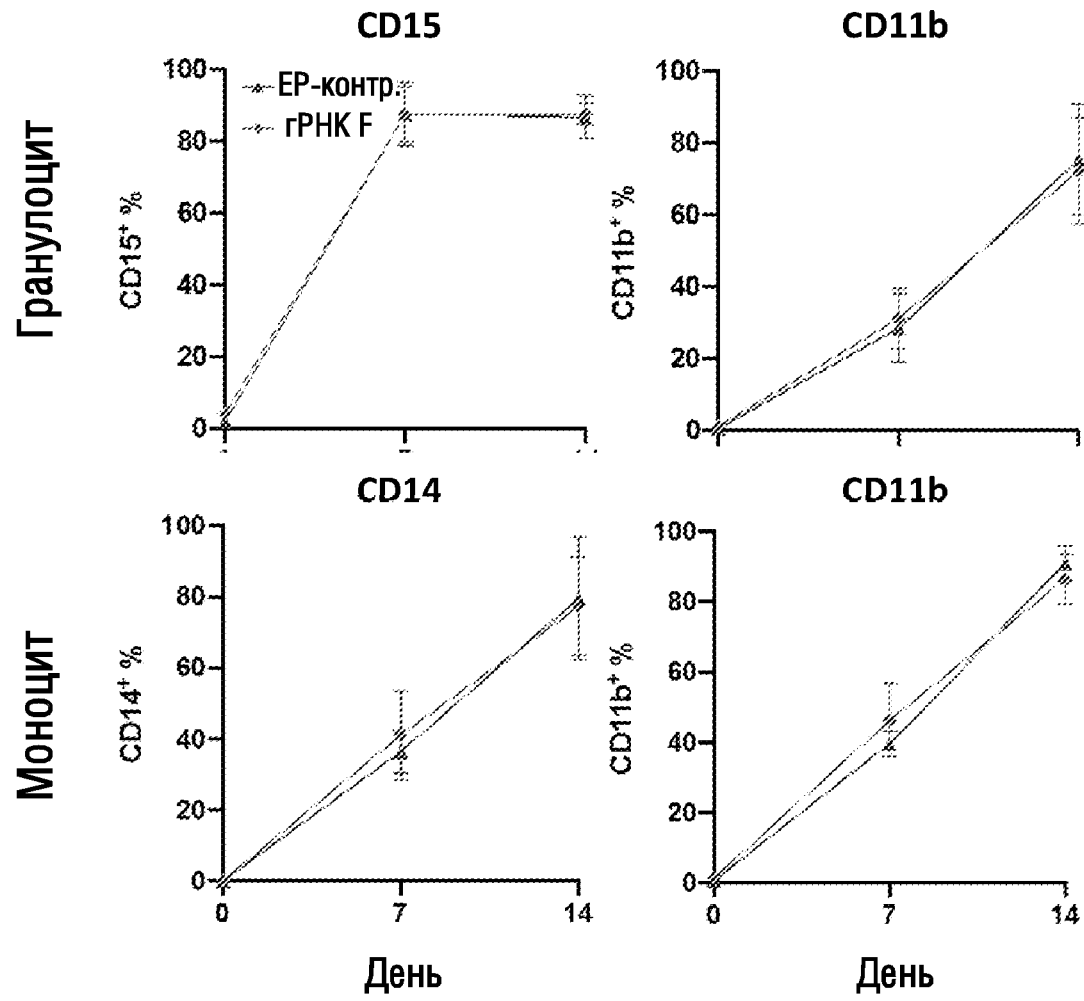


N=2, среднее ± ст.от.

