

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291333** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.07.06**

(51) Int. Cl. **C12N 15/113 (2010.01)**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.08.28**

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ МОДИФИКАЦИИ CD123**

(31) **62/892,888; 62/962,135**

(32) **2019.08.28; 2020.01.16**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/048623**

(87) **WO 2021/041977 2021.03.04**

(71) Заявитель:  
**ВОР БАЙОФАРМА ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

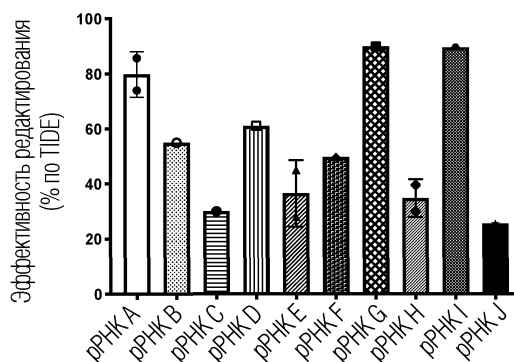
**Лайдерд Джон, Ло Чун, Мишра Бибху  
Прасад, Лин Мишель (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится, например, к новым клеткам, имеющим модификацию (например, инсерцию или делецию) в эндогенном гене CD123. Настоящее изобретение также относится к композициям, например рРНК, которые могут быть использованы для осуществления такой модификации.

Эффективность редактирования



N = 1-2

**A1**

**202291333**

**202291333**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-573339EA/030

### **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ МОДИФИКАЦИИ CD123**

#### **Родственные заявки**

В настоящей заявке испрашивается приоритет заявки на патент США под регистрационным номером: 62/892888, поданной 28 августа 2019 г., и заявки на патент США под регистрационным номером: 62/962135, 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 26 августа 2020 года, называется V0291\_70006WO00\_SL.txt и имеет размер 77025 байта.

#### **Предпосылки создания изобретения**

Когда онкологическому больному назначают противораковую терапию против CD123, то такая терапия может приводить к истощению не только раковых CD123<sup>+</sup>-клеток, но также и незлокачественных CD123<sup>+</sup>-клеток, и может давать эффект, направленный «на другую мишень, но не на опухоль». Поскольку некоторые гемопоэтические клетки обычно экспрессируют CD123, то потеря нераковых CD123<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 CD123. Эти CD123-модифицированные клетки могут быть резистентными к противораковой терапии, направленной против CD123, и, следовательно, могут повторно заселять кроветворную систему во время или после терапии против CD123.

#### **Сущность изобретения**

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится, например, к новым клеткам, имеющим модификацию (например, замену, инсерцию или делецию) в эндогенном гене CD123. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение также относится к композициям, например, рНК, 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 рНК, полученных для создания генетически сконструированных клеток, например, клеток, имеющих модификацию эндогенного гена CD123. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к способам введения описанных здесь генетически сконструированных клеток, например, клеток, имеющих модификацию эндогенного гена CD123, 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 CD123, или нуждающихся в такой

противораковой терапии.

***Перечисленные варианты осуществления изобретения***

1. рРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью, указанным в Таблице 1 (например, с доменом-мишенью любой из SEQ ID NO: 1-20 или 40-47).

2. рРНК, 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 40-47).

3. рРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью любой из SEQ ID NO: 1-8 или 10, или SEQ ID NO: 11-18 или 20.

4. рРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью SEQ ID NO: 9.

5. рРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью SEQ ID NO: 19, где нацеливающий домен не содержит SEQ ID NO: 9.

6. рРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью SEQ ID NO: 19, где нацеливающий домен имеет длину по меньшей мере 21 нуклеотид.

7. рРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью SEQ ID NO: 20.

8. Руководящая РНК в соответствии с вариантом 5а, 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.

9. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов осуществления изобретения, где нацеливающий домен содержит 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.

10. рРНК 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.

11. рРНК 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.

12. рРНК 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.

13. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 21.

14. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 22.

15. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 23.

16. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 24.

17. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 25.

18. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 26.

19. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27.

20. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 28.

21. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 29.

22. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 30.

23. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 48.

24. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 49.

25. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 50.

26. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 51.

27. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность, представленную в Таблице 2 или 6.

28. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность, представленную в Таблице 8 (например, нацеливающий домен любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 44, 46, 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158).

29. рРНК, содержащая нацеливающий домен, способный управлять расщеплением или редактированием домена-мишени, представленного в Таблице 2 (например, домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 44, 46, 48).

30. рРНК, содержащая нацеливающий домен, способный управлять расщеплением или редактированием домена-мишени, представленного в Таблице 6 (например, домена-

мишени любой из SEQ ID NO: 8, 11, 14 или 66-258).

31. рРНК, содержащая нацеливающий домен, способный управлять расщеплением или редактированием домена-мишени, представленного в Таблице 6 (например, домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 44, 46, 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158).

32. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где домен-мишень находится в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5, экзоне 6, экзоне 7, экзоне 8, экзоне 9 или экзоне 10 последовательности CD123 SEQ ID NO: 31.

33. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где домен-мишень находится в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5, экзоне 6, экзоне 7, экзоне 8, экзоне 9, экзоне 10, экзоне 11 или экзоне 12 последовательности CD123 SEQ ID NO: 52.

34. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая представляет собой одноцепочечную руководящую РНК (оцрРНК).

35. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен имеет длину 16 нуклеотидов или более.

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

37. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 1-10, 21-30, 40, 42, 44, 46 или 48-51 или ее обратный комплемент или последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична любой из вышеуказанных последовательностей, или последовательность, которая имеет не более 1, 2 или 3 мутаций по сравнению с любой из вышеперечисленных последовательностей.

38. рРНК согласно варианту 37, где 2 мутации не являются смежными друг с другом.

39. рРНК согласно варианту 37, где ни одна из 3 мутаций не является смежной друг с другом.

40. рРНК согласно любому из вариантов 37-39, где 1, 2 или 3 мутации представляют собой замены.

41. рРНК согласно любому из вариантов 37-39, где одна или несколько мутаций представляют собой инсерцию или делецию.

42. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 44 или 46.

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

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

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

46. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий



66. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 26.

67. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27.

68. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 28.

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

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

71. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 48.

72. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 49.

73. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 50.

74. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 51.

75. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где нацеливающий домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 247 или 297-461.

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

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

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

79. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая связывается с молекулой Cas9.

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

81. pРНК согласно любому из вариантов 1-80, которая связывается с tracr-РНК.

82. pРНК согласно любому из вариантов 1-80, которая содержит последовательность остова.

83. pРНК 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.

84. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит первый комплементарный домен.

85. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит связывающий домен.

86. pРНК согласно варианту 84 или 85, которая содержит второй комплементарный домен, комплементарный первому комплементарному домену.

87. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит проксимальный домен.

88. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, которая содержит хвостовой домен.

89. pРНК согласно любому из вариантов 83-88, 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.

90. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где pРНК имеет частоту редактирования, оцененную с помощью ICE 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.

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

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

93. pРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где pРНК 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.

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

95. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где рРНК 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.

96. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где рРНК 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.

97. рРНК согласно любому из предшествующих вариантов, где рРНК 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.

98. Набор или композиция, содержащие:

а) рРНК согласно любому из вариантов 1-97 или нуклеиновую кислоту, кодирующую рРНК, и

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

99. Набор или композиция согласно варианту 98, где первая рРНК включает нацеливающий домен, содержащий последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7).

100. Набор или композиция согласно варианту 98, где первая рРНК включает нацеливающий домен, содержащий последовательность AGTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9).

101. Набор или композиция согласно варианту 98-100, где вторая рРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный для линии дифференцировки.

102. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-101, где вторая рРНК нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и отличающийся от CD123.

103. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-102, где вторая рРНК нацелена на CD33, например, где вторая рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64).

104. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-102, где вторая

pPHK нацелена на CLL-1 (например, где вторая pPHK содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 65).

105. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-104, где вторая pPHK содержит нацеливающий домен, содержащий последовательность, представленную в Таблице А.

106. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-105, где pPHK согласно (а) содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7), а вторая pPHK содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность AGTTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9).

107. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-105, где pPHK согласно (а) содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7), а вторая pPHK содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64).

108. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-105, где pPHK согласно (а) содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7), а вторая pPHK содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 65).

109. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-105, где pPHK согласно (а) содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность AGTTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9), а вторая pPHK содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64).

110. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-105, где pPHK согласно (а) содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность AGTTCCCACACATCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9), а вторая pPHK содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 65).

111. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-110, которые дополнительно содержат третью pPHK или нуклеиновую кислоту, кодирующую третью pPHK.

112. Набор или композиция согласно варианту 111, где третья pPHK нацелена на антиген клеточной поверхности, специфичный для линии дифференцировки.

113. Набор или композиция согласно варианту 111, где третья pPHK нацелена на CD33, CLL-1 или CD123.

114. Набор или композиция согласно любому из вариантов 111-113, где pPHK согласно (а) содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7), вторая pPHK содержит нацеливающий

домен, который содержит последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64), а третья рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 65).

115. Набор или композиция согласно любому из вариантов 111-113, где рРНК согласно (а) содержит нацеливающий домен, содержащий последовательность AGTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9), вторая рРНК содержит нацеливающий домен, содержащий последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64), а третья рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 65).

116. Набор или композиция согласно любому из вариантов 111-113, где рРНК согласно (а) содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7), вторая рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность AGTTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9), а третья рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 65).

117. Набор или композиция согласно любому из вариантов 111-113, где рРНК согласно (а) содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7), вторая рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность AGTTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9), а третья рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64).

118. Набор или композиция согласно любому из вариантов 111-117, которые дополнительно содержат четвертую рРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую четвертую рРНК.

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

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

121. Набор или композиция согласно любому из вариантов 118-120, где рРНК согласно (а) содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7), вторая рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность AGTTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9), третья рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 64), а четвертая рРНК содержит нацеливающий домен, который содержит последовательность GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 65).

122. Набор или композиция согласно любому из вариантов 118-121, где рРНК согласно (а), вторая рРНК, третья рРНК и четвертая рРНК являются смешанными.

123. Набор или композиция согласно любому из вариантов 118-121, где рРНК согласно (а), вторая рРНК, третья рРНК и четвертая рРНК находятся в отдельных

контейнерах.

124. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-121, где рРНК (а) и (b) являются смешанными.

125. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-121, где (а) и (b) находятся в отдельных контейнерах.

126. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-125, где нуклеиновая кислота (а) и нуклеиновая кислота (b) являются частью одной и той же нуклеиновой кислоты.

127. Набор или композиция согласно любому из вариантов 98-125, где нуклеиновая кислота (а) и нуклеиновая кислота (b) представляют собой отдельные нуклеиновые кислоты.

128. 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: 1-10, 40, 42, 44 или 46); и

(b) вторую мутацию в гене, кодирующем антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и отличающийся от CD123.

129. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 1.

130. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 2.

131. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 3.

132. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 4.

133. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 5.

134. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 6.

135. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 7.

136. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 8.

137. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 9.

138. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 10.

139. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 40.

140. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту

128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 42.

141. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 44.

142. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени SEQ ID NO: 46.

143. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени, представленном в любой из Таблиц 2 или 6.

144. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно варианту 128, где мутация (а) присутствует в домене-мишени, представленном в Таблице 8 (например, в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 44, 46, 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158).

145. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 128-144, где мутация (а) включает инерцию, делецию или замену (например, модификацию по одному нуклеотиду).

146. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 145, где делеция полностью находится в пределах домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20 или 40-47.

147. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 100, где длина делеции составляет 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17 нуклеотидов.

148. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 145, где делеция имеет одну или обе конечные точки за пределами домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20 или 40-47.

149. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 145-148, где мутация приводит к сдвигу рамки считывания.

150. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 145-148, где вторая мутация включает инсерцию, делецию или замену (например, модификацию одного нуклеотида).

151. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 145-148, которая содержит инсерцию 1 или 2 нуклеотидов или делецию 1 нуклеотида, 2 нуклеотидов, 3 нуклеотидов или 4 нуклеотидов в CD123.

152. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 145-148, которая содержит описанную здесь инсерцию-делецию, например, инсерцию-делецию, продуцированную или продуцируемую посредством описанной здесь рРНК (например, любой из рРНК А, рРНК G, рРНК I, рРНК N3, рРНК P3, рРНК S3 или рРНК D1).

153. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка согласно любому из вариантов 145-148, которая содержит инсерцию-делецию, продуцированную или продуцируемую посредством описанной здесь системы CRISPR, например, способом, описанным в Примерах 1, 2, 3 или 4.

154. Применение рРНК согласно любому из вариантов 1-97 или композиции или

набора согласно любому из вариантов 98-127 для снижения уровня экспрессии CD123 в образце гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников с использованием системы CRISPR/Cas9.

155. Применение системы CRISPR/Cas9 для снижения уровня экспрессии CD123 в образце гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, где рПНК системы CRISPR/Cas9 представляет собой рПНК согласно любому из вариантов 1-98 или рПНК композиции или набора согласно любому из вариантов 98-127.

156. 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) руководящей РНК (рПНК) согласно любому из вариантов 1-98 или рПНК композиции или набора согласно любому из вариантов 98-127; и (b) эндонуклеазы, которая связывается с рПНК (например, молекулы Cas9), и

тем самым получение генетически сконструированной клетки.

157. 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) рПНК согласно любому из вариантов 1-97 или рПНК композиции или набора согласно любому из вариантов 98-127; и (b) молекулы Cas9, которая связывается с рПНК, и

тем самым получение генетически сконструированной клетки.

158. Способ или применение согласно любому из вариантов 154-157, которые приводят к получению генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, имеющей пониженный уровень экспрессии CD123 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

159. Способ или применение согласно любому из вариантов 154-158, которые приводят к получению генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, имеющей пониженный уровень экспрессии CD123, составляющий менее, чем 20% от уровня CD123 в клетке-аналоге дикого типа.

160. Способ или применение согласно любому из вариантов 154-159, которые осуществляют с использованием множества гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников.

161. Способ или применение согласно любому из вариантов 154-160, которые осуществляют с использованием клеточной популяции, включающей множество гемопоэтических стволовых клеток и множество гемопоэтических клеток-предшественников.

162. Способ или применение согласно любому из вариантов 154-161, которые приводят к получению клеточной популяции согласно любому из вариантов 284-386 или

389-391.

163. Способ согласно любому из вариантов 156-162, где нуклеиновые кислоты (a) и (b) кодируются на одном векторе, который вводят в клетку.

164. Способ согласно варианту 163, где вектор представляет собой вирусный вектор.

165. Способ согласно любому из вариантов 156-163, где (a) и (b) вводят в клетку в виде предварительно полученного рибонуклеопротеинового комплекса.

166. Способ согласно варианту 165, где рибонуклеопротеиновый комплекс вводят в клетку посредством электропорации.

167. Способ согласно любому из вариантов 156-166, 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.

168. Способ согласно любому из вариантов 162-167, где клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) представляет собой CD34<sup>+</sup>-клетку.

169. Способ согласно любому из вариантов 162-168, 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 рРНК в клетки.

170. Способ согласно любому из вариантов 162-169, где по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 98% клеток в популяции являются жизнеспособными через 48 часов после введения рРНК в клетки.

171. Способ согласно любому из вариантов 162-170, где гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник происходят из клеток костного мозга или мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) индивидуума.

172. Способ согласно любому из вариантов 162-171, где индивидуум страдает расстройством системы кроветворения, например, злокачественным новообразованием кроветворной системы, например, лейкозом (например, ОМЛ), новообразованием бластных плазмацитоидных дендритных клеток (НБПДК), острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) или ретикулоэндотелиозом.

173. Способ согласно любому из вариантов 162-172, где индивидуум страдает расстройством системы кроветворения, например, злокачественным новообразованием кроветворной системы, например, лейкозом, например, ОМЛ.

174. Способ согласно любому из вариантов 162-172, где индивидуум страдает гематологическим заболеванием, например, предраковым состоянием, например, миелодисплазией, миелодиспластическим синдромом (МДС) или предлейкозом.

175. Способ согласно любому из вариантов 162-174, где индивидуум страдает раком, клетки которого экспрессируют CD123 (например, где по меньшей мере множество раковых клеток экспрессируют CD123).

176. Способ или применение согласно любому из вариантов 154-175, которые приводят к мутации, вызывающей пониженный уровень экспрессии CD123 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

177. Способ или применение согласно любому из вариантов 154-176, которые приводят к мутации, вызывающей пониженный уровень экспрессии CD123 дикого типа по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

178. Способ или применение согласно любому из вариантов 154-177, которые позволяют получить генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник, имеющую пониженный уровень экспрессии CD123 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

179. Способ или применение согласно любому из вариантов 154-178, которые позволяют получить генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник, имеющую пониженный уровень экспрессии CD123 дикого типа по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

180. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, полученная способом согласно любому из вариантов 154-179.

181. Нуклеиновая кислота (например, ДНК), кодирующая рРНК согласно любому из вариантов 1-97.

182. 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.

183. 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: 8, 11, 14, или 66-258), например, где мутация является результатом генной инженерии.

184. 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, 44, 46, 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158), например, где мутация является результатом генной инженерии.

185. 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 40-47).

186. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 185, 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: 1, 7 или 9.

187. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 185, где мутация

находится в пределах 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов, расположенных ниже SEQ ID NO: 9.

188. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 185, где мутация находится в пределах 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов, расположенных выше SEQ ID NO: 9.

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

190. 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 CD123 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

191. 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 CD123, который составляет менее 20% от уровня CD123 в соответствующей клетке дикого типа.

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

193. 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 CD123 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

194. 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 CD123, который составляет менее 20% от уровня CD123 в соответствующей клетке дикого типа.

195. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 3.

196. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 3, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

197. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 3, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123, который составляет менее 20% от уровня CD123 в соответствующей клетке дикого типа.

198. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 4.

199. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 4, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 по сравнению с





соответствующей клеткой дикого типа.

224. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 42, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123, который составляет менее 20% от уровня CD123 в соответствующей клетке дикого типа.

225. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 44.

226. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 44, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

227. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 44, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123, который составляет менее 20% от уровня CD123 в соответствующей клетке дикого типа.

228. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 46.

229. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 46, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

230. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 46, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123, который составляет менее 20% от уровня CD123 в соответствующей клетке дикого типа.

231. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 44, 46, 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158.

232. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 44, 46, 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 по сравнению с соответствующей клеткой дикого типа.

233. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, содержащая мутацию в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 44, 46, 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123, который составляет менее 20% от уровня CD123 в соответствующей клетке дикого типа.

234. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая

клетка или клетка-предшественник), содержащая мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 20.

235. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник), содержащая мутацию в пределах 20 нуклеотидов (выше или ниже) домена-мишени SEQ ID NO: 20.

236. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 182-235, содержащая предсказанный сайт, не являющийся мишенью, который не содержит мутации или модификации последовательности по сравнению с последовательностью сайта до редактирования гена CD123.

237. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 182-236, содержащая два предсказанных сайта, не являющихся мишенью, которые не содержат мутации или модификации последовательности по сравнению с последовательностью сайта до редактирования гена CD123.

238. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 182-237, 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 CD123.

239. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-238, 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.

240. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-238, которая не содержит мутации в любом сайте в геноме человека, имеющем 1 ошибочное спаривание по сравнению с доменом-мишенью.

241. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-240, которая не содержит мутации в любом сайте в геноме человека, имеющем 1 или 2 ошибочных спариваний по сравнению с доменом-мишенью.

242. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-241, которая не содержит мутации в любом сайте в геноме человека, имеющем 1, 2 или 3 ошибочных спариваний по сравнению с доменом-мишенью.

243. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-242, которая не содержит мутации в любом сайте в геноме человека, имеющем 1, 2, 3 или 4 ошибочных спариваний по сравнению с доменом-мишенью.

244. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 239-243, где мутация включает инсерцию, делецию или замену (например, модификацию по одному нуклеотиду).

245. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 244, где делеция полностью находится в пределах домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20, 40-47, 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158.

246. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 244-245, где длина делеции составляет 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17 нуклеотидов.

247. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 244, где делеция имеет одну или обе конечные точки за пределами домена-мишени любой из SEQ ID NO: 1-20, 40-47, 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158.

248. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-247, где мутация приводит к сдвигу рамки считывания.

249. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-248, где мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 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).

250. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-249, где клетка имеет пониженный уровень белка CD123 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 128-153, 180 или 182-250, которая не экспрессирует CD123.

252. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-251, где мутация приводит к отсутствию экспрессии CD123.

253. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-252, которая экспрессирует менее, чем 20% CD123, экспрессируемого соответствующей клеткой дикого типа.

254. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-253, где пониженный уровень экспрессии CD123 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.

255. Генетически сконструированная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник) согласно варианту 254, где клетка, дифференцированная из гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, представляет собой миелобласт, моноцит или миелоидную дендритную клетку.

256. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-253, представляющая собой CD34<sup>+</sup>-клетку.

257. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-

153, 180 или 182-256, полученная из клеток костного мозга или моноклеарных клеток периферической крови индивидуума.

258. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 257, где индивидуумом является человек, страдающий злокачественным новообразованием кроветворной системы, например, ОМЛ.

259. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 257, где индивидуумом является человек, страдающий гематологическим заболеванием, например, предраковым состоянием, например, миелодисплазией, миелодиспластическим синдромом (МДС) или предлейкозом.

260. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 257-259, где индивидуум страдает раком, клетки которого экспрессируют CD123 (например, где по меньшей мере множество раковых клеток экспрессируют CD123).

261. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 257, где индивидуум является здоровый человек-донор (например, HLA-совместимый донор).

262. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-261, 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 CD123.

263. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-262, которая дополнительно содержит рРНК (например, одноцепочечную руководящую РНК), специфичную к CD123, или нуклеиновую кислоту, кодирующую рРНК.

264. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 263, где рРНК представляет собой описанную здесь рРНК, например, рРНК согласно любому из вариантов 1-98.

265. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-264, 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).

266. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-264, 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).

267. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-266, в которой обе копии CD123 являются мутантными.

268. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 267, где обе копии CD123 имеют одинаковую мутацию.

269. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 267, где копии CD123 имеют различные мутации.

270. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-269, содержащая первую копию CD123, имеющую первую мутацию, и вторую копию CD123, имеющую вторую мутацию, где первая и вторая мутации являются различными.

271. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 270, где первая копия CD123 содержит первую делецию.

272. Генетически сконструированная клетка согласно варианту 270 или 271, где вторая копия CD123 содержит вторую делецию.

273. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 270-272, где первая и вторая делеции перекрываются.

274. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 270-273, где конечная точка первой делеции находится внутри второй делеции.

275. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 270-274, где обе конечные точки первой делеции находятся внутри второй делеции.

276. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 270-272, где первая и вторая делеции имеют общую конечную точку.

277. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-276, где каждая первая и вторая мутации независимо выбраны из: инсерции 1 нуклеотида или 2 нуклеотидов или делеции 1 нуклеотида, 2 нуклеотидов, 3 нуклеотидов или 4 нуклеотидов.

278. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-277, которая способна образовывать колонию BFU-E, колонию CFU-G, колонию CFU-M, колонию CFU-GM или колонию CFU-GEMM.

279. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-278, которая способна продуцировать цитокин, например, воспалительный цитокин, например, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  или MIP-1 $\alpha$ .

280. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-279, 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 CD123-содержащую клетку дикого типа.

281. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-280, 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 CD123-содержащую клетку дикого

типа.

282. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 279-281, которая способна продуцировать цитокин при ее моделировании с помощью агониста TLR, например, LPS или R848, например, как описано в Примере 5.

283. Генетически сконструированная клетка согласно любому из вариантов 279-281, которая способна к фагоцитозу.

284. Популяция клеток, содержащая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283 (например, включающая гемопоэтические стволовые клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или их комбинацию).

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

286. 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 CD123 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

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 CD123, составляющему менее 20% от уровня CD123 в популяции 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: 2.

289. 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 CD123 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

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 CD123, составляющему менее 20% от уровня CD123 в популяции 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: 3.

292. 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





мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 10.

313. 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 CD123 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

314. 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 CD123, составляющему менее 20% от уровня CD123 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

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

316. 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 CD123 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

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 CD123, составляющему менее 20% от уровня CD123 в популяции 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: 42.

319. 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 CD123 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

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 CD123, составляющему менее 20% от уровня CD123 в популяции 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: 44.

322. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 44, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

323. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 44, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123, составляющему менее 20% от уровня CD123 в популяции 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: 46.

325. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 46, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

326. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени SEQ ID NO: 46, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123, составляющему менее 20% от уровня CD123 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

327. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158.

328. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 по сравнению с популяцией соответствующих клеток дикого типа.

329. Популяция клеток, включающая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, которые содержат мутацию в домене-мишени любой из SEQ ID NO: 66-71, 73, 76, 77, 79-82, 85, 87, 88, 122, 133, 134, 135, 141-144, 153, 157 или 158, где такая мутация приводит к снижению уровня экспрессии CD123, составляющему менее 20% от уровня CD123 в популяции соответствующих клеток дикого типа.

330. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-320, где популяция клеток может дифференцироваться в клетки определенного типа, которые экспрессируют

CD123 на более низком уровне по сравнению с уровнем CD123, экспрессируемого теми же самыми дифференцированными клетками, которые происходят от гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников дикого типа, содержащих CD123.

331. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-330, где гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники сконструированы так, чтобы происходящие от них миелоидные клетки-предшественники имели дефицит уровней CD123 по сравнению с миелоидными клетками-предшественниками, происходящими от CD123-содержащих гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников дикого типа.

332. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-330, где гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники сконструированы так, чтобы происходящие от них миелоидные клетки (миелоидные клетки на конечной стадии дифференцировки) имели дефицит уровней CD123 по сравнению с миелоидными клетками (миелоидными клетками на конечной стадии дифференцировки), происходящими от CD123-содержащих гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников дикого типа.

333. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-332, которая дополнительно включает одну или более клеток, которые содержат один или более немодифицированных генов CD123.

334. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-333, которая дополнительно включает одну или более клеток, гомозиготных по CD123 дикого типа.

335. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-334, где приблизительно 0-1%, 1-2%, 2-5%, 5-10%, 10-15% или 15-20% клеток в популяции являются гомозиготными по CD123 дикого типа, например, гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники являются гомозиготными по CD123 дикого типа.

336. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-334, которая дополнительно содержит одну или более клеток, гетерозиготных по CD123, например, содержит одну копию CD123 дикого типа и одну копию мутантного CD123.

337. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-336, где приблизительно 0-1%, 1-2%, 2-5%, 5-10%, 10-15% или 15-20% клеток в популяции являются гетерозиготными по CD123 дикого типа, например, являются гемопоэтическими стволовыми клетками или клетками-предшественниками, которые содержат одну копию CD123 дикого типа и одну копию мутантного CD123.

338. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-337, где по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% копий CD123 в популяции являются мутантными.

339. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-338, которая содержит множество различных мутаций CD123, например, которая включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных мутаций.

340. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-339, которая содержит

по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных мутаций.

341. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-340, которая содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных инсерций.

342. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-341, которая содержит множество инсерций и множество делеций.

343. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-342, которая экспрессирует менее 20% CD123, экспрессируемого популяцией соответствующих клеток дикого типа.

344. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-343, где пониженный уровень экспрессии CD123 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.

345. Популяция клеток согласно варианту 344, где клетка, дифференцированная из гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, представляет собой миелобласт, моноцит или миелоидную дендритную клетку.

346. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-345, которая при ее введении индивидууму продуцирует hCD45<sup>+</sup>-клетки у индивидуума, например, как было проанализировано через 16 недель после введения.

347. Популяция клеток согласно варианту 346, 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 CD123-клетки дикого типа.

348. Популяция клеток согласно вариантам 346 или 347, 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 CD123-клетки дикого типа.

349. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-348, которая при ее введении индивидууму продуцирует CD34<sup>+</sup>-клетки у индивидуума, например, как было проанализировано через 16 недель после введения.

350. Популяция клеток согласно варианту 349, 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 CD123-клетки дикого типа.

351. Популяция клеток согласно вариантам 349 или 350, 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 CD123-клетки дикого типа.

352. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-351, 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.

353. Популяция клеток согласно варианту 352, 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 CD123-клетки дикого типа.

354. Популяция клеток согласно варианту 352 или 353, 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 CD123-клетки дикого типа.

355. Популяция клеток согласно любому из вариантов 352-354, где продуцируемые клетки детектируют в пробе крови, в образце костного мозга или в образце селезенки, взятых у индивидуума.

356. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-355, которая, при их введении индивидууму, сохраняется у индивидуума в течение по меньшей мере 8, 12 или 16 недель.

357. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-356, которая, при их введении индивидууму, обеспечивает восстановление клеток многих линий кроветворной системы.

358. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-357, которая продуцирует CD14<sup>+</sup>-клетки, например, как было проанализировано через 7 или 14 дней недель после генетической модификации.

359. Популяция клеток согласно варианту 358, 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 CD123-клетки дикого типа.

360. Популяция клеток согласно вариантам 358 или 359, 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 CD123-клетки дикого типа.

361. Популяция клеток согласно любому из вариантов 358-360, где уровни CD14<sup>+</sup>-клеток анализируют после культивирования *in vitro* в среде для дифференцировки миелоидных клеток.

362. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-361, которая продуцирует CD11b<sup>+</sup>-клетки, например, как было проанализировано через 7 или 14 дней недель после генетической модификации.

363. Популяция клеток согласно варианту 362, 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 CD123-клетки дикого типа.

364. Популяция клеток согласно вариантам 362 или 363, 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 CD123-клетки дикого типа.

365. Популяция клеток согласно любому из вариантов 358-364, где уровни CD11b<sup>+</sup>-клеток анализируют после культивирования *in vitro* в среде для дифференцировки миелоидных клеток.

366. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-365, которая продуцирует CD15<sup>+</sup>-клетки, например, как было проанализировано через 7 или 14 дней недель после генетической модификации.

367. Популяция клеток согласно варианту 366, которая продуцирует CD15<sup>+</sup>-клетки на уровнях, сравнимых с уровнями CD11b<sup>+</sup>-клеток, продуцируемых с использованием в остальном аналогичной популяции клеток, которые представляют собой CD123-клетки дикого типа.

368. Популяция клеток согласно вариантам 366 или 367, 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 CD123-клетки дикого типа.

369. Популяция клеток согласно любому из вариантов 358-368, где уровни CD15<sup>+</sup>-клеток анализируют после культивирования *in vitro* в среде для дифференцировки миелоидных клеток.

370. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-369, где наиболее распространенная мутация CD123 в клеточной популяции представляет собой инсерцию, например, инсерцию 1 нуклеотида, 2 нуклеотидов или 3 нуклеотидов.

371. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-370, где наиболее распространенная мутация в CD123 в клеточной популяции представляет собой инсерцию, например, инсерцию 1 нуклеотида.

372. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-370, где наиболее распространенная мутация в клеточной популяции в последовательности SEQ ID NO: 11 в CD123 представляет собой инсерцию, например, инсерцию 1 нуклеотида.

373. Популяция клеток согласно вариантам 284-370 или 372, которая дополнительно содержит делецию в 1 нуклеотид в последовательности SEQ ID NO: 11 в копии CD123.

374. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-370, где наиболее распространенная мутация в клеточной популяции в последовательности SEQ ID NO: 7 в CD123 представляет собой инсерцию, например инсерцию 1 нуклеотида.

375. Популяция клеток согласно вариантам 284-370 или 374, которая дополнительно содержит делецию 1 нуклеотида в последовательности SEQ ID NO: 7 в копии CD123.

376. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-370, где наиболее распространенная мутация в клеточной популяции в последовательности SEQ ID NO: 9 в CD123 представляет собой инсерцию, например, инсерцию в 1 нуклеотид.

377. Популяция клеток согласно вариантам 284-370 или 376, которая дополнительно содержит инсерцию 1 нуклеотида в последовательности SEQ ID NO: 9 в копии CD123.

378. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-370, где наиболее распространенная мутация в клеточной популяции в последовательности SEQ ID NO: 41 в CD123 представляет собой инсерцию, например, инсерцию 1 нуклеотида.

379. Популяция клеток согласно вариантам 284-370 или 378, которая дополнительно содержит делецию 2 нуклеотидов в последовательности SEQ ID NO: 41 в копии CD123.

380. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-370, где наиболее распространенная мутация в популяции клеток в последовательности SEQ ID NO: 43 в CD123 представляет собой инсерцию, например, инсерцию в 1 нуклеотид.

381. Популяция клеток согласно вариантам 284-370 или 380, которая дополнительно содержит делецию 7 нуклеотидов в последовательности SEQ ID NO: 43 в копии CD123.

382. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-370, где наиболее распространенная мутация в популяции клеток в последовательности SEQ ID NO: 44 в CD123 представляет собой инсерцию, например, инсерцию в 1 нуклеотид.

383. Популяция клеток согласно вариантам 284-370 или 382, которая дополнительно содержит делецию 2 нуклеотидов в последовательности SEQ ID NO: 44 в копии CD123.

384. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-370, где наиболее распространенная мутация в популяции клеток в последовательности SEQ ID NO: 46 в CD123 представляет собой инсерцию, например, инсерцию в 1 нуклеотид.

385. Популяция клеток согласно вариантам 284-370 или 384, которая дополнительно содержит делецию 5 нуклеотидов в последовательности SEQ ID NO: 46 в копии CD123.

386. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-385, которая включает гемопоэтические стволовые клетки и гемопоэтические клетки-предшественники.

387. Фармацевтическая композиция, содержащая генетически сконструированные гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники согласно любому из

вариантов 128-153, 180 или 182-283.

388. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток согласно любому из вариантов 284-386.

389. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-386, где по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 98% клеток в популяции являются жизнеспособными.

390. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-386 или 389, где по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или 90% копий CD123 содержат мутацию.

391. Популяция клеток согласно любому из вариантов 284-386, 389 или 390, где по меньшей мере 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% клеток в популяции являются негативными по экспрессии CD123 на клеточной поверхности, например, как было определено с помощью анализа методом проточной цитометрии на экспрессию CD123 на клеточной поверхности, например, как описано в Примере 1.

392. Смесь, например, реакционная смесь, содержащая:

а) рНК согласно любому из вариантов 1-98 или рНК композиции или набора согласно любому из вариантов 99-127; и

б) клетку, например, гемопоэтическую клетку, например, HSC или НРС, например, генетически сконструированную клетку согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283.

393. Смесь согласно варианту 392, где клетка представляет собой клетку дикого типа или клетку с мутацией в CD123.

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

а) рНК согласно любому из вариантов 1-97;

б) клеток, например, гемопоэтических клеток, например, HSC или НРС, например, генетически сконструированных клеток согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283;

с) молекулы Cas9; и

д) агента, нацеленного на CD123, например, агента, описанного в настоящей заявке.

395. Набор согласно варианту 394, который включает (а) и (б), (а) и (с), (а) и (д), (б) и (с), (б) и (д), или (с) и (д).

396. Способ получения генетически сконструированной клетки (например, гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника) согласно любому из вариантов 126 или 128-153, 180 или 182-283, или популяции клеток согласно любому из вариантов 284-386, 389-391, 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.

397. Способ согласно варианту 396, где (ii) включает введение в клетку рРНК, которая связывается с доменом-мишенью (например, рРНК согласно любому из вариантов 1-97 и эндонуклеазы, которая связывается с рРНК).

398. Способ согласно варианту 397, где эндонуклеаза представляет собой ZFN, TALEN или мегануклеазу.

399. Способ введения индивидууму HSC, HPC или HSPC, включающий введение индивидууму множества клеток согласно любому из вариантов 126 или 128-153, 180 или 182-283, или клеточной популяции согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391.

400. Способ, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, множества клеток согласно любому из вариантов 126 или 128-153, 180 или 182-283, или клеточной популяции согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391.

401. Способ согласно вариантам 399 или 400, где индивидуум страдает раком, где раковые клетки экспрессируют CD123 (например, где по меньшей мере множество раковых клеток экспрессируют CD123).

402. Способ согласно любому из вариантов 399-401, который дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества агента, нацеленного на CD123, и где указанный агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD123.

403. Способ согласно варианту 402, где агент, нацеленный на CD123, представляет собой иммунную клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с CD123.

404. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283, или клеточная популяция согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391 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 CD123, где указанный агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD123.

405. Агент, нацеленный на CD123, где указанный агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD123, и предназначен для лечения расстройства кроветворения, где лечение включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества агента, нацеленного на CD123, и дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283 или клеточной популяции согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391.

406. Комбинация генетически сконструированной гемопоэтической стволовой

клетки или клетки-предшественника согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283, или клеточной популяции согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391, и агента, нацеленного на CD123 и содержащего антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD123, 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 CD123.

407. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391 для их применения в противораковой иммунотерапии.

408. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391 для их применения в противораковой иммунотерапии, где индивидуум страдает расстройством кроветворения.

409. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391 для их применения в целях гемопоэтической репопуляции у индивидуума, страдающего расстройством кроветворения.

410. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391 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.

411. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391 для их применения в целях снижения цитотоксических эффектов агента, нацеленного на CD123, при иммунотерапии.

412. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник согласно любому из вариантов 128-153, 180 или 182-283 или клеточная популяция согласно любому из вариантов 284-386 или 389-391 для их применения в способе иммунотерапии с использованием агента, нацеленного на CD123, где описанная здесь генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, или описанная здесь популяция клеток снижают

цитотоксические эффекты агента, нацеленного на CD123.

413. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-412, где генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника или клеточную популяцию вводят одновременно с агентом, нацеленным на CD123.

414. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-413, где генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника или клеточную популяцию вводят перед введением агента, нацеленного на CD123.

415. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-414, где агент, нацеленный на CD123, вводят до введения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника или клеточной популяции.

416. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-415, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

417. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-416, где иммунная клетка, генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, или та и другая, являются аллогенными.

418. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-417, где иммунная клетка, генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, или та и другая, являются аутологичными.

419. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-418, где антигенсвязывающий фрагмент в химерном рецепторе представляет собой фрагмент одноцепочечного антитела (scFv), который специфически связывается с человеческим CD123.

420. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-419, где расстройство кроветворения представляет собой рак, и где по меньшей мере множество раковых клеток экспрессируют CD123.

421. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-420, 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.

422. Способ, клетка, агент или комбинация согласно любому из вариантов 399-420, 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 рПНК CD123 на CD34<sup>+</sup>-клетках. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием белка Cas9 и рПНК, нацеленных на CD123 (указаны на оси Y). Эффективность редактирования локуса IL3RA, показанного на оси X, определяли путем секвенирования по Сэнгеру и с помощью анализа TIDE.

**На фигурах 2А-2С** представлена серия графиков, иллюстрирующих эффективность редактирования генов рПНК CD123 на клетках ТНР-1. **(А)** Человеческие клетки ТНР-1 подвергли электропорации с использованием белка Cas9 и рПНК, нацеленных на CD123. Эффективность редактирования локуса IL3RA определяли путем секвенирования по Сэнгеру и с помощью анализа TIDE. Экспрессию CD123 оценивали с помощью проточной цитометрии **(В)** и определяли процент CD123-негативных клеток **(С)**.

**На фигурах 3А-3Д** представлена серия диаграмм, иллюстрирующих выживаемость и дифференцировку CD34<sup>+</sup>-клеток, отредактированных по CD123. **(А)** Схема, иллюстрирующая рабочий процесс эксперимента. CD34<sup>+</sup>-клетки человека подвергали электропорации с использованием белка Cas9 и рПНК I, нацеленной на CD123, с последующим анализом на эффективность редактирования с помощью TIDE и анализа CFU для оценки дифференцировки *in vitro*. **(В)** Жизнеспособность клеток оценивали через 48 часов после электропорации. **(С)** Эффективность редактирования локуса IL3RA определяли путем секвенирования по Сэнгеру и анализа TIDE. Группу без RNP Cas9 использовали в качестве контроля. **(Д)** Контрольные или отредактированные по CD123 CD34<sup>+</sup>-клетки высевали в Methocult через 2 дня после электропорации и оценивали по образованию 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 4** показана целевая экспрессия на клеточных линиях ОМЛ. Экспрессию CD33, CD123 и CLL1 в клетках MOLM-13 и ТНР-1 и в неокрашенном контроле определяли с помощью проточного цитометрического анализа. На оси X показана интенсивность окрашивания антител, а на оси Y показано число клеток.

**На фигуре 5** показаны CD33- и CD123-модифицированные клетки MOLM-13. Экспрессию CD33 и CD123 в клетках дикого типа (WT), CD33<sup>-/-</sup>, CD123<sup>-/-</sup> и CD33<sup>-/-</sup> CD123<sup>-/-</sup> MOLM-13 оценивали с помощью проточной цитометрии. Для получения клеток CD33<sup>-/-</sup> или CD123<sup>-/-</sup> MOLM-13, клетки MOLM-13 дикого типа подвергали электропорации с

использованием RNP, нацеленных на CD33 или CD123 с последующим проведением сортировки CD33- или CD123-негативных клеток с помощью проточной цитометрии. CD33<sup>-/-</sup> CD123<sup>-/-</sup>-клетки MOLM-13 получали путем электропорации CD33<sup>-/-</sup>-клеток с использованием RNP, нацеленного на CD123 и отбирали на CD123-негативную популяцию. На оси X показана интенсивность окрашивания антител, а на ось Y показано число клеток.

**На фигуре 6** показан анализ на цитотоксичность CD33- и CD123-CAR-T *in vitro*. Анти-CD33 CAR-T и анти-CD123 CAR-T инкубировали с клетками дикого типа (WT), и с CD33<sup>-/-</sup>, CD123<sup>-/-</sup> и CD33<sup>-/-</sup>CD123<sup>-/-</sup>-клетками MOLM-13, и цитотоксичность оценивали с помощью проточной цитометрии. Нетрансдуцированные Т-клетки использовали в качестве CAR-T-контроля. Группа CARpool состояла из объединенной комбинации 1:1 анти-CD33 и анти-CD123 CAR-T-клеток. Был использован t-критерий Стьюдента. ns=не значимые; \*P < 0,05; \*\*P < 0,01. На оси Y показан процент специфического лизиса.

**На фигуре 7** показана эффективность редактирования генов CD34<sup>+</sup>-клеток. CD34<sup>+</sup>-клетки человека подвергали электропорации с использованием белка Cas9 и рПНК, нацеленных на CD33, CD123 или CLL1, по отдельности или в комбинации. Эффективность редактирования локуса CD33, CD123 или CLL1 определяли путем секвенирования по Сэнгеру и анализа TIDE. На оси Y показана эффективность редактирования (% по TIDE).

**На фигурах 8А-8С** показано *in vitro* образование 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 через 14 дней оценивали образование колоний. 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 9** показана частота редактирования генов в CD34<sup>+</sup>-клетках. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP), состоящих из белка Cas9 и рПНК, нацеленных на CD123, как показано на оси X, и их последовательности представлены в Таблице 8. Частоту редактирования локуса CD123 определяли путем секвенирования по Сэнгеру. На оси Y показана частота редактирования.

**На фигуре 10** показана частота редактирования генов в CD34<sup>+</sup>-клетках. Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием белка Cas9, и рПНК, нацеленных на CD123, как показано на оси X, а в частности, слева направо, рПНК A, G, I, N3, P3 и S3. Частоту редактирования локуса CD123 определяли секвенированием по Сэнгеру. На оси Y показана частота редактирования. Все рПНК на **фигуре 10** давали частоту редактирования ≥ 80%.

**На фигуре 11** показано распределение INDEL (инсерции/делеции) для CD34<sup>+</sup>-

клеток человека, отредактированных с использованием рРНК, нацеленных на CD123, а в частности, рРНК А (вверху слева), рРНК G (в середине слева), рРНК I (внизу слева), рРНК N3 (вверху справа), рРНК P3 (в центре справа) и рРНК S3 (внизу справа). На оси X указан размер INDEL, а на оси Y указан процент конкретных INDEL в смеси.

**На фигуре 12** показано распределение INDEL (инсерции/делеции) для CD34<sup>+</sup>-клеток человека, отредактированных с использованием рРНК D1, нацеленной на CD123. На оси X указан размер INDEL, а на оси Y указан процент конкретных INDEL в смеси.

**На фигуре 13** представлена схема и обзор протокола и экспериментальной процедуры/периода времени, используемых для характеристики *in vivo* CD123-отредактированных HSPC у мышей NBSGW.

**На фигурах 14A-14C** показано долгосрочное приживление линии CD123-отредактированных клеток в костном мозге мышей через 16 недель после приживления неотредактированных контрольных клеток или клеток CD123KO. **На фигуре 14A** показаны уровни лейкоцитарного химеризма у человека, вычисленные как процент CD34<sup>+</sup>-клеток (hCD45<sup>+</sup>) человека в общей популяции CD45<sup>+</sup>-клеток (сумма CD45<sup>+</sup>-клеток человека и мыши) в костном мозге на 16-й неделе после приживления контрольных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием указанной рРНК (слева направо по оси X, рРНК I или рРНК D1). **На фигуре 14B** показан процент hCD45<sup>+</sup>-клеток которые также были позитивными по CD34 человека (hCD34<sup>+</sup>) в костном мозге на 16-й неделе после приживления контрольных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием указанной рРНК (слева направо по оси X, рРНК I или рРНК D1). **На фигуре 14C** показан процент hCD45<sup>+</sup>-клеток, которые представляли 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 клеток CD123KO, отредактированных с использованием указанной рРНК (слева направо по оси X, рРНК I или рРНК D1).

**На фигуре 15** показано процентное содержание hCD45<sup>+</sup>-клеток, которое было также количественно определено как число CD123<sup>+</sup>-клеток в костном мозге на 16-й неделе после приживления контрольных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием указанной рРНК (слева направо по оси X, рРНК I или рРНК D1).

**На фигуре 16A** показана экспрессия CD123 на клеточной поверхности *in vitro*, оцененная с помощью FACS, где сверху вниз показаны: неотредактированные контрольные клетки, клетки CD123KO, отредактированные с использованием рРНК I (частота редактирования 75,8%, оцененная с помощью TIDE), клетки CD123KO, отредактированные с использованием рРНК D1 (частота редактирования 71,1%, оцененная путем секвенирования ампликона) и контроль FMO (флуоресценция минус 1). **На фигуре 16B** показана количественная оценка гранулоцитов, продуцируемых с течением времени в результате культивирования *in vitro* неотредактированных

контрольных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1. **На фигуре 16С** показана количественная оценка моноцитов, продуцируемых с течением времени из культуры *in vitro* неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1.