ФИГ.14А

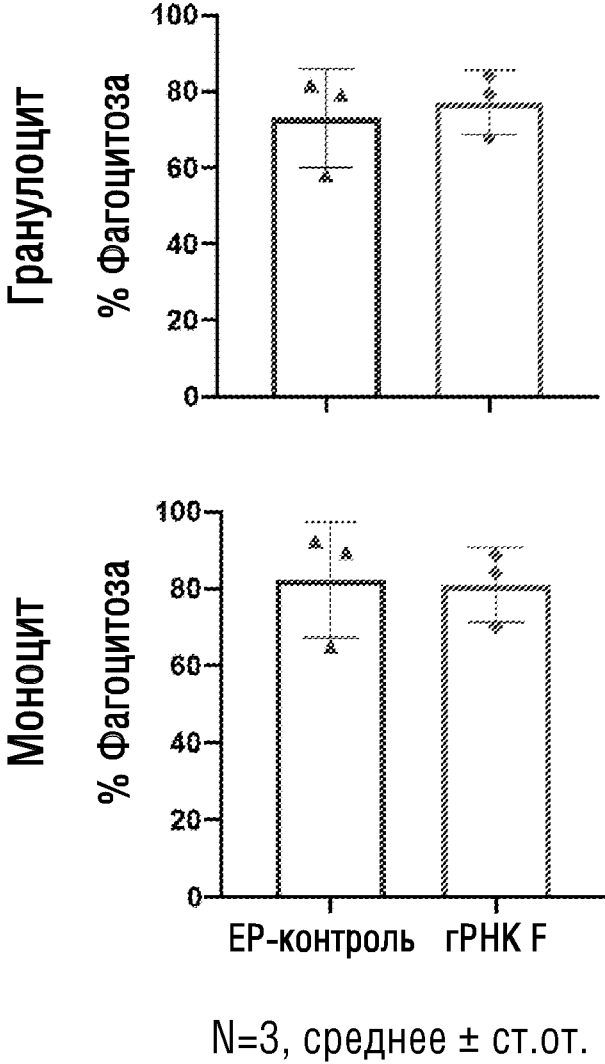


ФИГ.14В



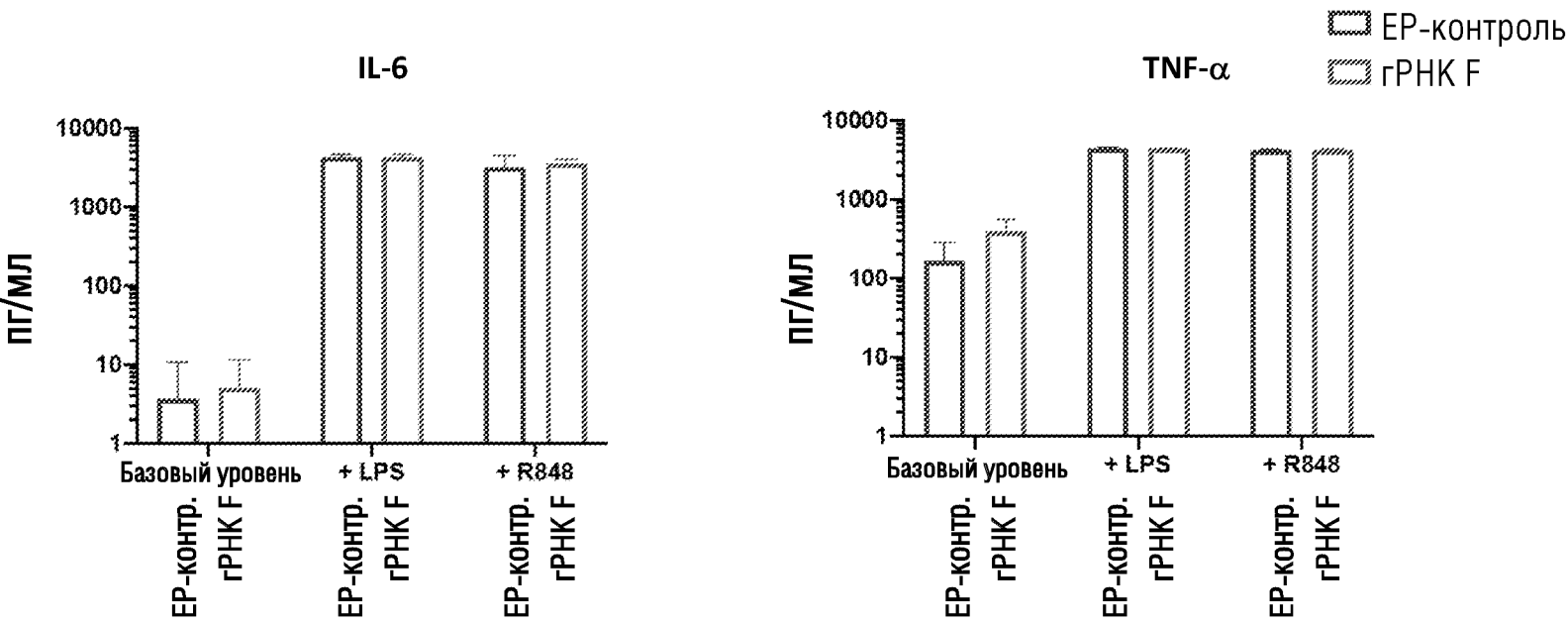
N=3, среднее ± ст.от.