**На Фигуре 17** показан процент CD132<sup>+</sup>-гранулоцитов (вверху) или моноцитов (внизу), продуцируемых с течением времени из культуры *in vitro* неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1.

**На Фигуре 18** показан процент CD15<sup>+</sup>- (вверху слева) или CD11b<sup>+</sup>-позитивных гранулоцитов (вверху справа) или процент CD14<sup>+</sup>-позитивных (внизу слева) или CD11b<sup>+</sup>-позитивных моноцитов (внизу справа), количественно определенных на 0, 7 и 14-й день после редактирования и культивирования неотредактированных контрольных клеток или клеток CD123KO, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1.

**На Фигуре 19А** показан процент фагоцитоза, оцененный в гранулоцитах (вверху) или моноцитах (внизу), продуцируемых из неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием указанной рРНК (слева направо по оси X, рРНК I или рРНК D1). **На фигуре 19В** показано продуцирование IL-6 в пг/мл (справа) или TNF-α в пг/мл (слева) гранулоцитами, полученными из неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1, где указанные клетки не были стимулированы или были стимулированы ЛПС или R848. **На фигуре 19С** показано продуцирование IL-6 в пг/мл (справа) или TNF-α в пг/мл (слева) моноцитами, полученными из неотредактированных контрольных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1, где указанные клетки не были стимулированы или были стимулированы ЛПС или R848.

**На фигурах 20А-20В** показано образование колоний CD34<sup>+</sup>-клеток с отредактированными генами *in vitro*. Контрольные или CD123-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 20А** показано количество колоний BFU-E, CFU-G/M/GM или CFU-GEMM, которые образовывались из неотредактированных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием рРНК I (частота редактирования 77,9%) или рРНК D1 (частота редактирования 72,5%). **На фигуре 20В** показано процентное распределение колоний BFU-E, CFU-G/M/GM или CFU-GEMM, которые образовывались из неотредактированных клеток (EP ctrl) или клеток CD123KO, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1.

## **Подробное описание изобретения**

### *Определения*

Используемый здесь термин «связывается» относится к взаимодействию рРНК с доменом-мишенью, а именно, к взаимодействию молекулы рРНК 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, рРНК связывается с доменом-мишенью с полной комплементарностью, а в других вариантах осуществления изобретения, рРНК связывается с доменом-мишенью с частичной комплементарностью, например, с одним или более ошибочными спариваниями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, если рРНК связывается с доменом-мишенью, то полный нацеливающий домен образует пары оснований рРНК 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 рРНК и вместе с рРНК подвергаться хомингу 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 «рРНК» и «руководящая РНК» используются здесь как синонимы и означают нуклеиновую кислоту, которая способствует специфическому нацеливанию или хомингу комплекса «рРНК/молекула Cas9» на нуклеиновую кислоту-мишень. рРНК может быть мономолекулярной (имеющей одну молекулу РНК), иногда называемой здесь оцрРНК, или модульной (содержащей более одной, а обычно две отдельные молекулы РНК). рРНК может связываться с доменом-мишенью в геноме клетки-хозяина. рРНК может содержать нацеливающий домен, который может быть частично или полностью комплементарным домену-мишени. рРНК может также содержать «каркасную последовательность» (например, последовательность *tracr*-РНК), которая обеспечивает рекрутинг молекулы Cas9 в домен-мишень, связанный с последовательностью рРНК (например, посредством нацеливающего домена последовательности рРНК). 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 CD123, не являющийся мишенью, не связывается или связывается на более низком уровне с агентом, нацеленным на CD123.

«Нацеливающий домен» рРНК комплементарен «домену-мишени» на нуклеиновой кислоте-мишени. Цепь нуклеиновой кислоты-мишени, содержащая нуклеотидную последовательность, комплементарную коровому домену рРНК, 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 рРНК CD123, описанной в настоящей заявке (например, как показано с Таблицах 2, 6 или 8).

### Молекулы Cas9

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК CD123, 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 рРНК/молекула Cas9 на домен-мишень в CD123. 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*, *Ilyobacter 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. 9A-9B (эта заявка в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

Часть REC состоит из богатой аргинином мостиковой спирали (BH), домена REC1 и домена REC2. Часть REC, по-видимому, является Cas9-специфическим функциональным доменом. Домен BH 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, рРНК или tracr-РНК. 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 PAM 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 руководящей РНК (например, с синтетическим гибридом cr-РНК и tracr-РНК) (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 никазу 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 изобретения, эндонуклеаза содержит dCas9, связанную с ферментом цитидиндезаминазой (например, деаминазой APOBEC, pmCDA1, индуцированной активацией цитидиндезаминазой (AID)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, каталитически неактивная молекула Cas9 имеет пониженную активность и представляет собой nCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каталитически неактивная молекула Cas9 (dCas9) присоединена к одному или более доменам ингибитора урацилгликозилазы (UGI). В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 содержит nCas9, связанную с редактором адениновых оснований (ABE), например, ABE, происходящим от РНК-адениндезаминазы TadA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула Cas9 содержит nCas9, связанную с ферментом цитидиндезаминазой (например, деаминазой 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 PCT № WO 2018/165629A1, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, 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 Mu

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 изобретения, 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 изобретения, молекула Cas представляет собой эндонуклеазу Cas типа V-A, такую как нуклеаза Cpf1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 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 изобретения, 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 изобретения, 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 IIS 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 варибельным 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 руководящих 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 рРНК

#### Общая конфигурация рРНК

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

нацеливающий домен (комплементарный или частично комплементарный последовательности нуклеиновой кислоты-мишени в гене-мишени, например, в гене CD123);

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 рРНК, 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 рРНК/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 рРНК. 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 рРНК. 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 рРНК содержит:  
первую цепь, содержащую, например, от 5' до 3':

нацеливающий домен (комплементарный нуклеиновой кислоте-мишени в гене CD123) и

первый комплементарный домен; и

вторую цепь, содержащую предпочтительно от 5' до 3':

необязательно, удлиненный 5'-домен;

второй комплементарный домен;

проксимальный домен; и

необязательно хвостовой домен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является химически модифицированной. Так, например, рРНК может содержать одну или более модификаций, выбранных из модификации фосфотиоатного 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 рРНК 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 рРНК 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, рРНК, 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, рРНК 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, рРНК, описанная в настоящей заявке, является химически модифицированной. Так, например, рРНК может содержать один или более 2'-О-модифицированных нуклеотидов, например, 2'-О-метилнуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК содержит 2'-О-модифицированный нуклеотид, например, 2'-О-метилнуклеотид у 5'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК содержит 2'-О-модифицированный нуклеотид, например, 2'-О-метилнуклеотид у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК содержит 2'-О-модифицированный нуклеотид, например, 2'-О-метилнуклеотид у 5'- и 3'-концов рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-метил-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца рРНК и третьему нуклеотиду у 5'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-метил-модифицированной по нуклеотиду у 3'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-метил-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца рРНК, нуклеотиду у 3'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-метил-модифицированной по второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК и по четвертому нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца рРНК не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца рРНК не содержит химически модифицированного сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной, например, 2'-О-метил-модифицированной, по нуклеотиду у 5'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 2'-О-метилнуклеотид содержит фосфатную связь с соседним нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 2'-О-метилнуклеотид содержит фосфоротиоатную связь с соседним нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 2'-О-метилнуклеотид содержит связь тио-РАСЕ с соседним нуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК может содержать один или более 2'-О-модифицированных и 3'-модифицированных фосфором нуклеотидов, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоатный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоатный нуклеотид у 5'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК

содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоатный нуклеотид у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоатный нуклеотид у 5'- и 3'-концов рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК содержит остов, в котором один или несколько немостиновых атомов кислорода были заменены атомом серы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца рРНК, по второму нуклеотиду у 5'-конца рРНК и третьему нуклеотиду у 5'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат-модифицированной по нуклеотиду у 3'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца рРНК, по второму нуклеотиду у 5'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца рРНК, нуклеотиду у 3'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат-модифицированной по второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца рРНК не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид на 3'-конце рРНК не содержит химически модифицированного сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат-модифицированным по нуклеотиду у 5'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца рРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК 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, рРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-нуклеотид у 5'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-нуклеотид у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'-модифицированный фосфором нуклеотид, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-нуклеотид у 5'- и 3'-концов рРНК. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, рРНК содержит остов, в котором один или несколько немостиковых атомов кислорода заменены атомом серы и один или более немостиковых атомов кислорода заменены ацетатной группой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца рРНК, по второму нуклеотиду у 5'-конца рРНК и третьему нуклеотиду у 5'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по нуклеотиду у 3'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца рРНК, по второму нуклеотиду у 5'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца рРНК, нуклеотиду у 3'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК и третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца рРНК не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид на 3'-конце рРНК не содержит химически модифицированного сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК является 2'-О-модифицированной и 3'-модифицированной фосфором, например, 2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ-модифицированной по нуклеотиду у 5'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 5'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 5'-конца рРНК, второму нуклеотиду у 3'-конца рРНК, третьему нуклеотиду у 3'-конца рРНК и четвертому нуклеотиду у 3'-конца рРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК содержит химически модифицированный остов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК 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 рРНК, второй нуклеотид у 5'-конца рРНК и третий нуклеотид у 5'-конца рРНК содержат фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 3'-конца рРНК, второй нуклеотид у 3'-конца рРНК и третий нуклеотид у 3'-конца рРНК содержат фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 5'-конца рРНК, второй нуклеотид у 5'-конца рРНК, третий нуклеотид у 5'-конца рРНК, нуклеотид у 3'-конца рРНК, второй нуклеотид у 3'-конца рРНК, и третий нуклеотид у 3'-конца рРНК содержат фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй нуклеотид у 3'-конца рРНК, третий нуклеотид у 3'-конца рРНК и четвертый нуклеотид у 3'-конца рРНК содержат фосфоротиоатную связь. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, нуклеотид у 5'-конца рРНК, второй нуклеотид у 5'-конца рРНК, третий нуклеотид у 5'-конца рРНК, второй нуклеотид у 3'-конца рРНК, третий нуклеотид у 3'-конца рРНК и четвертый нуклеотид у 3'-конца рРНК содержат фосфоротиоатную связь.

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

Некоторые иллюстративные, но не ограничивающие варианты модификаций, например, химических модификаций, подходящих для использования в комбинации с описанными здесь руководящими 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.

#### *рРНК, нацеленные на CD123*

В настоящем описании представлен ряд подходящих рРНК, которые могут нацеливать эндонуклеазу на человеческий CD123. В приведенной ниже Таблице 1 показаны домены-мишени в эндогенном CD123 человека, которые могут связываться с описанными здесь рРНК.

**Таблица 1.** В настоящей заявке представлены примеры доменов-мишеней человеческого CD123, связанных с различными рРНК. Для каждого домена-мишени, первая последовательность представляет собой последовательность ДНК из 20 нуклеотидов, соответствующую последовательности домена-мишени, на которую может быть нацелена подходящая рРНК, 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 CD123 человека, представленной ниже как SEQ ID NO: 31.

| <b>рРНК Имя</b> | <b>Последовательности доменов-мишеней</b>                                           |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| pРНК А          | <b>GCCCTGTCTCCTGCAAACGA</b> (SEQ ID NO: 1)<br>TCGTTTGCAGGAGACAGGGC (SEQ ID NO: 11)  |
| pРНК В          | TGAGCCAAAGGAGGACCATC (SEQ ID NO: 2)<br><b>GATGGTCCTCCTTTGGCTCA</b> (SEQ ID NO: 12)  |
| pРНК С          | TCAGGAGCAGCGTGAGCCAA (SEQ ID NO: 3)<br><b>TTGGCTCACCGCTGCTCCTGA</b> (SEQ ID NO: 13) |
| pРНК D          | TCCTTCGTTTGGCAGGAGACA (SEQ ID NO: 4)<br><b>TGTCTCCTGCAAACGAAGGA</b> (SEQ ID NO: 14) |
| pРНК E          | ATCCACCGTCATGAATCCAGC (SEQ ID NO: 5)<br><b>GCTGGATTCATGACGTGGAT</b> (SEQ ID NO: 15) |
| pРНК F          | CAGGTCGTA CTGGACGTCCG (SEQ ID NO: 6)<br><b>CGGACGTCCAGTACGACCTG</b> (SEQ ID NO: 16) |
| pРНК G          | <b>TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG</b> (SEQ ID NO: 7)<br>CCCAGCTGCAGCTCAAGAAA (SEQ ID NO: 17)  |
| pРНК H          | GGTCGTA CTGGACGTCCGCG (SEQ ID NO: 8)<br><b>CGCGGACGTCCAGTACGACC</b> (SEQ ID NO: 18) |
| pРНК I          | <b>AGTTTCCCACATCCTGGTGCG</b> (SEQ ID NO: 9)<br>CGCACCAGGATGTGGGAACT (SEQ ID NO: 19) |
| pРНК J          | <b>CACTACAAAACGGATGCTCA</b> (SEQ ID NO: 10)<br>TGAGCATCCGTTTTGTAGTG (SEQ ID NO: 20) |
| pРНК D1         | TTCATCTTAGGTTTCGTGAT (SEQ ID NO: 40)<br><b>ATCACGAACCTAAGGATGAA</b> (SEQ ID NO: 41) |
| pРНК N3         | TTGACGCCTGCTGCGGTAAG (SEQ ID NO: 42)<br>CTTACCGCAGCAGGCGTCAA (SEQ ID NO: 43)        |
| pРНК P3         | <b>CGAGTGTCTTCACTACAAAA</b> (SEQ ID NO: 44)<br>TTTTGTAGTGAAGACACTCG (SEQ ID NO: 45) |
| pРНК S3         | <b>ATGCTCAGGGAACACGTATC</b> (SEQ ID NO: 46)<br>GATACGTGTTCCCTGAGCAT (SEQ ID NO: 47) |

**Таблица 2.** В настоящей заявке представлены примеры последовательностей

доменов-мишеней человеческого CD123, связанных с различными рРНК. Для каждого домена-мишени, первая последовательность представляет собой последовательность ДНК-мишени, смежную с подходящей РАМ в геномной последовательности CD123 человека, а вторая последовательность представляет собой репрезентативную эквивалентную рРНК, нацеленную на последовательность домена-мишени.

| <b>рРНК Name</b> | <b>Последовательности</b>                                                      | <b>PAM</b> |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------|
| pРНК A           | GCCCTGTCTCCTGCAAACGA (SEQ ID NO: 1)<br>GCCCUGUCUCCUGCAAACGA (SEQ ID NO: 21)    | AGG        |
| pРНК B           | TGAGCCAAAGGAGGACCATC (SEQ ID NO: 2)<br>UGAGCCAAAGGAGGACCAUC (SEQ ID NO: 22)    | GGG        |
| pРНК C           | TCAGGAGCAGCGTGAGCCAA (SEQ ID NO: 3)<br>UCAGGAGCAGCGUGAGCCAA (SEQ ID NO: 23)    | AGG        |
| pРНК D           | TCCTTCGTTTGCAGGAGACA (SEQ ID NO: 4)<br>UCCUUCGUUUGCAGGAGACA (SEQ ID NO: 24)    | GGG        |
| pРНК E           | ATCCACGTCATGAATCCAGC (SEQ ID NO: 5)<br>GCUGGAUUCAUGACGUGGAU (SEQ ID NO: 25)    | AGG        |
| pРНК F           | CAGGTCGTACTIONGGACGTCCG (SEQ ID NO: 6)<br>CAGGUCGUACUGGACGUCCG (SEQ ID NO: 26) | CGG        |
| pРНК G           | TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7)<br>UUUCUUGAGCUGCAGCUGGG (SEQ ID NO: 27)    | CGG        |
| pРНК H           | GGTCGTACTIONGGACGTCCGCG (SEQ ID NO: 8)<br>GGUCGUACUGGACGUCCGCG (SEQ ID NO: 28) | GGG        |
| pРНК I           | AGTTCACACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9)<br>AGUCCCCACAUCUGGUGCG (SEQ ID NO: 29)     | GGG        |
| pРНК J           | CACTACAAAACGGATGCTCA (SEQ ID NO: 10)<br>UGAGCAUCCGUUUUGUAGUG (SEQ ID NO: 30)   | GGG        |
| pРНК D1          | TTCATCCTTAGGTTCGTGAT (SEQ ID NO: 40)<br>UUCAUCCUUAGGUUCGUGAU (SEQ ID NO: 48)   | TGG        |
| pРНК N3          | TTGACGCCTGCTGCGGTAAG (SEQ ID NO: 42)<br>UUGACGCCUGCUGCGGUAAG (SEQ ID NO: 49)   | CGG        |
| pРНК P3          | CGAGTGTCTTCACTACAAAA (SEQ ID NO: 44)<br>CGAGUGUCUUCACUACAAAA (SEQ ID NO: 50)   | CGG        |
| pРНК S3          | ATGCTCAGGGAACACGTATC (SEQ ID NO: 46)<br>AUGCUCAGGGAACACGUAUC (SEQ ID NO: 51)   | GGG        |

**Таблица 6.** В настоящей заявке представлены примеры последовательностей

доменов-мишеней человеческого CD123, связанных с различными рРНК. Для каждого домена-мишени представлена последовательность ДНК-мишени, смежная с подходящей РАМ в геномной последовательности CD123 человека. рРНК, нацеленная на домен-мишень и представленная в настоящей заявке, может содержать эквивалентную последовательность РНК в своем нацеливающем домене.

|         | <b>SEQ ID NO:</b> | <b>Последовательность</b> | <b>РАМ</b> |
|---------|-------------------|---------------------------|------------|
| pРНК K  | 66                | TTCCGGAGCTGCGTTCCCGA      | TGG        |
| pРНК L  | 67                | GACCATCGGGAACGCAGCTC      | CGG        |
| pРНК M  | 68                | CGTTCCTCGATGGTCCTCCTT     | TGG        |
| pРНК N  | 69                | GTGAGCCAAAGGAGGACCAT      | CGG        |
| pРНК O  | 70                | GGAGCAGCGTGAGCCAAAGG      | AGG        |
| pРНК P  | 71                | GGAGACAGGGCAGGGCGATC      | AGG        |
| pРНК Q  | 72                | CGTTTGCAGGAGACAGGGCA      | GGG        |
| pРНК R  | 11                | TCGTTTGCAGGAGACAGGGC      | AGG        |
| pРНК S  | 14                | TGTCTCCTGCAAACGAAGGA      | AGG        |
| pРНК T  | 73                | TTCTTCGTTTGCAGGAGAC       | AGG        |
| pРНК U  | 74                | TCTTACCTTCCTTCGTTTGC      | AGG        |
| pРНК V  | 75                | AAACGAAGGAAGGTAAGAAC      | TGG        |
| pРНК W  | 76                | GATCTAAAACGGTGACAGGT      | TGG        |
| pРНК X  | 77                | TTTGGATCTAAAACGGTGAC      | AGG        |
| pРНК Y  | 78                | TGGTGGGTTTGGATCTAAAA      | CGG        |
| pРНК Z  | 79                | AGGTTCGTGATTGGTGGGTT      | TGG        |
| pРНК A1 | 80                | ACCCACCAATCACGAACCTA      | AGG        |
| pРНК B1 | 81                | TCCTTAGGTTTCGTGATTGGT     | GGG        |
| pРНК C1 | 82                | ATCCTTAGGTTTCGTGATTGG     | TGG        |
| pРНК E1 | 83                | GAACCTAAGGATGAAAGCAA      | AGG        |

|         |     |                       |     |
|---------|-----|-----------------------|-----|
| pPHK F1 | 84  | GAGCCTTTGCTTTCATCCTT  | AGG |
| pPHK G1 | 85  | CAAAGGCTCAGCAGTTGACC  | TGG |
| pPHK H1 | 86  | AAAGGCTCAGCAGTTGACCT  | GGG |
| pPHK I1 | 87  | CACATTTCTGTTAAGGTCCC  | AGG |
| pPHK J1 | 88  | TATCGGTCACATTTCTGTTA  | AGG |
| pPHK K1 | 89  | GTCTTTAACACACTCGATAT  | CGG |
| pPHK L1 | 90  | AGACGCCGACTATTCTATGC  | CGG |
| pPHK M1 | 91  | ATTTACCGGCATAGAATAGT  | CGG |
| pPHK N1 | 92  | CAATAGAGAGTATGATTTAC  | CGG |
| pPHK O1 | 93  | CATAGTCCTATGTCTCTCTT  | AGG |
| pPHK P1 | 94  | TCACTGCCTAAGAGAGACAT  | AGG |
| pPHK Q1 | 95  | AACAATAGCTATTGCCAGTT  | TGG |
| pPHK R1 | 96  | ATAAGGAAATTGCTCCAAAC  | TGG |
| pPHK S1 | 97  | GTAGTTGGTCACTTCACATA  | AGG |
| pPHK T1 | 98  | GACCAACTACACCGTCCGAG  | TGG |
| pPHK U1 | 99  | GGCCACTCGGACGGTGTAGT  | TGG |
| pPHK V1 | 100 | TGGTGGGTGCGGCACTCGGA  | CGG |
| pPHK W1 | 101 | AGAATGGTGGGTGCGCACT   | CGG |
| pPHK X1 | 102 | CCAACCCACCATTTCTCCACG | TGG |
| pPHK Y1 | 103 | CCACGTGGAGAATGGTGGGT  | TGG |
| pPHK Z1 | 104 | GGATCCACGTGGAGAATGGT  | GGG |
| pPHK A2 | 105 | AGGATCCACGTGGAGAATGG  | TGG |
| pPHK B2 | 106 | AAGAGGATCCACGTGGAGAA  | TGG |
| pPHK C2 | 107 | CTCAGGGAAGAGGATCCACG  | TGG |

|         |     |                       |     |
|---------|-----|-----------------------|-----|
| pPHK D2 | 108 | TCTCACTGTTCTCAGGGAAG  | AGG |
| pPHK E2 | 109 | CATTTTTCTCACTGTTCTCA  | GGG |
| pPHK F2 | 110 | ACATTTTTCTCACTGTTCTC  | AGG |
| pPHK G2 | 111 | TCTTTCATGTTTGTGAACCC  | AGG |
| pPHK H2 | 112 | TTCATGTTTGTGAACCCAGG  | TGG |
| pPHK I2 | 113 | TCATGTTTGTGAACCCAGGT  | GGG |
| pPHK J2 | 114 | TGAACCCAGGTGGGAAGCCT  | TGG |
| pPHK K2 | 115 | GAACCCAGGTGGGAAGCCTT  | GGG |
| pPHK L2 | 116 | CCAGGTGGGAAGCCTTGGGC  | AGG |
| pPHK M2 | 117 | CTGCCCAAGGCTTCCCACCT  | GGG |
| pPHK N2 | 118 | CCTGCCCAAGGCTTCCCACC  | TGG |
| pPHK O2 | 119 | TGGGAAGCCTTGGGCAGGTG  | CGG |
| pPHK P2 | 120 | AGATTCTCCGCACCTGCCCA  | AGG |
| pPHK Q2 | 121 | GTGCGGAGAATCTGACCTGC  | TGG |
| pPHK R2 | 122 | GACCTGCTGGATTCATGACG  | TGG |
| pPHK S2 | 123 | TGGATTCTTGAGCTGCAGC   | TGG |
| pPHK T2 | 124 | GGATTCTTGAGCTGCAGCT   | GGG |
| pPHK U2 | 125 | TTGAGCTGCAGCTGGGCGGT  | AGG |
| pPHK V2 | 126 | CTGCAGCTGGGCGGTAGGCC  | CGG |
| pPHK W2 | 127 | TGCAGCTGGGCGGTAGGCCC  | GGG |
| pPHK X2 | 128 | GCAGCTGGGCGGTAGGCCCCG | GGG |
| pPHK Y2 | 129 | CAGCTGGGCGGTAGGCCCCGG | GGG |
| pPHK Z2 | 130 | GGTAGGCCCCGGGGGCCCCCG | CGG |
| pPHK A3 | 131 | GGACGTCCGCGGGGGCCCCC  | GGG |