ФИГ.15



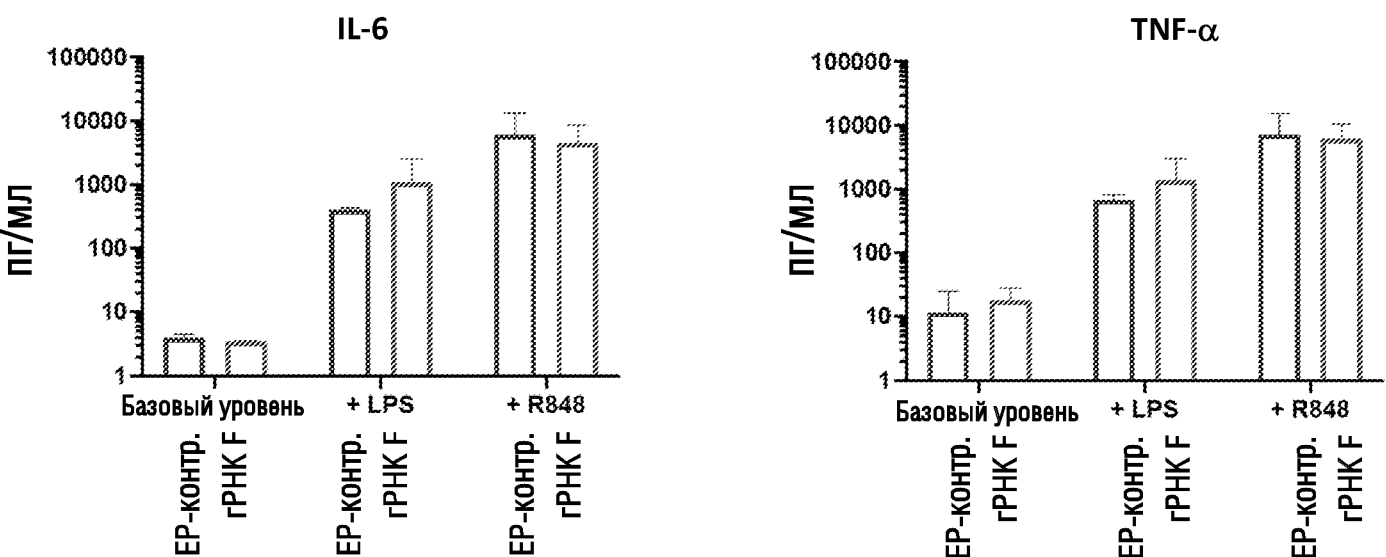
ФИГ.16А

Гранулоцит



ФИГ.16В

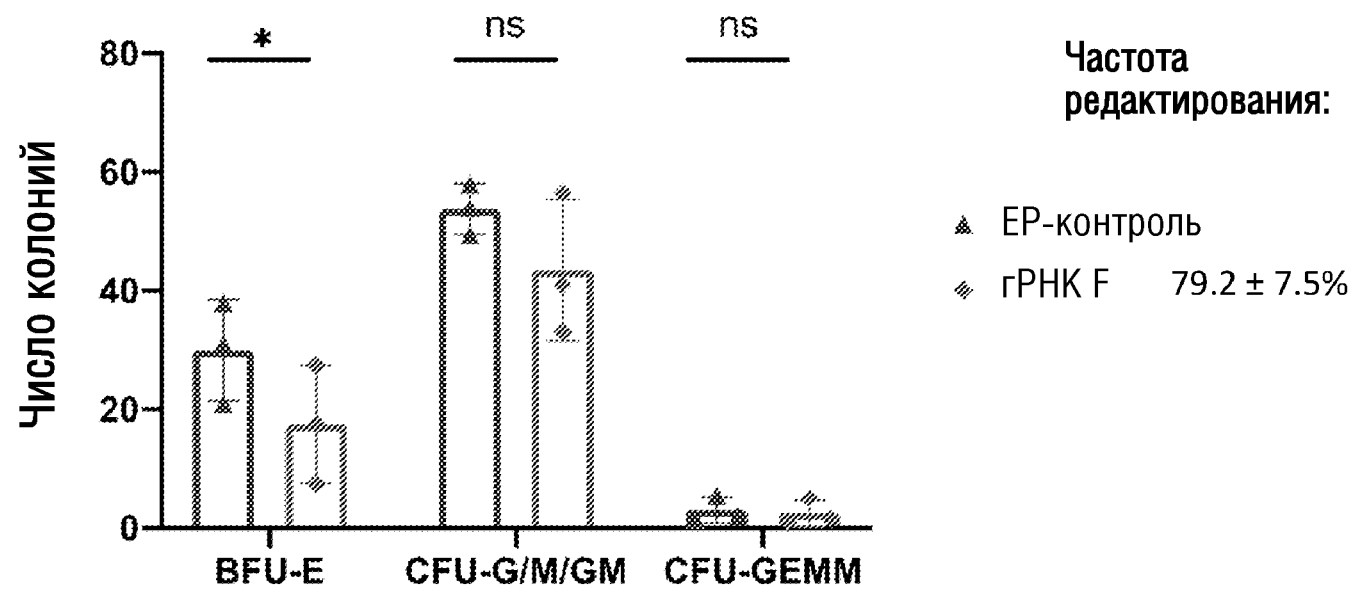
Моноцит



N=2, среднее ± ст.от.