|         |     |                       |     |
|---------|-----|-----------------------|-----|
| pPHK B3 | 132 | TGGACGTCCGCGGGGGCCCC  | CGG |
| pPHK C3 | 133 | GTCGTA CTGGACGTCCGCGG | GGG |
| pPHK D3 | 134 | AGGTCGTA CTGGACGTCCGC | GGG |
| pPHK E3 | 135 | CGTTCAAGTACAGGTCGTAC  | TGG |
| pPHK F3 | 136 | GTACTTGAACGTTGCCAAGT  | AGG |
| pPHK G3 | 137 | ACTTGGCAACGTTCAAGTAC  | AGG |
| pPHK H3 | 138 | TTGCCAAGTAGGTGTGCCCCG | TGG |
| pPHK I3 | 139 | TGCCAAGTAGGTGTGCCCCGT | GGG |
| pPHK J3 | 140 | TGCCCCACGGGCACACCTACT | TGG |
| pPHK K3 | 141 | ACCTTACCGCTTACCGCAGC  | AGG |
| pPHK L3 | 142 | GCTGCGGTAAGCGGTAAGGT  | TGG |
| pPHK M3 | 143 | GCCTGCTGCGGTAAGCGGTA  | AGG |
| pPHK O3 | 144 | CGTACTGTTGACGCCTGCTG  | CGG |
| pPHK Q3 | 145 | TCACTACAAAACGGATGCTC  | AGG |
| pPHK R3 | 146 | GATGCTCAGGGAACACGTAT  | CGG |
| pPHK T3 | 147 | GACATCTCTCGACTCTCCAG  | CGG |
| pPHK U3 | 148 | GTGGGAACTTTGAGAACCGC  | TGG |
| pPHK V3 | 149 | TTCTCAAAGTTCCCACATCC  | TGG |
| pPHK W3 | 150 | AAAGTTCCCACATCCTGGTG  | CGG |
| pPHK X3 | 151 | AAGTTCCCACATCCTGGTGC  | GGG |
| pPHK Y3 | 152 | CCCACATCCTGGTGCGGGGC  | AGG |
| pPHK Z3 | 153 | CCTGCCCCGCACCAGGATGT  | GGG |
| pPHK A4 | 154 | TCCTGCCCCGCACCAGGATG  | TGG |
| pPHK B4 | 155 | CTGCGCTCCTGCCCCGCACC  | AGG |

|         |     |                      |     |
|---------|-----|----------------------|-----|
| pPHK C4 | 156 | CGGGGCAGGAGCGCAGCCTT | CGG |
| pPHK D4 | 157 | ATCTGTGCAGGGGATACCGA | AGG |
| pPHK E4 | 158 | CGACAAACTTATCTGTGCAG | GGG |
| pPHK F4 | 159 | ACGACAAACTTATCTGTGCA | GGG |
| pPHK G4 | 160 | GACGACAAACTTATCTGTGC | AGG |
| pPHK H4 | 161 | TTTGTCGTCTTTTCACAGAT | TGG |
| pPHK I4 | 162 | TCACAGATTGGTGAGTAGCC | CGG |
| pPHK J4 | 163 | CACAGATTGGTGAGTAGCCC | GGG |
| pPHK K4 | 164 | CACTTTGCAGTCATGTTGGG | TGG |
| pPHK L4 | 165 | TTACACTTTGCAGTCATGTT | GGG |
| pPHK M4 | 166 | ATTACACTTTGCAGTCATGT | TGG |
| pPHK N4 | 167 | AGACACATTCCTTTATGCAC | TGG |
| pPHK O4 | 168 | TCTCATTTTCCAGTGCATAA | AGG |
| pPHK P4 | 169 | CTATGAGCTTCAGATACAAA | AGG |
| pPHK Q4 | 170 | GCAGCCTGTAATCACAGAAC | AGG |
| pPHK R4 | 171 | CTCACCTGTTCTGTGATTAC | AGG |
| pPHK S4 | 172 | TTTATTTTCTTTCAAACCAC | AGG |
| pPHK T4 | 173 | GAGGTTCTGTCTCTGACCTG | TGG |
| pPHK U4 | 174 | TCCTTCCAGCTACTCAATCC | TGG |
| pPHK V4 | 175 | AGGATTGAGTAGCTGGAAGG | AGG |
| pPHK W4 | 176 | TCCAGGATTGAGTAGCTGGA | AGG |
| pPHK X4 | 177 | ACGTTCCAGGATTGAGTAGC | TGG |
| pPHK Y4 | 178 | ATTTGTACTGTGTACGTTCC | AGG |
| pPHK Z4 | 179 | ACACAGTACAAATAAGAGCC | CGG |

|         |     |                      |     |
|---------|-----|----------------------|-----|
| pPHK A5 | 180 | CACAGTACAAATAAGAGCCC | GGG |
| pPHK B5 | 181 | GAATTCATACACTCTTTCCC | GGG |
| pPHK C5 | 182 | AGAATTCATACACTCTTTCC | CGG |
| pPHK D5 | 183 | TGTATGAATTCTTGAGCGCC | TGG |
| pPHK E5 | 184 | TGGAGCACCCCCCAGCGCTT | CGG |
| pPHK F5 | 185 | GAAGCGCTGGGGGGTGCTCC | AGG |
| pPHK G5 | 186 | CCCCCAGCGCTTCGGTGAG  | TGG |
| pPHK H5 | 187 | CCCCCAGCGCTTCGGTGAGT | GGG |
| pPHK I5 | 188 | CCACTCACCGAAGCGCTGGG | GGG |
| pPHK J5 | 189 | CCCACTCACCGAAGCGCTGG | GGG |
| pPHK K5 | 190 | GCCCACTCACCGAAGCGCTG | GGG |
| pPHK L5 | 191 | AGCCCACTCACCGAAGCGCT | GGG |
| pPHK M5 | 192 | CAGCCCACTCACCGAAGCGC | TGG |
| pPHK N5 | 193 | GCTTCGGTGAGTGGGCTGTG | CGG |
| pPHK O5 | 194 | CTTCGGTGAGTGGGCTGTGC | GGG |
| pPHK P5 | 195 | TTCGGTGAGTGGGCTGTGCG | GGG |
| pPHK Q5 | 196 | TCTAGGGGTAAAGGGTGAGA | GGG |
| pPHK R5 | 197 | CTCTAGGGGTAAAGGGTGAG | AGG |
| pPHK S5 | 198 | TTTACCCCTAGAGTGCGACC | AGG |
| pPHK T5 | 199 | GGTCGCACTCTAGGGGTAAA | GGG |
| pPHK U5 | 200 | TGGTCGCACTCTAGGGGTAA | AGG |
| pPHK V5 | 201 | ACCCCTAGAGTGCGACCAGG | AGG |
| pPHK W5 | 202 | CCTAGAGTGCGACCAGGAGG | AGG |
| pPHK X5 | 203 | CTAGAGTGCGACCAGGAGGA | GGG |

|         |     |                      |     |
|---------|-----|----------------------|-----|
| pPHK Y5 | 204 | TCCTCCTGGTCGCACTCTAG | GGG |
| pPHK Z5 | 205 | CTCCTCCTGGTCGCACTCTA | GGG |
| pPHK A6 | 206 | CCTCCTCCTGGTCGCACTCT | AGG |
| pPHK B6 | 207 | GTGTGTTTGCGCCCTCCTCC | TGG |
| pPHK C6 | 208 | AGGGCGCAAACACACGTGCC | TGG |
| pPHK D6 | 209 | GCGCAAACACACGTGCCTGG | CGG |
| pPHK E6 | 210 | GATCAGCAGCGACGTCCGCC | AGG |
| pPHK F6 | 211 | GACGTCGCTGCTGATCGCGC | TGG |
| pPHK G6 | 212 | ACGTCGCTGCTGATCGCGCT | GGG |
| pPHK H6 | 213 | CGTCGCTGCTGATCGCGCTG | GGG |
| pPHK I6 | 214 | GATCGCGCTGGGGACGCTGC | TGG |
| pPHK J6 | 215 | GCTGGGGACGCTGCTGGCCC | TGG |
| pPHK K6 | 216 | GATCACGAAGACACAGACCA | GGG |
| pPHK L6 | 217 | AGATCACGAAGACACAGACC | AGG |
| pPHK M6 | 218 | GTGTCTTCGTGATCTGCAGA | AGG |
| pPHK N6 | 219 | CTGCAGAAGGTGAGCCCTCG | AGG |
| pPHK O6 | 220 | TGCAGAAGGTGAGCCCTCGA | GGG |
| pPHK P6 | 221 | GGCCATTTCTCTTTCCTCCG | AGG |
| pPHK Q6 | 222 | TACCTCGGAGGAAAGAGAAA | TGG |
| pPHK R6 | 223 | TCTCTTTCCTCCGAGGTATC | TGG |
| pPHK S6 | 224 | TGCATCACCAGATACCTCGG | AGG |
| pPHK T6 | 225 | CTCTGCATCACCAGATACCT | CGG |
| pPHK U6 | 226 | TCTTTCATGTGAGGGATGCG | GGG |
| pPHK V6 | 227 | GTCTTTCATGTGAGGGATGC | GGG |

|         |     |                       |     |
|---------|-----|-----------------------|-----|
| pPHK W6 | 228 | GGTCTTTCATGTGAGGGATG  | CGG |
| pPHK X6 | 229 | CCTCACATGAAAGACCCCAT  | CGG |
| pPHK Y6 | 230 | CGATGGGGTCTTTCATGTGA  | GGG |
| pPHK Z6 | 231 | CCGATGGGGTCTTTCATGTG  | AGG |
| pPHK A7 | 232 | TTTGGAAGCTGTCACCGATG  | GGG |
| pPHK B7 | 233 | TTTTGGAAGCTGTCACCGAT  | GGG |
| pPHK C7 | 234 | GTTTTGGAAGCTGTCACCGA  | TGG |
| pPHK D7 | 235 | CAGCTTCCAAAACGACAAGC  | TGG |
| pPHK E7 | 236 | AACATAACCAGCTTGTCGTTT | TGG |
| pPHK F7 | 237 | CTGCCTCCTCTCGTCTCTGC  | AGG |
| pPHK G7 | 238 | CCTCCTCTCGTCTCTGCAGG  | TGG |
| pPHK H7 | 239 | CCACCTGCAGAGACGAGAGG  | AGG |
| pPHK I7 | 240 | TCTCGTCTCTGCAGGTGGTC  | TGG |
| pPHK J7 | 241 | CTCGTCTCTGCAGGTGGTCT  | GGG |
| pPHK K7 | 242 | AGACCACCTGCAGAGACGAG  | AGG |
| pPHK L7 | 243 | GTCTCTGCAGGTGGTCTGGG  | AGG |
| pPHK M7 | 244 | TCTGCAGGTGGTCTGGGAGG  | CGG |
| pPHK N7 | 245 | CTGCAGGTGGTCTGGGAGGC  | GGG |
| pPHK O7 | 246 | GTCTGGGAGGCGGGCAAAGC  | CGG |
| pPHK P7 | 247 | GGAGGCGGGCAAAGCCGGCC  | TGG |
| pPHK Q7 | 248 | GGCGGGCAAAGCCGGCCTGG  | AGG |
| pPHK R7 | 249 | AGCCGGCCTGGAGGAGTGTC  | TGG |
| pPHK S7 | 250 | CACCAGACACTCCTCCAGGC  | CGG |
| pPHK T7 | 251 | CAGTCACCAGACACTCCTCC  | AGG |

|         |     |                       |     |
|---------|-----|-----------------------|-----|
| pPHK U7 | 252 | GTGTCTGGTGACTGAAGTAC  | AGG |
| pPHK V7 | 253 | TCGTGCAGAAACTTGAGAC   | TGG |
| pPHK W7 | 254 | CGTGCAGAAACTTGAGACT   | GGG |
| pPHK X7 | 255 | GTGCAGAAACTTGAGACTG   | GGG |
| pPHK Y7 | 256 | AAACTTGAGACTGGGGTTC   | AGG |
| pPHK Z7 | 257 | AAACTTGAGACTGGGGTTCA  | GGG |
| pPHK A8 | 258 | AGACTGGGGTTCAGGGCTTG  | TGG |
| pPHK B8 | 122 | GACCTGCTGGATTCATGACG  | TGG |
| pPHK C8 | 133 | GTCGTA CTGGACGTCCGCGG | GGG |
| pPHK D8 | 8   | GGTCGTA CTGGACGTCCGCG | GGG |

Последовательность кДНК CD123 (NM\_001267713.1) представлена ниже как SEQ ID NO: 31. Подчеркивание, выделение жирным шрифтом или курсивом указывают на области, комплементарные рPHK A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, P3 или S3 (или их обратный комплемент). Жирным шрифтом и курсивом отмечены участки перекрывания между двумя или более такими областями.

GTCAGGTTTCATGGTTACGAAGCTGCTGACCCCAGGATCCCAGCCCGTGGGAG  
AGAAGGGGGTCTCTGACAGCCCCACCCCTCCCCACTGCCAGATCCTTATTGGGTCT  
GAGTTTCAGGGGTGGGGCCCCAGCTGGAGGTTATAAAACAGCTCAATCGGGGAGTA  
CAACCTTCGGTTTCTCTTCGGGGAAAGCTGCTTTCAGCGCACACGGGAAGATATCAG  
AAACATCCTAGGATCAGGACACCCCAGATCTTCTCAACTGGAACCACGAAGGCTGT  
TTCTTCCACACAGTACTTTGATCTCCATTTAAGCAGGCACCTCTGTCCTGCGTTCCGG  
AGCTGCGTTCCCGATGGTCCTCCTTTGGCTCA**CGCTGCTCCTGATCGCCCTGCCCT**  
**GTCTCCTGCAAACGAAGGA**AGGTGGGAAGCCTTGGGCAGGTGCGGAGAATCTGAC  
CTGCTGGATTCATGACGTGGATTTCTTGAGCTGCAGCTGGGCGGTAGGCCCGGGG  
GCCCCG**CGGACGTCCAGTACGACCTGT**ACTTGAACGTTGCCAACAGGCGTCAAC  
AGTACGAGTGTCTT**CACTACAAAACGGATGCTCAGGGAACACGTATCGGGTGTC**  
GTTTCGATGACATCTCTCGACTCTCCAGCGGTTCTCAAAGTTCCACATCCTGGTGCG  
GGGCAGGAGCGCAGCCTTCGGTATCCCCTGCACAGATAAGTTTGTCGTCTTTTCACA  
GATTGAGATATTAACCTCCACCCAACATGACTGCAAAGTGTAATAAGACACATTCCTT  
TATGCACTGGAAAATGAGAAGTCATTTCAATCGCAAATTTTCGCTATGAGCTTCAGAT  
ACAAAAGAGAATGCAGCCTGTAATCACAGAACAGGTCAGAGACAGAACCTCCTTCC  
AGCTACTCAATCCTGGAACGTACACAGTACAAATAAGAGCCCGGGAAAGAGTGTAT  
GAATTCTTGAGCGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTTCGAGTGCGACCAGGAGGAGGG

CGCAAACACACGTGCCTGGCGGACGTCGCTGCTGATCGCGCTGGGGACGCTGCTGG  
 CCCTGGTCTGTGTCTTCGTGATCTGCAGAAGGTATCTGGTGATGCAGAGACTCTTTC  
 CCCGCATCCCTCACATGAAAGACCCCATCGGTGACAGCTTCCAAAACGACAAGCTG  
 GTGGTCTGGGAGGCGGGCAAAGCCGGCCTGGAGGAGTGTCTGGTGACTGAAGTACA  
 GGTCGTGCAGAAAACCTTGAGACTGGGGTTCAGGGCTTGTGGGGGTCTGCCTCAATCT  
 CCCTGGCCGGGCCAGGCGCCTGCACAGACTGGCTGCTGGACCTGCGCACGCAGCCC  
 AGGAATGGACATTCCTAACGGGTGGTGGGCATGGGAGATGCCTGTGTAATTTTCGTCC  
 GAAGCTGCCAGGAAGAAGAACAAGAACTTTGTGTGTTTATTTTCATGATAAAGTGATTT  
 TTTTTTTTTTAACCCAAA (SEQ ID NO: 31)

Дополнительная изоформа кДНК CD123 (NM\_002183.4) представлена как:

CTTCGGTTTCTCTTCGGGAAAGCTGCTTTCAGCGCACACGGGAAGATATCA  
 GAAACATCCTAGGATCAGGACACCCAGATCTTCTCAACTGGAACCACGAAGGCTG  
 TTTCTTCCACACAGTACTTTGATCTCCATTTAAGCAGGCACCTCTGTCCTGCGTTCCG  
 GAGCTGCGTTCCCGATGGTCCTCCTTTGGCTCACGCTGCTCCTGATCGCCCTGCCCTG  
 TCTCCTGCAAACGAAGGAAGATCCAAACCCACCAATCAGAACCTAAGGATGAAAG  
 CAAAGGCTCAGCAGTTGACCTGGGACCTTAACAGAAATGTGACCGATATCGAGTGT  
 GTTAAAGACGCCGACTATTCTATGCCGGCAGTGAACAATAGCTATTGCCAGTTTGA  
 GCAATTTCTTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTCCGAGTGGCCAACCCACCATTC  
 TCCACGTGGATCCTCTTCCCTGAGAACAGTGGGAAGCCTTGGGCAGGTGCGGAGAA  
 TCTGACCTGCTGGATTCATGACGTGGATTTCTTGAGCTGCAGCTGGGCGGTAGGCCC  
 GGGGGCCCCCGCGGACGTCCAGTACGACCTGTACTTGAACGTTGCCAACAGGCGTC  
 AACAGTACGAGTGTCTTCACTACAAAACGGATGCTCAGGGAACACGTATCGGGTGT  
 CGTTTCGATGACATCTCTCGACTCTCCAGCGGTTCTCAAAGTTCCACATCCTGGTGC  
 GGGGCAGGAGCGCAGCCTTCGGTATCCCCTGCACAGATAAGTTTGTCTCTTTTCAC  
 AGATTGAGATATTAACCTCACCCAACATGACTGCAAAGTGTAATAAGACACATTCCT  
 TTATGCACTGGAAAATGAGAAGTCATTTCAATCGCAAATTTGCTATGAGCTTCAGA  
 TACAAAAGAGAATGCAGCCTGTAATCACAGAACAGGTCAGAGACAGAACCTCCTTC  
 CAGCTACTCAATCCTGGAACGTACACAGTACAAATAAGAGCCCGGGAAAGAGTGTA  
 TGAATTCTTGAGCGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTTCGAGTGCAGACCAGGAGGAGG  
 GCGCAAACACACGTGCCTGGCGGACGTCGCTGCTGATCGCGCTGGGGACGCTGCTG  
 GCCCTGGTCTGTGTCTTCGTGATCTGCAGAAGGTATCTGGTGATGCAGAGACTCTTT  
 CCCCGCATCCCTCACATGAAAGACCCCATCGGTGACAGCTTCCAAAACGACAAGCT  
 GGTGGTCTGGGAGGCGGGCAAAGCCGGCCTGGAGGAGTGTCTGGTGACTGAAGTAC  
 AGGTCGTGCAGAAAACCTTGAGACTGGGGTTCAGGGCTTGTGGGGGTCTGCCTCAAT  
 CTCCCTGGCCGGGCCAGGCGCCTGCACAGACTGGCTGCTGGACCTGCGCACGCAGC  
 CCAGGAATGGACATTCCTAACGGGTGGTGGGCATGGGAGATGCCTGTGTAATTTTCGT  
 CCGAAGCTGCCAGGAAGAAGAACAAGAACTTTGTGTGTTTATTTTCATGATAAAGTGAT  
 TTTTTTTTTTTTAACCCA (SEQ ID NO: 52)

Подчеркнутые области представляет собой области, комплементарные рРНК D1  
 (или их обратный комплемент)

### Композиции из двух рРНК и их применение

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рРНК, описанная в настоящей заявке (например, рРНК, представленная в Таблицах 2, 6 или 8), может быть использована в комбинации со второй рРНК, например, для нацеливания нуклеаз на два сайта в геноме. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения желательно получить гемопоэтическую клетку, дефицитную по CD123 и по второму антигену клеточной поверхности, специфичному к линии дифференцировки, например, так, чтобы клетка могла быть резистентной к двум агентам: к агенту против CD123 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 рРНК, нацеленными на различные области CD123, в целях создания двух разрывов и делеции между двумя сайтами разрезания. Соответственно, в настоящей заявке представлены различные комбинации рРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, две или более (например, 3, 4 или более) рРНК, описанные в настоящей заявке, представлены в виде смеси. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждая рРНК находится в отдельном контейнере. В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь набор (например, набор, содержащий одну или несколько рРНК, 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 рРНК представляют собой рРНК, представленные в Таблицах 2, 6, 8, или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая рРНК представляет собой рРНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рРНК 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 рРНК представляет собой рРНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рРНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рРНК 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 рПНК представляет собой рПНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рПНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рПНК 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 рПНК представляет собой рПНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рПНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рПНК 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 рПНК представляет собой рПНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рПНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рПНК 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 С-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); простазы; 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 мышинового лейкоза Абельсона (Abl)

(bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа А (EphA2); фукозил-GM1; адгезивной молекулы сиалил-Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(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; протеина; 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 рПНК представляет собой рПНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рПНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рПНК 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 рПНК представляет собой рПНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рПНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рПНК 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 рПНК представляет собой рПНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рПНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рПНК 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 рПНК представляет собой рПНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рПНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рПНК нацелена на CD33. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая рПНК представляет собой рПНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рПНК, представленную в Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рПНК нацелена на CLL1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая рПНК представляет собой рПНК CD123, описанную в настоящей заявке (например, рПНК, представленную в

Таблицах 2, 6, 8, или ее вариант), а вторая рРНК содержит последовательность, представленную в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая рРНК представляет собой рРНК CLL1, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 1-10, 40, 42, 44, 46, а вторая рРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая рРНК представляет собой рРНК CD123, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 9, а вторая рРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая рРНК представляет собой рРНК CD123, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 10, а вторая рРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая рРНК представляет собой рРНК CD123, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 11, а вторая рРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая рРНК представляет собой рРНК CD123, содержащую нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 12, а вторая рРНК содержит нацеливающий домен, соответствующий последовательности, представленной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая рРНК представляет собой рРНК, 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 рРНК, связывающиеся с последовательностями-мишенями, обычно содержат нацеливающий домен, содержащий нуклеотидную последовательность РНК, эквивалентную соответствующей последовательности-мишени (за исключением РАМ).

| Мишень для рРНК    | Последовательности-мишени | SEQ ID NO: |
|--------------------|---------------------------|------------|
| hCD33              | ACCTGTCAGGTGAAGTTCGC TGG  | 259        |
| hCD33              | TGGCCGGGTTCTAGAGTGCC AGG  | 260        |
| hCD33              | GGCCGGGTTCTAGAGTGCCA GGG  | 261        |
| hCD33              | CACCGAGGAGTGAGTAGTCC TGG  | 262        |
| hCD33              | TCCAGCGAACTTCACCTGAC AGG  | 263        |
| CD33 (в интроне 1) | GCTGTGGGGAGAGGGGTTGT      | 264        |
| CD33 (в интроне 1) | CTGTGGGGAGAGGGGTTGTC      | 265        |

|                    |                                 |     |
|--------------------|---------------------------------|-----|
| CD33 (в интроне 1) | TGGGGAAACGAGGGTCAGCT            | 266 |
| CD33 (в интроне 1) | GGGCCCCCTGTGGGGAAACGA           | 267 |
| CD33 (в интроне 1) | AGGGCCCCTGTGGGGAAACG            | 268 |
| CD33 (в интроне 1) | GCTGACCCTCGTTTCCCCAC            | 269 |
| CD33 (в интроне 1) | CTGACCCTCGTTTCCCCACA            | 270 |
| CD33 (в интроне 1) | TGACCCTCGTTTCCCCACAG            | 271 |
| CD33 (в интроне 1) | CCATAGCCAGGGCCCCTGTG            | 272 |
| CD33 (в интроне 2) | GCATGTGACAGGTGAGGCAC            | 273 |
| CD33 (в интроне 2) | TGAGGCACAGGCTTCAGAAG            | 274 |
| CD33 (в интроне 2) | AGGCTTCAGAAGTGGCCGCA            | 275 |
| CD33 (в интроне 2) | GGCTTCAGAAGTGGCCGCAA            | 276 |
| CD33 (в интроне 2) | GTACCCATGAACTTCCCTTG            | 277 |
| CD33 (в интроне 2) | GTGGCCGCAAGGGAAGTTCA            | 278 |
| CD33 (в интроне 2) | TGGCCGCAAGGGAAGTTCAT            | 279 |
| CD33 (в интроне 2) | GGAAGTTCATGGGTACTGCA            | 280 |
| CD33 (в интроне 2) | TTCATGGGTACTGCAGGGCA            | 281 |
| CD33 (в интроне 2) | CTAAACCCCTCCCAGTACCA            | 282 |
| CD33 (в интроне 1) | CACTCACCTGCCCACAGCAG            | 283 |
| CD33 (в интроне 1) | CCCTGCTGTGGGCAGGTGAG            | 284 |
| CD33 (в интроне 1) | TGGGCAGGTGAGTGGCTGTG            | 285 |
| CD33 (в интроне 1) | GGTGAGTGGCTGTGGGGAGA            | 286 |
| CD33 (в интроне 1) | GTGAGTGGCTGTGGGGAGAG            | 287 |
| CD33 (экзон 2)     | ATCCATAGCCAGGGCCCCTG            | 288 |
| CD33 (экзон 2)     | TCCATAGCCAGGGCCCCTGT            | 289 |
| CD33 (экзон 2)     | CCATAGCCAGGGCCCCTGTG            | 272 |
| CD33 (экзон 2)     | TCGTTTCCCCACAGGGCCC             | 290 |
| CD33 (экзон 2)     | TGGCTATGGATCCAAATTTC            | 291 |
| CD33 (экзон 2)     | TGGGGAAACGAGGGTCAGCT            | 266 |
| CD33 (экзон 2)     | GGGCCCCCTGTGGGGAAACGA           | 267 |
| CD33 (экзон 2)     | AGAAATTTGGATCCATAGCC <b>AGG</b> | 292 |
| CD33 (экзон 3)     | ATCCCTGGCACTCTAGAACC CGG        | 293 |
| CD33 (экзон 3)     | CCTCACTAGACTTGACCCAC AGG        | 294 |

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 CD123, 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 CD123 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 рРНК, описанных в настоящей заявке, например, рРНК, представленной в Таблице 2, и второй рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такая клетка может быть получена с использованием двух или более описанных здесь рРНК, например, рРНК, представленной в Таблице 6, и второй рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такая клетка может быть получена с использованием двух или более описанных здесь рРНК, например, рРНК, представленной в Таблице 8, и второй рРНК. 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 CD123 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 CD123, к потере функции белка CD123. 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, CD123, 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 CD123 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 CD123 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 CD123 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 HPC), имеющую модификацию CD123, получают с использованием нуклеазы и/или рРНК, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетку (например, HSC или HPC), имеющую модификацию CD123 и модификацию второго антигена клеточной поверхности, специфичного для линии дифференцировки, получают с использованием нуклеазы и/или рРНК, описанных в настоящей заявке. Очевидно, что клетка может быть получена путем контактирования самой клетки с нуклеазой и/или рРНК, или клетка может быть дочерней клеткой клетки, которая была подвергнута контактированию с нуклеазой и/или рРНК. 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: приживление трансплантата 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 CD123. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка, описанная в настоящей заявке, представляет собой человеческую клетку, имеющую мутацию в экзоне 5 CD123. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка, описанная в настоящей заявке, представляет собой человеческую клетку, имеющую мутацию в экзоне 6 CD123.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток, описанная в настоящей заявке, включает гемопоэтические стволовые клетки (HSC), гемопоэтические клетки-предшественники (HPC) 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 CD123. 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 CD123. В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированная клетка, описанная в настоящей заявке, по существу не содержит белок CD123 дикого типа, но содержит мутантный белок CD123. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутантный белок CD123 не связывается с агентом, который нацелен на CD123, 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<sup>+</sup>), 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 CD123 в популяции клеток имеют мутацию. Так, например, популяция может включать множество различных мутаций CD123, и каждая мутация из этого множества вносит свой вклад в процент копий CD123 в популяции клеток, имеющих мутацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессию CD123 в генетически сконструированной гемопоэтической клетке сравнивают с экспрессией CD123 в природной гемопоэтической клетке (например, в аналоге дикого типа). В некоторых вариантах осуществления изобретения, генетическая модификация приводит к снижению уровня экспрессии CD123 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 CD123 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% CD123 по сравнению с природной гемопоэтической клеткой (например, аналогом дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, генетическая модификация

приводит к снижению уровня экспрессии CD123 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 CD123 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% CD123 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, CD123) 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, у 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 CD123, например, у индивидуума страдающего раком, клетки которого экспрессируют CD123.

#### Способы лечения и введения

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективное количество CD123-модифицированных клеток, описанных в настоящей заявке, вводят индивидууму в сочетании с терапией против CD123, например, против рака, вызываемого CD123. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективное количество клеток, содержащих модифицированный CD123 и модифицированный второй антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки, вводят в комбинации с терапией против CD123, например, против рака, вызываемого CD123. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапия против CD123 включает введение антитела, биспецифического активатора Т-клеток, ADC или иммунной клетки, экспрессирующей CAR.

Очевидно, что если агенты (например, CD123-модифицированные клетки и терапевтические средства против CD123) 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 CD123, где индивидууму может быть введено эффективное количество CD123-модифицированных клеток одновременно или последовательно, например, до, во время или после проведения терапии против CD123.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь агент, нацеленный на CD123, представляет собой иммунную клетку, экспрессирующую химерный рецептор, содержащий антигенсвязывающий фрагмент (например, одноцепочечное антитело), способный связываться с CD123. Иммунная клетка может представлять собой, например, Т-клетку (например, CD4<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 CD123-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 CD123 представлены ниже. В аминокислотных последовательностях, последовательности CDR показаны жирным шрифтом.

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела против CD123 (SEQ ID NO: 32)

MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKAS**QNVDS**AVAWYQQKPGQSPKALI  
 YSASYRYSQVDRFTGRGSGTD  
 FTLTISSVQAEDLAVYYC**QQYYSTPWTF**GGGKLEIKR

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против CD123 (SEQ ID NO: 33)

EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAAS**GFTFTDYY**MSWVRQPPGKALEWLALIRS  
**KADGYTTEYSASV**KGRFTLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAYYSSYYSPE  
 GAMD YWGQGTSVTVSS

Дополнительные последовательности анти-CD123 антитела описаны, например, в патенте US8536310, который в полном объеме вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Связывающий фрагмент антитела против CD123, используемый для конструирования агента, нацеленного на CD123, 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 CD123 может содержать вариабельную 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 вариабельную 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**

| <b>Компонент химерного рецептора</b>                                                                                                       | <b>Аминокислотная последовательность</b>                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Антигенсвязывающий фрагмент                                                                                                                | Легкая цепь - GSTSSGSGKPGSGEGSTKG<br>(SEQ ID NO: 34)- тяжелая цепь                                                                   |
| Костимулирующий домен 4-1BB                                                                                                                | KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC<br>RFPEEEEGGCE (SEQ ID NO: 295)                                                                       |
| Костимулирующий домен CD28                                                                                                                 | IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP<br>LFPGPSKPFVVLVVGGVLACYSLLVTVA<br>FIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR<br>KHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 35) |
| Костимулирующий домен ICOS<br>(жирный шрифт),<br>трансмембранный домен ICOS<br>(курсив) и часть внеклеточного<br>домена ICOS (подчеркнуто) | <u>LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKF</u><br>WLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSS<br><b>VHDPNGEYMFMR</b> AVNTAKKSRLTDVTL<br>(SEQ ID NO: 36)  |
| Костимулирующий домен ICOS                                                                                                                 | CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTA                                                                                                         |

|                                                                                                                            |                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                            | KKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 37)                                                                                                                          |
| CD28/ICOS-химера (часть ICOS подчеркнута), включающая шарнирный домен (курсив) и трансмембранный домен (жирный шрифт) CD28 | IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPL<br>FPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVA<br><b>FIIFWVRSKRSRLLHSDYMFMR</b> <u>AVNTAKK</u><br><u>SRLTDVTL</u> (SEQ ID NO: 38) |
| Трансмембранный домен CD8 $\alpha$ (курсив) и часть внеклеточного домена CD8 $\alpha$ (подчеркнута)                        | <u>TTTPAPRPPTPAPT</u> IASQPLSLRPEACRPAA<br><u>GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS</u><br>LVITLYC (SEQ ID NO: 296)                                       |
| Цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$                                                                            | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR<br>EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQE<br>GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK<br>GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR<br>(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 CD123, 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 презентрует 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, глембатумумаб 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-Axl-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-CD123A, SGN-CD70A, SGN-CD19B, SGN-CD123A, SGN-CD352A, ровальпитузумаб тезириин/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 высвободиться

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 CD123*

Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композициям и к способам лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CD123, или состояния, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD123, 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 CD123. 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 гемопоэтическом 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, CD123 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 гемопоэтических 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 гемопоэтических 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 курсов 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 CD123, 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 развиваться 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 изобретения, МДС может прогрессировать до острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

## **ПРИМЕРЫ**

### Пример 1: Генетическое редактирование CD123 в клетках человека

#### Создание конструкций оцрРНК

оцрРНК, 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 оцрРНК были получены с использованием химически модифицированных нуклеотидов в трех концевых положениях на 5'- и 3'-концах. Модифицированные нуклеотиды содержат 2'-О-метил-3'-фосфортиоат (сокращенно обозначаемый «ms»), а ms-оцрРНК были очищены с помощью ВЭЖХ. Белок Cas9 был приобретен у Aldervon.

**Таблица 4:** Последовательности доменов-мишеней CD123 человека, которые могут быть связаны с подходящими рРНК. Соответствующая рРНК обычно содержит нацеливающий домен, который может содержать эквивалентную последовательность РНК.

| Название рРНК | Последовательность                   | PAM | Экзон   |
|---------------|--------------------------------------|-----|---------|
| рРНК А        | GCCCTGTCTCCTGCAAACGA (SEQ ID NO: 1)  | AGG | Экзон 2 |
| рРНК В        | TGAGCCAAAGGAGGACCATC (SEQ ID NO: 2)  | GGG | Экзон 2 |
| рРНК С        | TCAGGAGCAGCGTGAGCCAA (SEQ ID NO: 3)  | AGG | Экзон 2 |
| рРНК D        | TCCTTCGTTTGCAGGAGACA (SEQ ID NO: 4)  | GGG | Экзон 2 |
| рРНК E        | ATCCACGTCATGAATCCAGC (SEQ ID NO: 5)  | AGG | Экзон 5 |
| рРНК F        | CAGGTCGTA CTGGACGTCCG (SEQ ID NO: 6) | CGG | Экзон 5 |
| рРНК G        | TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 7)  | CGG | Экзон 5 |
| рРНК H        | GGTCGTA CTGGACGTCCGCG (SEQ ID NO: 8) | GGG | Экзон 5 |
| рРНК I        | AGTTCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 9)    | GGG | Экзон 6 |
| рРНК J        | CACTACAAAACGGATGCTCA (SEQ ID NO: 10) | GGG | Экзон 6 |

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

Криоконсервированные человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки были приобретены у Nemasage 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-оцрРНК (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).

#### *Культивирование клеточной линии и электропорация*

Клеточную линию ОМЛ THP-1 человека получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки THP-1 культивировали в среде RPMI-1640 (ATCC) с добавлением 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки HyClone (GE Healthcare) и 0,05 mM 2-меркаптоэтанола (Gibco). Белок Cas9 и ms-оцрРНК (в массовом соотношении 1:1) смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут перед электропорацией. Клетки THP-1 подвергали электропорации с использованием RNP Cas9 с помощью Lonza 4D-Nucleofector и набора для нуклеофекции клеточной линии SG (программа FF-100). Клетки инкубировали при 37°C в течение 4 дней до проведения проточного цитометрического 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 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).

#### *Анализ методом проточной цитометрии*

Антитело против человеческого CD123 (9F5), конъюгированное с флуорохромом, было закуплено у BD Biosciences и протестировано вместе с соответствующим изотипическим контролем. 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 красителем DAPI (Biolegend). Все образцы были получены и проанализированы на проточном цитометре Attune NxT (ThermoFisher Scientific) и с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar).

#### Результаты

Человеческие CD34<sup>+</sup>-клетки подвергали электропорации с использованием белка

Cas9 и указанной рРНК, нацеленной на CD123, как описано выше.

Процент редактирования определяли как процент инсерций-делеций (% INDEL), оцененный с помощью TIDE (фигуры 1, 2а и 3С) или как уровень экспрессии белка CD123 на поверхности клеток, оцененный с помощью проточной цитометрии (фигура 2В).

Как показано на фигуре 1 и на фигуре 2А, рРНК А, G и I показали высокую долю инсерций-делеций в диапазоне приблизительно 60-100% клеток. Для сравнения, рРНК С, Е, Н и J давали гораздо более низкие доли инсерций-делеций в диапазоне приблизительно 20-40% клеток. рРНК В, D и F показали промежуточную долю инсерций-делеций в диапазоне приблизительно 50-60% клеток.

Как показано на фигурах 2В-2С, рРНК А, G и I показали заметное снижение экспрессии CD123, как было обнаружено с помощью FACS.

рРНК I CD123 дополнительно оценивали с точки зрения жизнеспособности клеток и их дифференцировки *in vitro* (фигура 3А). Как показано на фигуре 3В, клетки, подвергнутые электропорации с использованием рРНК I, показали жизнеспособность, сравнимую с жизнеспособностью клеток негативного контроля, через 48 часов после электропорации. Эти клетки также продемонстрировали высокую эффективность редактирования локуса CD123/IL3RA с процентом инсерций-делеций приблизительно 60% (фигура 3С). Кроме того, как показано на фигуре 3D, клетки, подвергнутые электропорации с использованием рРНК I, были способны дифференцироваться *in vitro*. В частности, значительное количество колоний BFU-E и CFU-G/M/GM образовывалось из клеток, в которые вводили рРНК I. Более низкие уровни образования колоний CFU-GEMM также наблюдались в клетках, подвергнутых электропорации с использованием рРНК I.

## **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 4).

CD33 и CD123 мутировали в клетках MOLM-13 с использованием рРНК и Cas9, как описано в настоящей заявке, а затем CD33- и CD123-модифицированные клетки очищали методом проточной цитометрии и определяли уровни CD33 и CD123 на клеточной поверхности. Уровни CD33 и CD123 были высокими в клетках MOLM-13 дикого типа; редактирование CD33 давало низкие уровни только CD33; редактирование CD123 давало низкие уровни только CD123, а редактирование CD123 давало низкие уровни CD33 и CD123 (фигура 5). 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 (клетки дикого типа, CD33<sup>-</sup>

$^{-/-}$ , CD123 $^{-/-}$  и CD33 $^{-/-}$ CD123 $^{-/-}$ ) демонстрировали низкие уровни специфического цитолиза в контрольных условиях имитации CAR (фигура 6, крайний левый набор столбцов). CD33-CAR-клетки эффективно уничтожали клетки дикого типа и CD123 $^{-/-}$ -клетки, в то время как CD33 $^{-/-}$ - и CD33 $^{-/-}$ CD123 $^{-/-}$ -клетки продемонстрировали статистически значимую устойчивость к CD33-CAR (фигура 5, второй набор столбцов). CD123-CAR-клетки эффективно уничтожали клетки дикого типа и CD33 $^{-/-}$ -клетки, в то время как CD123 $^{-/-}$ - и CD33 $^{-/-}$ CD123 $^{-/-}$ -клетки продемонстрировали статистически значимую устойчивость к CD123-CAR (фигура 5, третий набор столбцов). Пул CD33-CAR- и CD123-CAR-клеток эффективно уничтожал клетки дикого типа, CD33 $^{-/-}$ -клетки и CD123 $^{-/-}$ -клетки, в то время как CD33 $^{-/-}$ CD123 $^{-/-}$ -клетки продемонстрировали статистически значимую резистентность к пулу CAR-клеток (фигура 6, самый правый набор столбцов). Этот эксперимент показал, что нокаут двух антигенов (CD33 и CD123) защищает клетки от CAR-клеток, нацеленных на оба этих 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 $^{+}$ -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 7, левый график). В эндогенном локусе CD123 наблюдалась эффективность редактирования приблизительно 60%, если CD123 подвергался воздействию отдельно или в комбинации с CD33 или CLL1 (фигура 7, 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 7, правый график). Этот эксперимент показал, что человеческие CD34 $^{+}$ -клетки могут редактироваться с высокой частотой в двух локусах антигенов клеточной поверхности.

Потенциал дифференцировки человеческих CD34 $^{+}$ -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 8A). 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 8B). Отредактированные клетки также продуцировали детектируемые колонии CFU-GEMM (фигура 8C). 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. В целом, 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*

Клеточная линия 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). Клеточная линия 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 направляющей РНК*

Все оцрРНК 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 оцрРНК 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-оцрРНК очищали с помощью ВЭЖХ. Белок Cas9 был приобретен у Aldervon. Обычно, рРНК, описанные в приведенных здесь примерах, представляют собой оцрРНК, содержащие последовательность нацеливающего домена из 20 нуклеотидов, последовательность повторов cr-РНК из 12 нуклеотидов, последовательность тетрапетли из 4 нуклеотидов и последовательность tracr-РНК из 64 нуклеотидов.

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

| Ген-мишень | Последовательность                      | PAM | Расположение мишени |
|------------|-----------------------------------------|-----|---------------------|
| CD33       | CCCCAGGACTACTCACTCCT<br>(SEQ ID NO: 64) | CGG | Экзон 3 CD33        |
| CD123      | TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG<br>(SEQ ID NO: 7)  | CGG | Экзон 5 CD123       |
|            | AGTTCCCACATCCTGGTGCG                    | GGG | Экзон 6 CD123       |

|      |                                         |     |              |
|------|-----------------------------------------|-----|--------------|
|      | (SEQ ID NO: 9)                          |     |              |
| CLL1 | GGTGGCTATTGTTTGCAGTG<br>(SEQ ID NO: 65) | TGG | Экзон 4 CLL1 |

#### *Электропорация клеточной линии ОМЛ*

Белок Cas9 и ms-оцрПНК (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-оцрПНК 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-оцрПНК, добавляли равное количество каждой ms-оцрПНК. 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 CD123 (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 сортировки методом проточной цитометрии, клетки окрашивали антителами, конъюгированными с флуорохромом, с последующей сортировкой на клеточном сортере Moflow Astrios Cell Sorter (Beckman Coulter).

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

CAR второго поколения были сконструированы для нацеливания на CD33 и CD123, за исключением антитела против CD33-CAR-T, используемого в мультиплексном эксперименте по оценке цитотоксичности CD33/CLL-1. Каждый CAR состоял из внеклеточного 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 CD123 была получена из клона 32716. Анти-CD33 антитело и конструкция CAR против CD123 имеет ориентацию scFv от тяжелой к легкой 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-T 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/CD123, в качестве клеток-мишеней для мультиплексных анализов на цитотоксичность CD33/CLL-1 использовали клетки MOLM-13 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 CD123. 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  $((\text{целевая фракция без эффекторных клеток} - \text{целевая фракция с эффекторными клетками}) / (\text{целевая фракция без эффекторов})) \times 100\%$ .

### **Пример 3: Конструирование и скрининг рРНК на редактирование CD123 в клетках человека**

#### *Создание конструкций оцрРНК*

рРНК, исследуемые в этом Примере, были сконструированы путем оценки SpCas9 PAM (5'-NGG-3') 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 209 рРНК, нацеленных на домены-мишени человеческого CD123, как описано в Таблицах 2 и 6.

#### *Скрининг рРНК в клетках ТНР-1*

209 рРНК были отфильтрованы в соответствии с алгоритмом предсказания нецелевых участков (исходя из количества ошибочных спариваний), который позволял идентифицировать 178 рРНК для дальнейшего исследования в клетках ТНР-1. Клеточная линия 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 рРНК (смешанных в массовом отношении 1:1). Геномную ДНК экстрагировали из клеток, и представляющую

интерес область генома амплифицировали с помощью ПЦР для всех 148 из 178 исследованных рРНК. 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 146 из 148 рРНК, которые были амплифицированы и секвенированы. Во втором повторе, частота редактирования была определена для 96/146 рРНК, и результаты для каждой рРНК были сопоставимы в двух повторах. Как показано в Таблице 7, 59 исследованных рРНК имели значение ICE или частоту редактирования  $\geq 80$ .