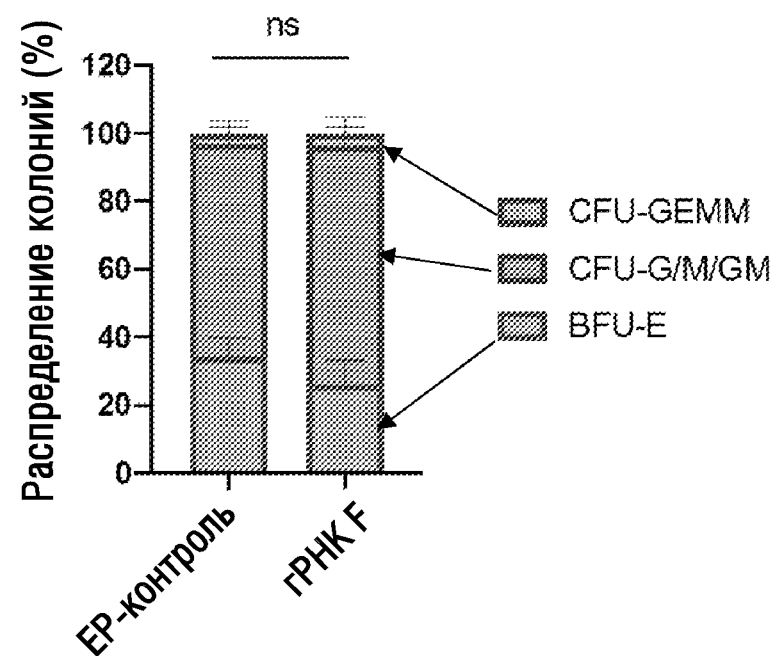


ФИГ.17А



Непарный однофакторный ANOVA

ФИГ.17В



Парный двухфакторный ANOVA

N=3, среднее  $\pm$  ст.от.