**Таблица 7. Частота редактирования рРНК, предназначенных для нацеливания на человеческий CD123 в клетках ТНР-1**

| рРНК   | SEQ ID NO: | Последовательность       | Реплика 1 |                | Реплика 2 |                |
|--------|------------|--------------------------|-----------|----------------|-----------|----------------|
|        |            |                          | ICE       | R <sup>2</sup> | ICE       | R <sup>2</sup> |
| рРНК М | 297        | CGUCCCCGAUGGUCCUC<br>CUU | 88        | 0,92           | 90        | 0,94           |
| рРНК А | 21         | GCCCUGUCUCCUGCAAA<br>CGA | 91        | 0,95           | 94        | 0,94           |
| рРНК S | 298        | UGUCUCCUGCAAACGAA<br>GGA | 96        | 0,96           | 90        | 0,95           |
| рРНК V | 299        | AAACGAAGGAAGGUAAG<br>AAC | 49        | 0,95           | 43        | 0,97           |
| рРНК U | 300        | UCUUACCUUCCUUCGUU<br>UGC | 0         | 1              | 0         | 1              |
| рРНК T | 301        | UUCCUUCGUUUGCAGGA<br>GAC | 46        | 0,96           | 49        | 0,96           |
| рРНК D | 24         | UCCUUCGUUUGCAGGAG<br>ACA | 94        | 0,97           | 93        | 0,96           |
| рРНК R | 302        | UCGUUUGCAGGAGACAG<br>GGC | 84        | 0,97           | 84        | 0,97           |
| рРНК Q | 303        | CGUUUGCAGGAGACAGG<br>GCA | 85        | 0,97           | -         | -              |
| рРНК P | 304        | GGAGACAGGGCAGGGCG<br>AUC | 72        | 0,93           | 84        | 0,84           |
| рРНК C | 23         | UCAGGAGCAGCGUGAGC<br>CAA | 80        | 0,93           | 64        | 0,92           |
| рРНК N | 305        | GUGAGCCAAAGGAGGAC        | 84        | 0,93           | 83        | 0,88           |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | CAU                      |    |      |    |      |
| pPHK B  | 22  | UGAGCCAAAGGAGGACC<br>AUC | 90 | 0,95 | 90 | 0,94 |
| pPHK L  | 306 | GACCAUCGGGAACGCAG<br>CUC | 86 | 0,97 | 88 | 0,97 |
| pPHK A1 | 307 | ACCCACCAAUCACGAAC<br>CUA | -  | -    | -  | -    |
| pPHK G1 | 308 | CAAAGGCUCAGCAGUUG<br>ACC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK H1 | 309 | AAAGGCUCAGCAGUUGA<br>CCU | 82 | 0,92 | -  | -    |
| pPHK L1 | 310 | AGACGCCGACUAUUCUA<br>UGC | 82 | 0,85 | -  | -    |
| pPHK M1 | 311 | AUUUACCGGCAUAGAAU<br>AGU | 88 | 0,88 | -  | -    |
| pPHK K1 | 312 | GUCUUUAACACACUCGA<br>UAU | 85 | 0,91 | 92 | 0,93 |
| pPHK J1 | 313 | UAUCGGUCACAUUUCUG<br>UUA | 47 | 0,94 | 48 | 0,94 |
| pPHK I1 | 314 | CACAUUUCUGUUAAGGU<br>CCC | 86 | 0,96 | 73 | 0,92 |
| pPHK F1 | 315 | GAGCCUUUGCUUUCAUC<br>CUU | 88 | 0,94 | -  | -    |
| pPHK D1 | 48  | UUCAUCCUAGGUUCGU<br>GAU  | 65 | 0,93 | 62 | 0,91 |
| pPHK C1 | 316 | AUCCUUAGGUUCGUGAU<br>UGG | 60 | 0,94 | 60 | 0,93 |
| pPHK B1 | 317 | UCCUUAGGUUCGUGAUU<br>GGU | 72 | 0,85 | 77 | 0,88 |
| pPHK Z  | 318 | AGGUUCGUGAUUGGUGG<br>GUU | 30 | 0,95 | 30 | 0,96 |
| pPHK Y  | 319 | UGGUGGGUUUGGAUCUA<br>AAA | 74 | 0,93 | 68 | 0,95 |
| pPHK X  | 320 | UUUGGAUCUAAAACGGU        | 74 | 0,95 | 70 | 0,95 |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | GAC                      |    |      |    |      |
| pPHK Q1 | 321 | AACAAUAGCUAUUGCCA<br>GUU | -  | -    | -  | -    |
| pPHK T1 | 322 | GACCAACUACACCGUCC<br>GAG | 58 | 0,89 | -  | -    |
| pPHK X1 | 323 | CCAACCCACCAUUCUCCA<br>CG | 67 | 0,98 | 65 | 0,98 |
| pPHK F2 | 324 | ACAUUUUUCUCACUGUU<br>CUC | 37 | 0,98 | -  | -    |
| pPHK E2 | 325 | CAUUUUUCUCACUGUUC<br>UCA | 74 | 0,97 | -  | -    |
| pPHK D2 | 326 | UCUCACUGUUCUCAGGG<br>AAG | 75 | 0,96 | -  | -    |
| pPHK C2 | 327 | CUCAGGGAAGAGGAUCC<br>ACG | 99 | 0,99 | 99 | 0,99 |
| pPHK B2 | 328 | AAGAGGAUCCACGUGGA<br>GAA | 86 | 0,98 | 85 | 0,97 |
| pPHK A2 | 329 | AGGAUCCACGUGGAGAA<br>UGG | 87 | 0,97 | 90 | 0,97 |
| pPHK Z1 | 330 | GGAUCCACGUGGAGAAU<br>GGU | 91 | 0,96 | 95 | 0,96 |
| pPHK Y1 | 331 | CCACGUGGAGAAUGGUG<br>GGU | 82 | 0,96 | 82 | 0,97 |
| pPHK W1 | 332 | AGAAUGGUGGGUUGGCC<br>ACU | 95 | 0,95 | 90 | 0,93 |
| pPHK V1 | 333 | UGGUGGGUUGGCCACUC<br>GGA | 50 | 0,95 | -  | -    |
| pPHK U1 | 334 | GGCCACUCGGACGGUGU<br>AGU | 84 | 0,92 | 84 | 0,91 |
| pPHK R1 | 335 | AUAAGGAAAUUGCUGCA<br>AAC | 90 | 0,95 | -  | -    |
| pPHK P1 | 336 | UCACUGCCUAAGAGAGA<br>CAU | -  | -    | -  | -    |
| pPHK J2 | 337 | UGAACCCAGGUGGGAAG        | -  | -    | -  | -    |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | CCU                      |    |      |    |      |
| pPHK K2 | 338 | GAACCCAGGUGGGAAGC<br>CUU | -  | -    | -  | -    |
| pPHK L2 | 339 | CCAGGUGGGAAGCCUUG<br>GGC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK O2 | 340 | UGGGAAGCCUUGGGCAG<br>GUG | -  | -    | -  | -    |
| pPHK Q2 | 341 | GUGCGGAGAAUCUGACC<br>UGC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK R2 | 342 | GACCUGCUGGAUUCAUG<br>ACG | 40 | 0,98 | -  | -    |
| pPHK S2 | 343 | UGGAUUUCUUGAGCUGC<br>AGC | 0  | 1    | 0  | 1    |
| pPHK T2 | 344 | GGAUUUCUUGAGCUGCA<br>GCU | 73 | 0,94 | 77 | 0,94 |
| pPHK G  | 27  | UUUCUUGAGCUGCAGCU<br>GGG | 86 | 0,97 | 86 | 0,97 |
| pPHK U2 | 345 | UUGAGCUGCAGCUGGGC<br>GGU | 24 | 0,97 | 27 | 0,97 |
| pPHK V2 | 346 | CUGCAGCUGGGCGGUAG<br>GCC | 1  | 1    | 2  | 1    |
| pPHK W2 | 347 | UGCAGCUGGGCGGUAGG<br>CCC | 17 | 0,98 | 18 | 0,98 |
| pPHK X2 | 348 | GCAGCUGGGCGGUAGGC<br>CCG | 0  | 1    | 0  | 1    |
| pPHK Y2 | 349 | CAGCUGGGCGGUAGGCC<br>CGG | 59 | 0,97 | 61 | 0,97 |
| pPHK Z2 | 350 | GGUAGGCCCGGGGGCCC<br>CCG | 3  | 1    | 4  | 0,99 |
| pPHK F3 | 351 | GUACUUGAACGUUGCCA<br>AGU | 35 | 0,95 | 40 | 0,95 |
| pPHK H3 | 352 | UUGCCAAGUAGGUGUGC<br>CCG | 3  | 0,99 | 3  | 0,99 |
| pPHK I3 | 353 | UGCCAAGUAGGUGUGCC        | 29 | 0,98 | 25 | 0,98 |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | CGU                      |    |      |    |      |
| pPHK G3 | 354 | ACUUGGCAACGUUCAAG<br>UAC | 62 | 0,96 | 66 | 0,95 |
| pPHK E3 | 355 | CGUUCAAGUACAGGUCG<br>UAC | 59 | 0,93 | 65 | 0,9  |
| pPHK F  | 26  | CAGGUCGUACUGGACGU<br>CCG | 47 | 0,92 | 53 | 0,89 |
| pPHK D3 | 356 | AGGUCGUACUGGACGUC<br>CGC | 4  | 0,99 | 9  | 0,98 |
| pPHK H  | 28  | GGUCGUACUGGACGUCC<br>GCG | 29 | 0,98 | -  | -    |
| pPHK C3 | 357 | GUCGUACUGGACGUCCG<br>CGG | 44 | 0,93 | 42 | 0,92 |
| pPHK B3 | 358 | UGGACGUCCGCGGGGGC<br>CCC | 33 | 0,97 | 33 | 0,97 |
| pPHK A3 | 359 | GGACGUCCGCGGGGGCC<br>CCC | 36 | 0,98 | 38 | 0,98 |
| pPHK E  | 360 | AUCCACGUCAUGAAUCC<br>AGC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK P2 | 361 | AGAUUCUCCGCACCUGC<br>CCA | -  | -    | -  | -    |
| pPHK N2 | 362 | CCUGCCCAAGGCUUCCC<br>ACC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK M2 | 363 | CUGCCCAAGGCUUCCCA<br>CCU | -  | -    | -  | -    |
| pPHK P3 | 50  | CGAGUGUCUUCACUACA<br>AAA | 84 | 0,96 | -  | -    |
| pPHK Q3 | 364 | UCACUACAAAACGGAUG<br>CUC | 42 | 0,96 | -  | -    |
| pPHK J  | 365 | CACUACAAAACGGAUGC<br>UCA | 51 | 0,95 | -  | -    |
| pPHK R3 | 366 | GAUGCUCAGGGAACACG<br>UAU | 77 | 0,93 | -  | -    |
| pPHK S3 | 51  | AUGCUCAGGGAACACGU        | 86 | 0,95 | -  | -    |

|         |     | AUC                      |    |      |   |   |
|---------|-----|--------------------------|----|------|---|---|
| pPHK T3 | 367 | GACAUCUCUCGACUCUC<br>CAG | 77 | 0,94 | - | - |
| pPHK V3 | 368 | UUCUCAAGUUCCCACA<br>UCC  | 85 | 0,95 | - | - |
| pPHK W3 | 369 | AAAGUUCCCACAUCCUG<br>GUG | 66 | 0,96 | - | - |
| pPHK X3 | 370 | AAGUUCCCACAUCCUGG<br>UGC | 63 | 0,96 | - | - |
| pPHK I  | 29  | AGUUCCCACAUCCUGGU<br>GCG | 88 | 0,95 | - | - |
| pPHK Y3 | 371 | CCCACAUCCUGGUGCGG<br>GGC | 66 | 0,94 | - | - |
| pPHK H4 | 372 | UUUGUCGUCUUUUCACA<br>GAU | 3  | 0,99 | - | - |
| pPHK I4 | 373 | UCACAGAUUGGUGAGUA<br>GCC | 0  | 1    | - | - |
| pPHK J4 | 374 | CACAGAUUGGUGAGUAG<br>CCC | 26 | 0,96 | - | - |
| pPHK G4 | 375 | GACGACAAACUUAUCUG<br>UGC | 0  | 1    | - | - |
| pPHK F4 | 376 | ACGACAAACUUAUCUGU<br>GCA | 0  | 1    | - | - |
| pPHK E4 | 377 | CGACAAACUUAUCUGUG<br>CAG | 25 | 0,97 | - | - |
| pPHK D4 | 378 | AUCUGUGCAGGGGAUAC<br>CGA | 81 | 0,97 | - | - |
| pPHK B4 | 379 | CUGCGCUCCUGCCCCGCA<br>CC | 88 | 0,95 | - | - |
| pPHK A4 | 380 | UCCUGCCCCGCACCAGG<br>AUG | 14 | 0,98 | - | - |
| pPHK Z3 | 381 | CCUGCCCCGCACCAGGA<br>UGU | 89 | 0,95 | - | - |
| pPHK U3 | 382 | GUGGGAACUUUGAGAAC        | 3  | 0,99 | - | - |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | CGC                      |    |      |    |      |
| pPHK O3 | 383 | CGUACUGUUGACGCCUG<br>CUG | 90 | 0,96 | -  | -    |
| pPHK N3 | 49  | UUGACGCCUGCUGCGGU<br>AAG | 89 | 0,96 | -  | -    |
| pPHK N4 | 384 | AGACACAUCCUUUAUG<br>CAC  | 55 | 0,97 | -  | -    |
| pPHK P4 | 385 | CUAUGAGCUUCAGAUAC<br>AAA | 10 | 0,99 | -  | -    |
| pPHK O4 | 386 | UCUCAUUUCCAGUGCA<br>UAA  | 35 | 0,98 | -  | -    |
| pPHK M4 | 387 | AUUACACUUUGCAGUCA<br>UGU | 54 | 0,96 | -  | -    |
| pPHK L4 | 388 | UUACACUUUGCAGUCAU<br>GUU | 98 | 0,98 | -  | -    |
| pPHK K4 | 389 | CACUUUGCAGUCAUGUU<br>GGG | 42 | 0,97 | -  | -    |
| pPHK Q4 | 390 | GCAGCCUGUAAUCACAG<br>AAC | 80 | 0,97 | 84 | 0,96 |
| pPHK R4 | 391 | CUCACCUGUUCUGUGAU<br>UAC | 76 | 0,94 | 79 | 0,93 |
| pPHK U4 | 392 | UCCUUCCAGCUACUCAA<br>UCC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK Z4 | 393 | ACACAGUACAAAUAAGA<br>GCC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK A5 | 394 | CACAGUACAAAUAAGAG<br>CCC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK D5 | 395 | UGUAUGAAUUCUUGAGC<br>GCC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK E5 | 396 | UGGAGCACCCCCCAGCG<br>CUU | -  | -    | -  | -    |
| pPHK G5 | 397 | CCCCCAGCGCUUCGGU<br>GAG  | -  | -    | -  | -    |
| pPHK H5 | 398 | CCCCCAGCGCUUCGGUG        | -  | -    | -  | -    |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | AGU                      |    |      |    |      |
| pPHK N5 | 399 | GCUUCGGUGAGUGGGCU<br>GUG | -  | -    | -  | -    |
| pPHK L5 | 400 | AGCCACUCACCGAAGC<br>GCU  | -  | -    | -  | -    |
| pPHK K5 | 401 | GCCCACUCACCGAAGCG<br>CUG | -  | -    | -  | -    |
| pPHK I5 | 402 | CCACUCACCGAAGCGCU<br>GGG | -  | -    | -  | -    |
| pPHK F5 | 403 | GAAGCGCUGGGGGGUGC<br>UCC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK C5 | 404 | AGAAUUCAUACACUCUU<br>UCC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK B5 | 405 | GAAUUCAUACACUCUUU<br>CCC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK Y4 | 406 | AUUUGUACUGUGUACGU<br>UCC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK X4 | 407 | ACGUUCCAGGAUUGAGU<br>AGC | -  | -    | -  | -    |
| pPHK W4 | 408 | UCCAGGAUUGAGUAGCU<br>GGA | -  | -    | -  | -    |
| pPHK V4 | 409 | AGGAUUGAGUAGCUGGA<br>AGG | -  | -    | -  | -    |
| pPHK T4 | 410 | GAGGUUCUGUCUCUGAC<br>CUG | -  | -    | -  | -    |
| pPHK S5 | 411 | UUUACCCCUAGAGUGCG<br>ACC | 60 | 0,95 | 71 | 0,95 |
| pPHK V5 | 412 | ACCCCUAGAGUGCGACC<br>AGG | 92 | 0,95 | 95 | 0,95 |
| pPHK W5 | 413 | CCUAGAGUGCGACCAGG<br>AGG | 88 | 0,96 | 92 | 0,96 |
| pPHK X5 | 414 | CUAGAGUGCGACCAGGA<br>GGA | 75 | 0,94 | 91 | 0,95 |
| pPHK C6 | 415 | AGGGCGCAAACACACGU        | 37 | 0,96 | 45 | 0,96 |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | GCC                      |    |      |    |      |
| pPHK D6 | 416 | GCGCAAACACACGUGCC<br>UGG | 50 | 0,96 | 54 | 0,96 |
| pPHK F6 | 417 | GACGUCGCUGCUGAUCG<br>CGC | 23 | 0,98 | 25 | 0,98 |
| pPHK G6 | 418 | ACGUCGCUGCUGAUCGC<br>GCU | 0  | 1    | 0  | 1    |
| pPHK H6 | 419 | CGUCGCUGCUGAUCGCG<br>CUG | 57 | 0,94 | -  | -    |
| pPHK I6 | 420 | GAUCGCGCUGGGGACGC<br>UGC | 36 | 0,97 | 35 | 0,97 |
| pPHK J6 | 421 | GCUGGGGACGCUGCUGG<br>CCC | 79 | 0,95 | 84 | 0,97 |
| pPHK M6 | 422 | GUGUCUUCGUGAUCUGC<br>AGA | 0  | 1    | 0  | 1    |
| pPHK N6 | 423 | CUGCAGAAGGUGAGCCC<br>UCG | 50 | 0,96 | 53 | 0,98 |
| pPHK O6 | 424 | UGCAGAAGGUGAGCCCU<br>CGA | 55 | 0,96 | 59 | 0,92 |
| pPHK L6 | 425 | AGAUCACGAAGACACAG<br>ACC | 63 | 0,95 | 63 | 0,96 |
| pPHK K6 | 426 | GAUCACGAAGACACAGA<br>CCA | 95 | 0,96 | 97 | 0,97 |
| pPHK E6 | 427 | GAUCAGCAGCGACGUCC<br>GCC | 30 | 0,97 | 32 | 0,97 |
| pPHK B6 | 428 | GUGUGUUUGCGCCCUCC<br>UCC | 75 | 0,94 | -  | -    |
| pPHK A6 | 429 | CCUCCUCCUGGUCGCAC<br>UCU | 58 | 0,96 | 66 | 0,95 |
| pPHK Z5 | 430 | CUCCUCCUGGUCGCACU<br>CUA | 59 | 0,95 | 55 | 0,95 |
| pPHK Y5 | 431 | UCCUCCUGGUCGCACUC<br>UAG | 89 | 0,95 | 89 | 0,94 |
| pPHK U5 | 432 | UGGUCGCACUCUAGGGG        | 72 | 0,95 | 69 | 0,94 |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | UAA                      |    |      |    |      |
| pPHK T5 | 433 | GGUCGCACUCUAGGGGU<br>AAA | 92 | 0,94 | 95 | 0,95 |
| pPHK R6 | 434 | UCUCUUUCCUCCGAGGU<br>AUC | 90 | 0,92 | 91 | 0,93 |
| pPHK X6 | 435 | CCUCACAUGAAAGACCC<br>CAU | 94 | 0,97 | 95 | 0,97 |
| pPHK D7 | 436 | CAGCUUCCAAAACGACA<br>AGC | 68 | 0,96 | 72 | 0,96 |
| pPHK E7 | 437 | AACAUACCAGCUUGUCG<br>UUU | 16 | 0,97 | 37 | 0,96 |
| pPHK C7 | 438 | GUUUUGGAAGCUGUCAC<br>CGA | 48 | 0,96 | 46 | 0,95 |
| pPHK B7 | 439 | UUUUGGAAGCUGUCACC<br>GAU | 98 | 0,99 | 98 | 0,99 |
| pPHK A7 | 440 | UUUGGAAGCUGUCACCG<br>AUG | 92 | 0,98 | 95 | 0,97 |
| pPHK Z6 | 441 | CCGAUGGGGUCUUUCAU<br>GUG | 87 | 0,95 | 83 | 0,89 |
| pPHK Y6 | 442 | CGAUGGGGUCUUUCAUG<br>UGA | 97 | 0,98 | 95 | 0,96 |
| pPHK W6 | 443 | GGUCUUUCAUGUGAGGG<br>AUG | 91 | 0,96 | 95 | 0,96 |
| pPHK V6 | 444 | GUCUUUCAUGUGAGGGA<br>UGC | 84 | 0,97 | 88 | 0,97 |
| pPHK U6 | 445 | UCUUUCAUGUGAGGGAU<br>GCG | 88 | 0,96 | 88 | 0,95 |
| pPHK T6 | 446 | CUCUGCAUACCAGAU<br>CCU   | 93 | 0,95 | 91 | 0,96 |
| pPHK S6 | 447 | UGCAUACCAGAUACCU<br>CGG  | 91 | 0,93 | 92 | 0,92 |
| pPHK I7 | 448 | UCUCGUCUCUGCAGGUG<br>GUC | 53 | 0,95 | 57 | 0,95 |
| pPHK J7 | 449 | CUCGUCUCUGCAGGUGG        | 81 | 0,91 | 86 | 0,92 |

|         |     |                          |    |      |    |      |
|---------|-----|--------------------------|----|------|----|------|
|         |     | UCU                      |    |      |    |      |
| pPHK L7 | 450 | GUCUCUGCAGGUGGUCU<br>GGG | 92 | 0,95 | 93 | 0,95 |
| pPHK M7 | 451 | UCUGCAGGUGGUCUGGG<br>AGG | 42 | 0,94 | -  | -    |
| pPHK O7 | 452 | GUCUGGGAGGCGGGCAA<br>AGC | 42 | 0,95 | 40 | 0,95 |
| pPHK P7 | 247 | GGAGGCGGGCAAAGCCG<br>GCC | 78 | 0,97 | 80 | 0,95 |
| pPHK Q7 | 453 | GGCGGGCAAAGCCGGCC<br>UGG | 48 | 0,95 | 52 | 0,94 |
| pPHK R7 | 454 | AGCCGGCCUGGAGGAGU<br>GUC | 91 | 0,96 | 86 | 0,96 |
| pPHK U7 | 455 | GUGUCUGGUGACUGAAG<br>UAC | 95 | 0,95 | -  | -    |
| pPHK V7 | 456 | UCGUGCAGAAAACUUGA<br>GAC | 13 | 0,99 | 12 | 0,99 |
| pPHK W7 | 457 | CGUGCAGAAAACUUGAG<br>ACU | 90 | 0,96 | 94 | 0,97 |
| pPHK Y7 | 458 | AAAACUUGAGACUGGGG<br>UUC | 72 | 0,96 | -  | -    |
| pPHK T7 | 459 | CAGUCACCAGACACUCC<br>UCC | 84 | 0,94 | -  | -    |
| pPHK S7 | 460 | CACCAGACACUCCUCCA<br>GGC | 76 | 0,93 | -  | -    |
| pPHK K7 | 461 | AGACCACCUGCAGAGAC<br>GAG | 95 | 0,96 | 93 | 0,97 |

*Скрининг рPHK 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 44 рPHK, перечисленных в Таблице 8. Эти 44 скринированных рPHK включают рPHK, которые были выбраны в результате скрининга, проведенного в клетках ТНР-1, и/или рPHK, которые имели благоприятный нецелевой профиль.

**Таблица 8.** Последовательности доменов-мишеней для рPHK CD123, скринированные в человеческих CD34<sup>+</sup>-клетках. Соответствующие рPHK содержали

нацеливающий домен, состоящий из эквивалентной последовательности РНК.

| <b>pPHK</b> | <b>SEQ ID NO:</b> | <b>Последовательность</b> | <b>PAM</b> | <b>Экзон</b> |
|-------------|-------------------|---------------------------|------------|--------------|
| pPHK N      | 69                | GTGAGCCAAAGGAGGACC<br>AT  | CGG        | Экзон 2      |
| pPHK A      | 1                 | GCCCTGTCTCCTGCAAACG<br>A  | AGG        | Экзон 2      |
| pPHK R2     | 122               | GACCTGCTGGATTCATGAC<br>G  | TGG        | Экзон 5      |
| pPHK C3     | 133               | GTCGTA CTGGACGTCCGCG<br>G | GGG        | Экзон 5      |
| pPHK H      | 8                 | GGTCGTA CTGGACGTCCGC<br>G | GGG        | Экзон 5      |
| pPHK B      | 2                 | TGAGCCAAAGGAGGACCA<br>TC  | GGG        | Экзон 2      |
| pPHK C      | 3                 | TCAGGAGCAGCGTGAGCC<br>AA  | AGG        | Экзон 2      |
| pPHK P      | 71                | GGAGACAGGGCAGGGCGA<br>TC  | AGG        | Экзон 2      |
| pPHK D      | 4                 | TCCTTCGTTTGCAGGAGAC<br>A  | GGG        | Экзон 2      |
| pPHK T      | 73                | TTCCTTCGTTTGCAGGAGA<br>C  | AGG        | Экзон 2      |
| pPHK M      | 68                | CGTTCCCGATGGTCCTCCT<br>T  | TGG        | Экзон 2      |
| pPHK O      | 70                | GGAGCAGCGTGAGCCAAA<br>GG  | AGG        | Экзон 2      |
| pPHK E      | 5                 | ATCCACGTCATGAATCCAG<br>C  | AGG        | Экзон 5      |
| pPHK D3     | 134               | AGGTCGTA CTGGACGTCCG<br>C | GGG        | Экзон 5      |
| pPHK F      | 6                 | CAGGTCGTA CTGGACGTCC<br>G | CGG        | Экзон 5      |
| pPHK E3     | 135               | CGTTCAAGTACAGGTCGTA<br>C  | TGG        | Экзон 5      |

|         |     |                           |     |         |
|---------|-----|---------------------------|-----|---------|
| pPHK G  | 7   | TTTCTTGAGCTGCAGCTGG<br>G  | CGG | Экзон 5 |
| pPHK B8 | 122 | GACCTGCTGGATTCATGAC<br>G  | TGG | Экзон 5 |
| pPHK C8 | 133 | GTCGTA CTGGACGTCCGCG<br>G | GGG | Экзон 5 |
| pPHK D8 | 8   | GGTCGTA CTGGACGTCCGC<br>G | GGG | Экзон 5 |
| pPHK E4 | 158 | CGACAAACTTATCTGTGCA<br>G  | GGG | Экзон 6 |
| pPHK I  | 9   | AGTTC CACATCCTGGTGC<br>G  | GGG | Экзон 6 |
| pPHK D4 | 157 | ATCTGTGCAGGGGATACCG<br>A  | AGG | Экзон 6 |
| pPHK J  | 10  | CACTACAAAACGGATGCTC<br>A  | GGG | Экзон 6 |
| pPHK K  | 66  | TTCCGGAGCTGCGTTCCCG<br>A  | TGG | Экзон 2 |
| pPHK K3 | 141 | ACCTTACCGCTTACCGCAG<br>C  | AGG | Экзон 6 |
| pPHK L3 | 142 | GCTGCGGTAAGCGGTAAG<br>GT  | TGG | Экзон 6 |
| pPHK M3 | 143 | GCCTGCTGCGGTAAGCGGT<br>A  | AGG | Экзон 6 |
| pPHK N3 | 42  | TTGACGCCTGCTGCGGTAA<br>G  | CGG | Экзон 6 |
| pPHK W  | 76  | GATCTAAAACGGTGACAG<br>GT  | TGG | Экзон 3 |
| pPHK X  | 77  | TTTGGATCTAAAACGGTGA<br>C  | AGG | Экзон 3 |
| pPHK Z  | 79  | AGGTTCGTGATTGGTGGGT<br>T  | TGG | Экзон 3 |
| pPHK A1 | 80  | ACCCACCAATCACGAACCT<br>A  | AGG | Экзон 3 |

|         |     |                          |     |         |
|---------|-----|--------------------------|-----|---------|
| pPHK B1 | 81  | TCCTTAGGTTCGTGATTGG<br>T | GGG | Экзон 3 |
| pPHK C1 | 82  | ATCCTTAGGTTCGTGATTG<br>G | TGG | Экзон 3 |
| pPHK D1 | 40  | TTCATCCTTAGGTTCGTGA<br>T | TGG | Экзон 3 |
| pPHK G1 | 85  | CAAAGGCTCAGCAGTTGAC<br>C | TGG | Экзон 3 |
| pPHK I1 | 87  | CACATTTCTGTTAAGGTCC<br>C | AGG | Экзон 3 |
| pPHK J1 | 88  | TATCGGTCACATTTCTGTT<br>A | AGG | Экзон 3 |
| pPHK L  | 67  | GACCATCGGGAACGCAGC<br>TC | CGG | Экзон 2 |
| pPHK O3 | 144 | CGTACTGTTGACGCCTGCT<br>G | CGG | Экзон 6 |
| pPHK P3 | 44  | CGAGTGTCTTCACTACAAA<br>A | CGG | Экзон 6 |
| pPHK S3 | 46  | ATGCTCAGGGAACACGTAT<br>C | GGG | Экзон 6 |
| pPHK Z3 | 153 | CCTGCCCCGCACCAGGATG<br>T | GGG | Экзон 6 |

Частота редактирования этих рPHK в первичных человеческих CD34<sup>+</sup>-HSPC была вычислена и представлена на фигуре 9 и фигуре 10. Из 44 протестированных рPHK, 7 продемонстрировали эффективность редактирования выше 80% (фигура 9 и фигура 10). Эти рPHK включали рPHK A, рPHK G, рPHK I, рPHK N3, рPHK P3 и рPHK S3, а их вычисленная средняя эффективность редактирования показана в Таблице 9.

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

| Руководящая РНК | Средняя эффективность редактирования |
|-----------------|--------------------------------------|
| рPHK A          | 80,4                                 |
| рPHK G          | 95,3                                 |
| рPHK I          | 83,3                                 |
| рPHK N3         | 86,0                                 |
| рPHK P3         | 89,3                                 |

|         |      |
|---------|------|
| рРНК S3 | 79,0 |
|---------|------|

Распределения INDEL (инсерций/делеций) для рРНК A, рРНК G, рРНК I, рРНК N3, рРНК P3 и рРНК S3, оцененные в первичных человеческих CD34<sup>+</sup>-клетках, были количественно определены и представлены на фигуре 11. Каждая рРНК приводила к INDEL в диапазоне от -14 до +2. INDEL, которые встречаются при наибольшем проценте для всех протестированных рРНК, составляли +1. рРНК N, G, I и P3 приводили к INDEL меньшего размера по сравнению с рРНК P3 и S3, что приводило к INDEL до -14. Распределение INDEL рРНК D1, оцененное в первичных человеческих CD34<sup>+</sup>-клетках, также показано на фигуре 12. INDEL рРНК D1 соответствует значениям -15, -11, -7, -6, -2, 0, +1 и +2, причем, INDEL +1 встречается с наибольшей частотой.

Нецелевые эффекты рРНК A, рРНК G, рРНК I, рРНК N3, рРНК P3 и рРНК S3 были также предсказаны, как показано в Таблице 10. Приоритет рРНК 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 руководящей молекулой и мишенью.

**Таблица 10.** Нецелевые прогнозы для рРНК, нацеленных на человеческий CD123

| Руководящая<br>РНК | Без ошибочных<br>спариваний/разрывов в<br>РАМ           |     | 1 ошибочное спаривание/разрыв в<br>РАМ               |    |     |
|--------------------|---------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------|----|-----|
|                    | # ошибочных<br>спариваний/разрывов в<br>руководящей РНК |     | # ошибочных спариваний/разрывов в<br>руководящей РНК |    |     |
|                    | 2                                                       | 3   | 1                                                    | 2  | 3   |
| рРНК A             | 3                                                       | 151 | 0                                                    | 12 | 488 |
| рРНК G             | 13                                                      | 373 | 1                                                    | 23 | 560 |
| рРНК N3            | 1                                                       | 19  | 0                                                    | 0  | 57  |
| рРНК P3            | 5                                                       | 202 | 0                                                    | 9  | 408 |
| рРНК S3            | 2                                                       | 100 | 0                                                    | 2  | 161 |
| рРНК I             | 3                                                       | 127 | 0                                                    | 4  | 125 |

Среди других рРНК, нацеленных на CD123 человека и исследованных в этом примере, три выбранных рРНК (рРНК A, рРНК I и рРНК P3) продемонстрировали особенно эффективное целевое редактирование в первичных человеческих CD34<sup>+</sup>-HSPC, низкий уровень предсказанных нецелевых эффектов или отсутствие таких эффектов и желаемое распределение INDEL.

#### **Пример 4: Оценка CD123-KO-CD34<sup>+</sup>-клеток in vivo**

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

рРНК (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 руководящих РНК, нацеленных на CD123: рРНК I, рРНК D1. 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 с помощью TIDE (рРНК I) или путем секвенирования ампликона (рРНК D1) для определения их эффективности редактирования в CD34<sup>+</sup>-HSPC. Как показано в Таблице 11, рРНК I и рРНК D1 обладают высокой эффективностью редактирования, а именно, 77,2% и 76,5%, соответственно.

**Таблица 11. Эффективность редактирования генов с использованием рРНК CD123**

| CD34 <sup>+</sup> -HSPC                          | Эффективность редактирования |
|--------------------------------------------------|------------------------------|
| EP, только контроль                              | N/A                          |
| Отредактированные с использованием рРНК I CD123  | 77,2% (TIDE)                 |
| Отредактированные с использованием рРНК D1 CD123 | 76,5% (Amp seq)              |

*Исследование эффективности приживления и персистенции CD123-KO-CD34<sup>+</sup>-клеток in vivo*

Самкам необлученных мышей NOD, B6.SCID Il2ry<sup>-/-</sup>-Kit(W41/W41) (NBSGW) (n=15) трансплантировали CD123-KO-HSPC, отредактированные с использованием рРНК I и рРНК D1, или неотредактированные (EP Ctrl) (фигура 13). Через 8 и 12 недель после приживления, у каждой мыши брали периферическую кровь для анализа с помощью FACS для оценки приживления. На 16-й неделе после приживления, мышей умерщвляли и брали кровь, селезенку и костный мозг для FACS-анализа на дифференцировку множества клеточных линий (фигура 13).

*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<sup>+</sup>-(hCD45<sup>+</sup>)-клеток в общей популяции CD45<sup>+</sup>-клеток (сумма CD45<sup>+</sup>-клеток человека и мыши) в трех группах мышей (n=15 мышей/группу), которые получали неотредактированные контрольные клетки (EP Ctrl) или CD123-KO-клетки (отредактированные с использованием рРНК I или рРНК D1, как показано на оси X) (фигура 14A). Как показано на фигуре 14A, химеризм в костном мозге и процентное содержание hCD45<sup>+</sup>-клеток были эквивалентны в контрольной группе и в группе с нокаутом CD123, что указывает на наличие частоты встречаемости в ядро-содержащем костном мозге.

Кроме того, на 16-й неделе после приживления количественно определяли процент

hCD45<sup>+</sup>-клеток, которые также были позитивными по человеческому CD34 (hCD34<sup>+</sup>) в костном мозге (фигура 14B). Как показано на фигуре 14B, процент hCD45<sup>+</sup>-клеток, также экспрессирующих hCD34, был эквивалентен в контрольной группе и в группе с нокаутом CD123.

На 16-й неделе после приживления, в костном мозге количественно оценивали процент hCD45<sup>+</sup>-клеток, которые представляли собой В-клетки, Т-клетки, моноциты, нейтрофилы, обычные дендритные клетки (cDC), плазмощитоидные дендритные клетки (pDC), эозинофилы, базофилы и тучные клетки (фигура 14C). Процентное содержание этих различных подтипов иммунных клеток было одинаковым у контрольной группы и у группы с нокаутом CD123. Эти данные указывают на восстановление клеток кроветворной системы человека из отредактированных CD123-КО-клеток у мышей.

Процентное содержание CD123-КО-клеток, которые представляли собой hCD45<sup>+</sup>-клетки, количественно определяли в костном мозге контрольных мышей и у мышей с привитыми CD123-КО-клетками на 16-й неделе после трансплантации (фигура 15). Процент hCD123<sup>+</sup>-hCD45<sup>+</sup>-клеток был значительно ниже в CD123-КО-клетках (клетках, отредактированных с использованием рПНК I или рПНК 25), по сравнению с контрольной группой, что указывает на потерю CD123 из ядерных клеток крови в этих группах. Эти данные также демонстрируют долгосрочную персистентность CD123-КО-HSC в костном мозге мышей NBSGW.

#### **Пример 5: Оценка CD123-КО-CD34<sup>+</sup>-клеток in vitro**

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

рПНК (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 руководящих РНК, нацеленных на CD123: рПНК I и рПНК D1, 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 (рПНК I) или путем секвенирования ампликона (рПНК D1) для определения эффективности редактирования в CD34<sup>+</sup>-HSPC. Как показано на фигуре 16A, рПНК I и рПНК D1 давали частоту редактирования 75,8% и 71,1%, соответственно. Экспрессию CD123 на клеточной поверхности также определяли количественно с помощью FACS в CD123-КО-клетках (отредактированных с использованием рПНК I или рПНК D1), в неотредактированном контроле (EP ctrl) или в контроле FMO (флуоресценция -1). CD34<sup>+</sup>-HSPC, отредактированные с использованием рПНК I или рПНК D1, продемонстрировали более низкую экспрессию CD123 по сравнению с неотредактированным контролем (EP ctrl) (фигура 16A).

Неотредактированные контрольные клетки (EP ctrl) или CD123-КО-клетки, отредактированные с использованием рПНК I или рПНК D1, культивировали в среде для миелоидной дифференцировки, индуцируя либо гранулоцитарные (Фигура 16B), либо

моноцитарные (фигура 16С) линии дифференцировки, и количество клеток определяли в течение определенного периода времени. CD123-КО-клетки продемонстрировали рост клеток, сравнимый с ростом неотредактированных контрольных клеток в среде для дифференцировки культуры гранулоцитов (фигура 16В) и моноцитов (Фигура 16С).

Кроме того, процент клеток, которые были дифференцированы в CD123<sup>+</sup>-гранулоциты (фигура 17,верху), или клеток, которые были дифференцированы в CD123<sup>+</sup>-моноциты (фигура 17,внизу), количественно определяли на день 0, 7 и 14 после редактирования и культивирования неотредактированных контрольных клеток или CD123-КО-клеток, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1. Гранулоциты и моноциты, полученные из CD123-КО-клеток, продемонстрировали устойчивую потерю экспрессии CD123 с течением времени по сравнению с неотредактированными контрольными клетками (фигура 17). Также оценивали способность CD123-КО-клеток дифференцироваться в миелоидные клетки *in vitro*. Процент CD15-позитивных (фигура 18,верху слева) или CD11b-позитивных гранулоцитов (фигура 18,верху справа) определяли количественно на 0, 7 и 14-й день после редактирования и культивирования неотредактированных контрольных клеток или CD123-КО-клеток, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1. На экспрессию этих гранулоцитарных маркеров не влияла потеря CD123. Процент CD14-позитивных (фигура 18,внизу слева) или CD11b-позитивных моноцитов (фигура 18,внизу справа) определяли количественно на 0, 7 и 14-й день после редактирования и культивирования неотредактированных контрольных клеток или CD123-КО-клеток, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1. Подобно маркерам гранулоцитов, экспрессия этих маркеров моноцитов не зависела от потери CD123. Экспрессия CD33 (маркера миелоидных клеток) и HLA-DR (ответственных за презентацию антигена) также не изменялась при разрушении CD123. Эти данные показали, что потеря CD123 не влияет на миелоидную дифференцировку *in vitro*.

Функцию CD123-КО-клеток также оценивали *in vitro*. Процент фагоцитоза, осуществляемого гранулоцитами (фигура 19А,верху) и моноцитами (фигура 19А,внизу), был количественно определен в популяции контрольных клеток и в популяциях CD123-КО-клеток. Активность фагоцитоза была эквивалентна у контрольных и у CD123-КО-клеток как для гранулоцитов, так и для моноцитов, что указывает на то, что CD123-КО-клетки сохраняли фагоцитозную активность (фигура 19). Также оценивали способность CD123-КО-клеток продуцировать воспалительные цитокины при стимуляции. Гранулоциты (фигура 19А) и моноциты (фигура 19В), полученные из неотредактированных контрольных клеток или CD123-КО-клеток, отредактированных с использованием рРНК I или рРНК D1, не были стимулированы или были стимулированы LPS или R848. Уровни IL-6 (фигура 19А или 19В,слева) и TNF-α (фигура 19А или 19В,справа) были затем количественно оценены. CD123-КО-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 CD123. В целом, эти данные показали, что потеря CD123 не влияла на функцию миелоидных клеток *in vitro*.

Потенциал дифференцировки CD34<sup>+</sup>-CD123-KO-клеток с генами (отредактированными с использованием рПНК I или рПНК D1) 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 CD123 с использованием рПНК I (частота редактирования 77,9%) или рПНК D1 (частота редактирования 72,5%), продуцировали меньше колоний BFU-E, CFU-G/M/GM и CFU-GEMM по сравнению с неотредактированными контрольными клетками (фигура 20A). Однако, клетки, отредактированные по CD123, 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 CD123-отредактированные клетки сохраняют значительный потенциал дифференцировки в этом анализе (фигура 20B). 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 CD123, сохраняют способность дифференцироваться в клетки различных типов.

#### **Пример 6. Оценка резистентности клеток с отредактированным CD123 к эффекторным клеткам CART.**

В этом примере описана оценка резистентности CD123-отредактированных клеток к эффекторным клеткам CART, нацеленным на CD123. CD123-KO-клетки, в которых отсутствует экспрессия CD123, устойчивы к уничтожению CD123 CAR по сравнению с CD123<sup>+</sup>-клетками дикого типа, как было определено с помощью анализов, описанных в настоящей заявке.

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

рПНК (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 рПНК, нацеленных на CD123, например, рПНК, нацеленных на CD123, как показано в Таблицах 2, 6 или 8.

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

CAR второго поколения были сконструированы для нацеливания на CD123. 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 $\zeta$ . Последовательность антитела scFv против CD123 было получено из клона 32716 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 CD123 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 шариков 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 CD123, 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 CD123. 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  $((\text{целевая фракция без эффекторных клеток} - \text{целевая фракция с эффекторными клетками}) / (\text{целевая фракция без эффекторов})) \times 100\%$ .

Описанный выше анализ показал, что CD123-KO-HPSC (и их потомство) являются резистентными к уничтожению, опосредованному антителами против CD123 CAR-T, в то время как неотредактированные контрольные HPSC (и их потомство) были восприимчивы к уничтожению, опосредованному антителами против CD123 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 руководящей РНК, нацеленной на домен-мишень CD123, как описано в любой из Таблиц 2, 6 или 8. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, редактирование осуществляют с использованием рРНК, содержащей нацеливающий домен, описанный в настоящей заявке для рРНК А, рРНК I и рРНК Р3. Вкратце, целевую модификацию (делецию, усечение, замену) CD123 вводят посредством редактирования гена CRISPR с использованием подходящей руководящей РНК и подходящей РНК-зависимой нуклеазы, например, нуклеазы Cas9, что будет приводить к потере экспрессии CD123 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 CD123, например, терапию CAR-T-клетками, нацеленными на CD123. 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. Иммунотерапия, нацеленная на CD123, селективно нацелена на CD123-экспрессирующие злокачественные или предраковые клетки, и уничтожает эти клетки, а также она может воздействовать на

некоторые здоровые клетки, экспрессирующие CD123, 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 CD123.

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 CD123, и для подтверждения успешного приживания 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. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 21.
2. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 22.
3. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 23.
4. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 24.
5. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 25.
6. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 26.
7. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27.
8. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 28.
9. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 29.
10. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 30.
11. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 48.
12. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 49.
13. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 50.
14. рРНК, содержащая нацеливающий домен, где нацеливающий домен содержит последовательность SEQ ID NO: 51.
15. рРНК, содержащая нацеливающий домен, который связывается с доменом-мишенью из Таблицы 1, 2, 6 или 8.
16. рРНК, содержащая нацеливающий домен, способный регулировать расщепление или редактирование домена-мишени из Таблицы 1, 2, 6 или 8.
17. рРНК по любому из пп. 1-16, которая содержит первый комплементарный домен; связывающий домен; второй комплементарный домен, комплементарный первому комплементарному домену; и проксимальный домен.
18. рРНК по любому из пп. 1-17, которая представляет собой одноцепочечную руководящую РНК (оцрРНК).
19. рРНК по любому из пп. 1-18, которая содержит один или более 2'О-метил-нуклеотидов.

20. рРНК по любому из пп. 1-19, которая содержит одну или более фосфортионных 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) рРНК по любому из пп. 1-20; и (b) молекулы Cas9, которая связывается с рРНК,

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 CD123.

28. Популяция клеток по п. 26 или 27, которая экспрессирует менее 20% CD123, 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 CD123.

31. Популяция клеток по п. 28, где ген, кодирующий антиген клеточной поверхности, специфичный к линии дифференцировки и отличающийся от CD123, представляет собой CD33 или CLL1.

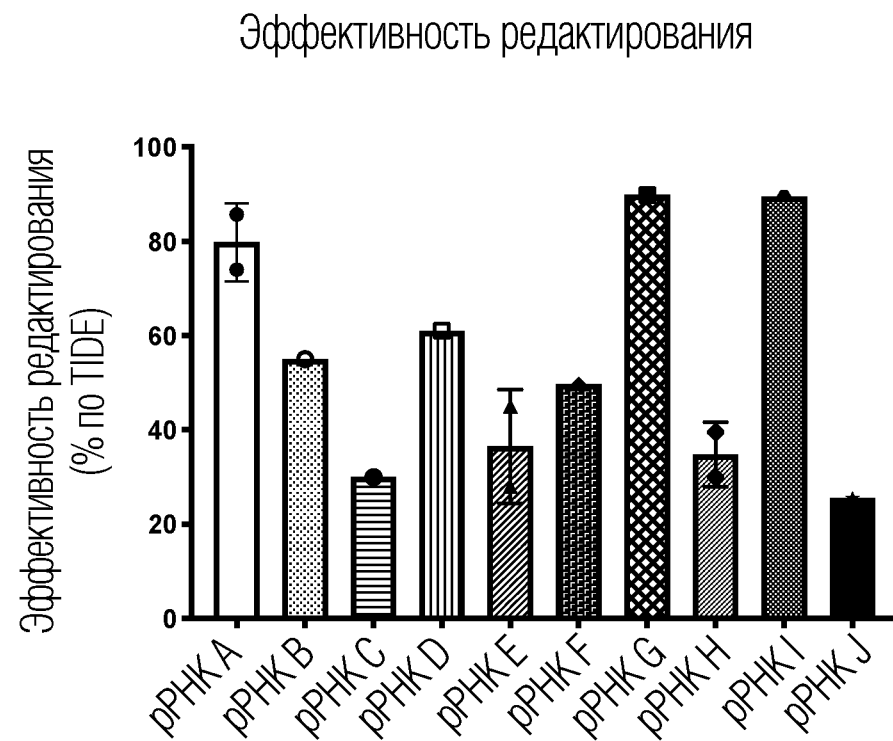
32. Способ, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, клеточной популяции по любому из пп. 26-31.

33. Способ по п. 28, где у индивидуума имеется злокачественное новообразование кроветворной системы.

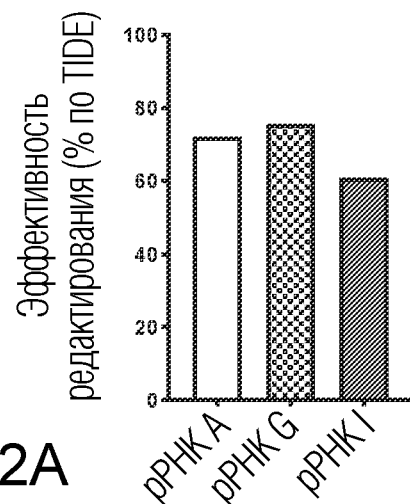
34. Способ по п. 28 или 33, который дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества агента, нацеленного на CD123, где указанный агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD123.

По доверенности

ФИГ. 1

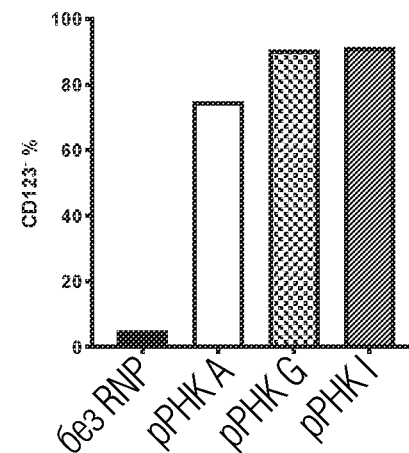


N = 1-2

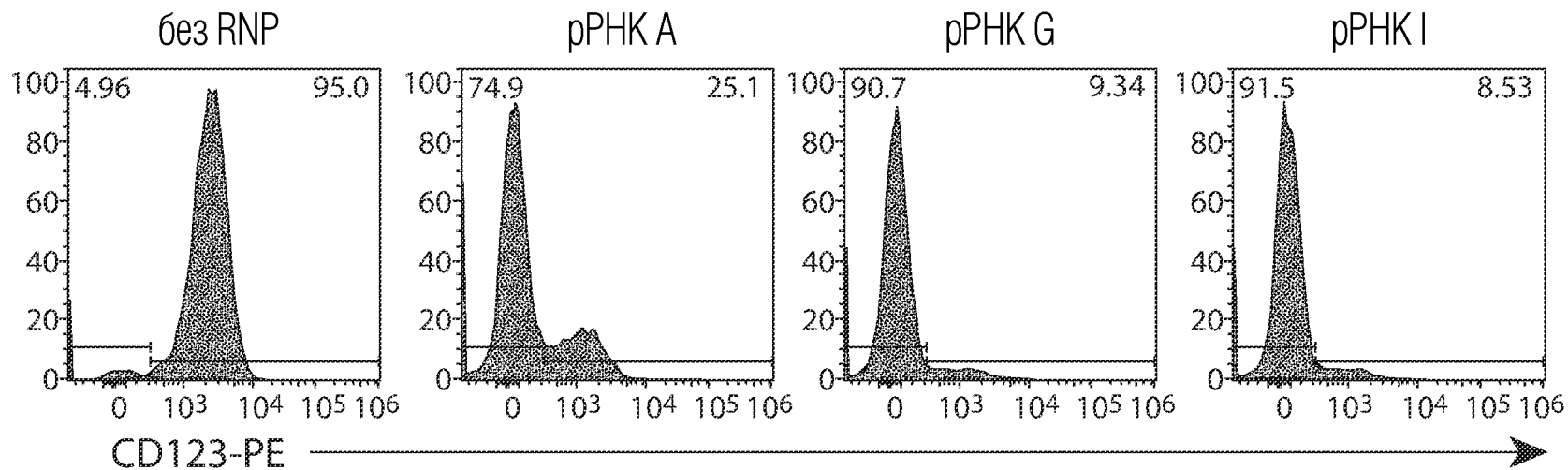


ФИГ. 2А

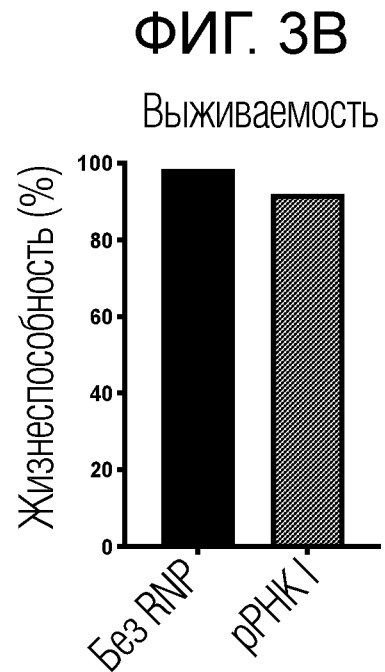
Снижение уровня экспрессии белка клеточной поверхности



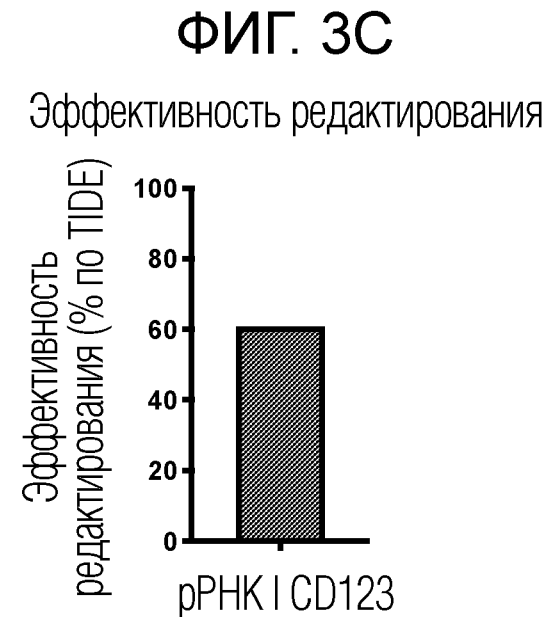
ФИГ. 2С



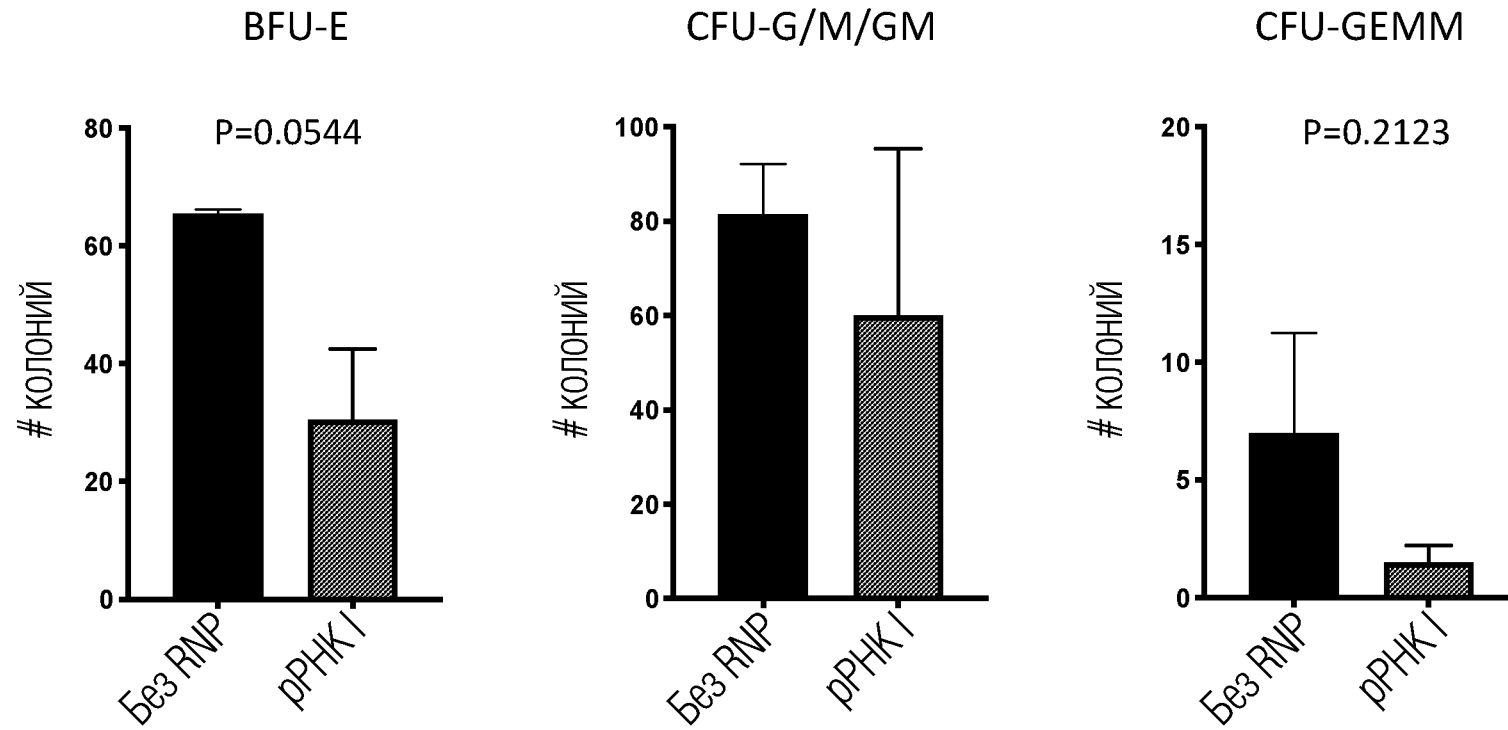
ФИГ. 2В

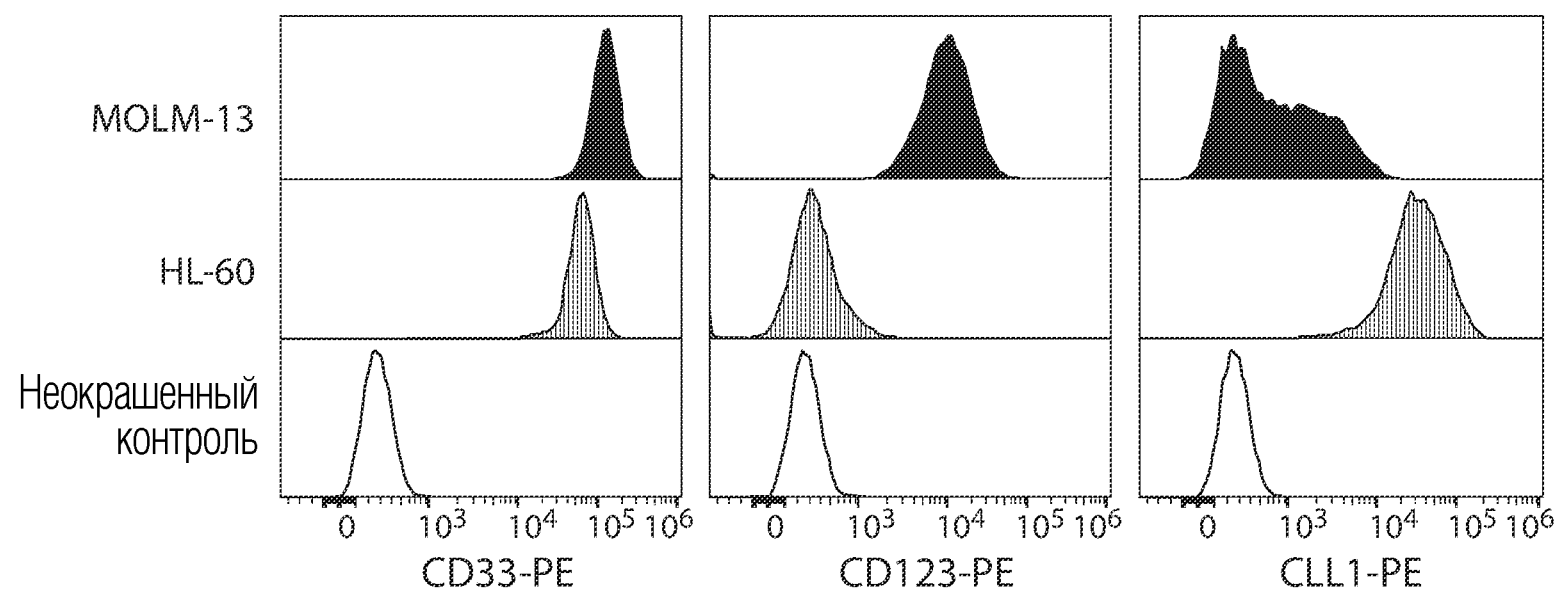


Через 48 часов после электропорации

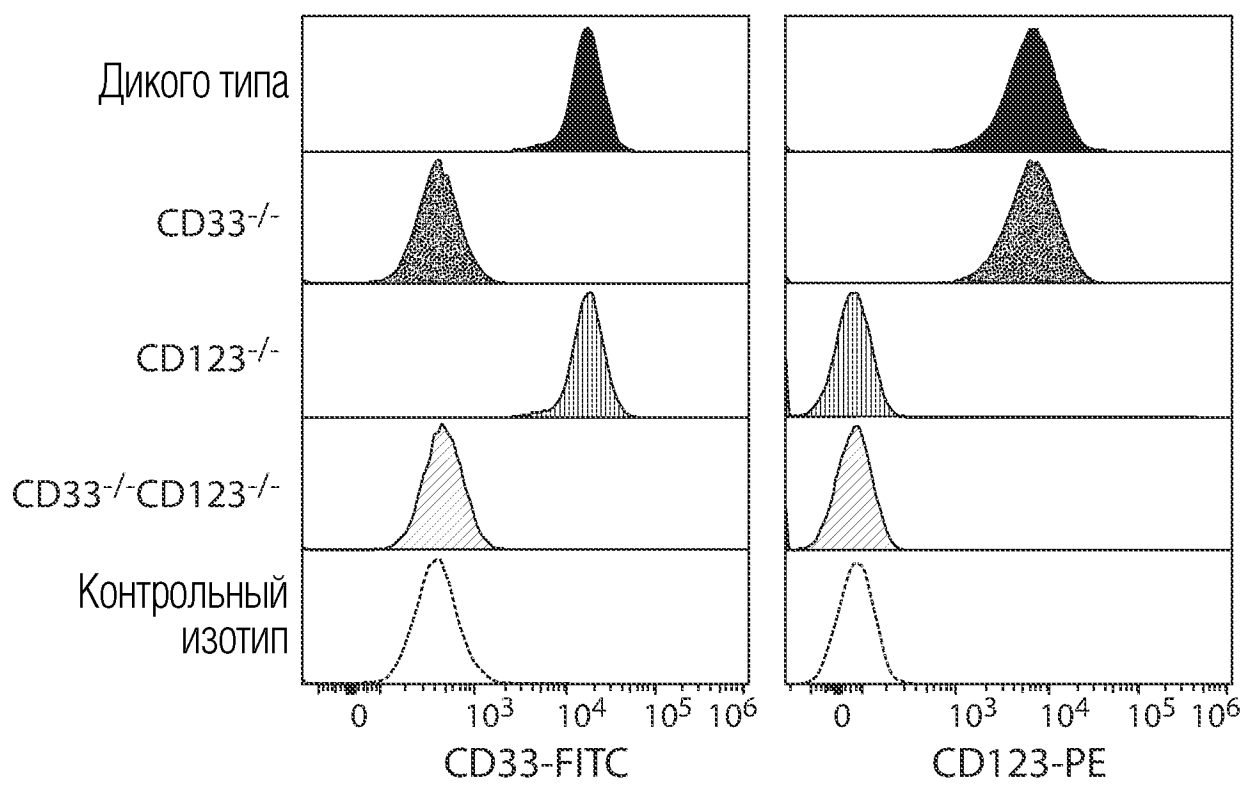


## ФИГ. 3D



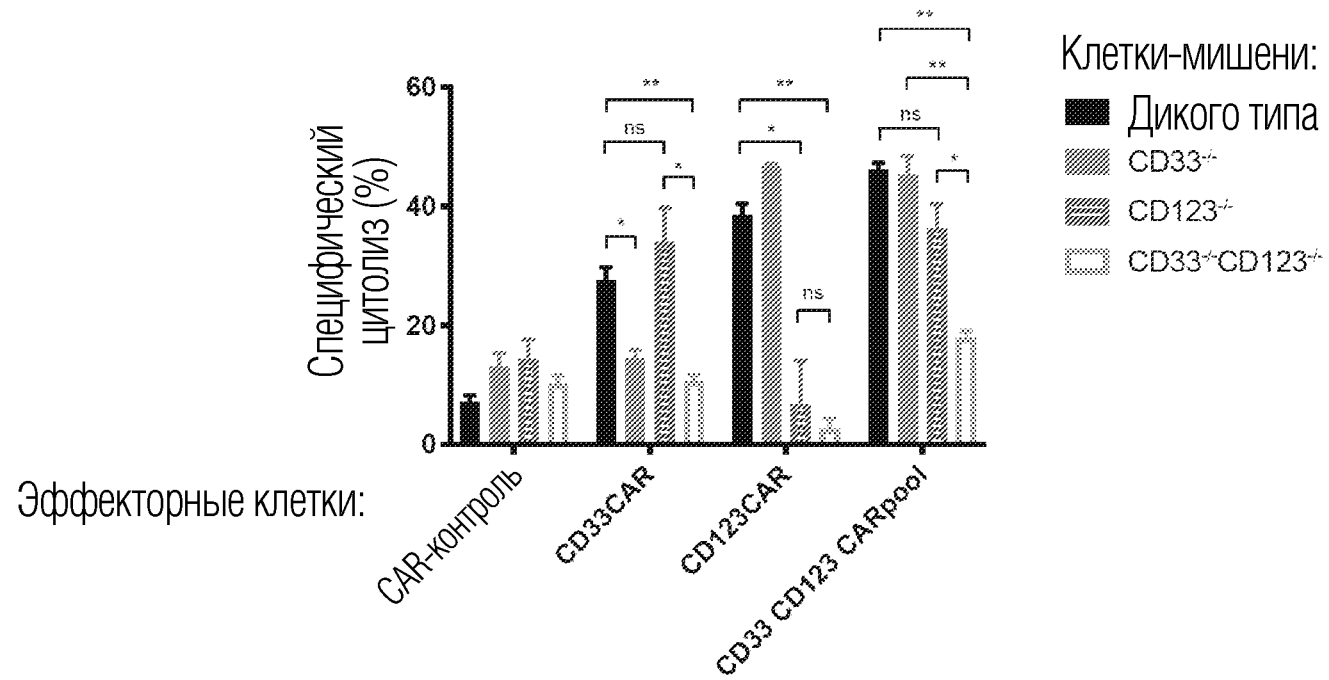


ФИГ. 4

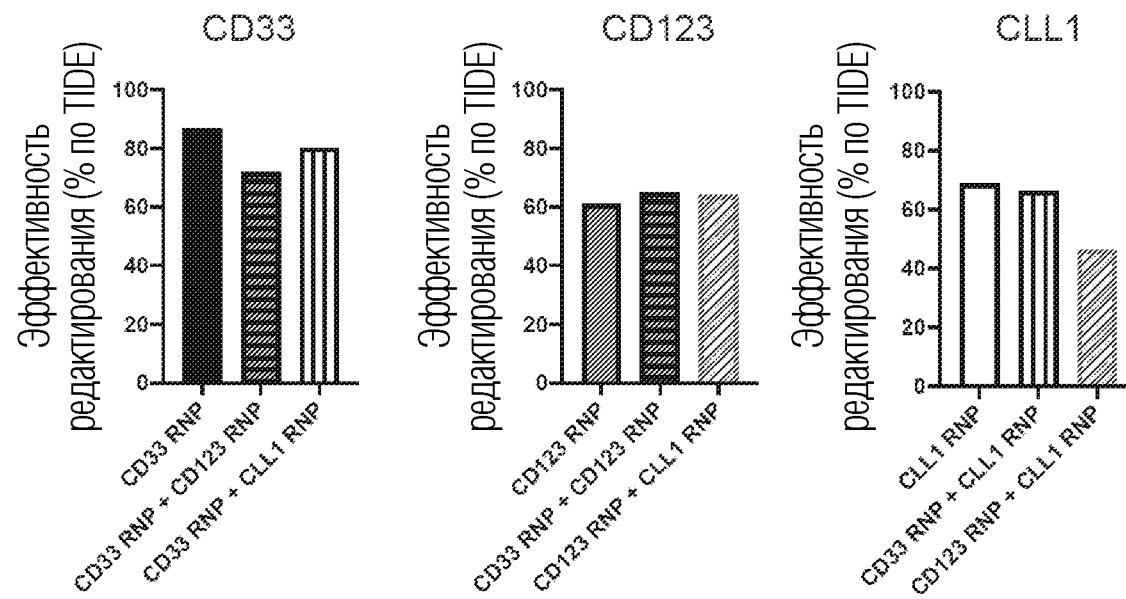


ФИГ. 5

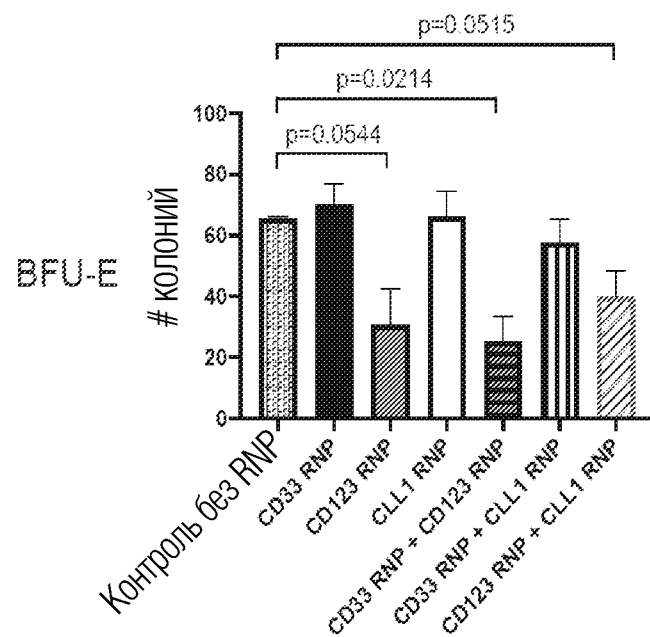
ФИГ. 6



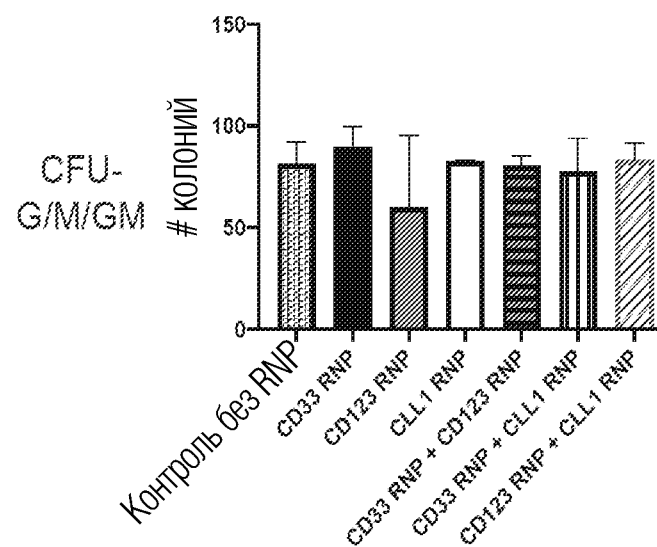
ФИГ. 7



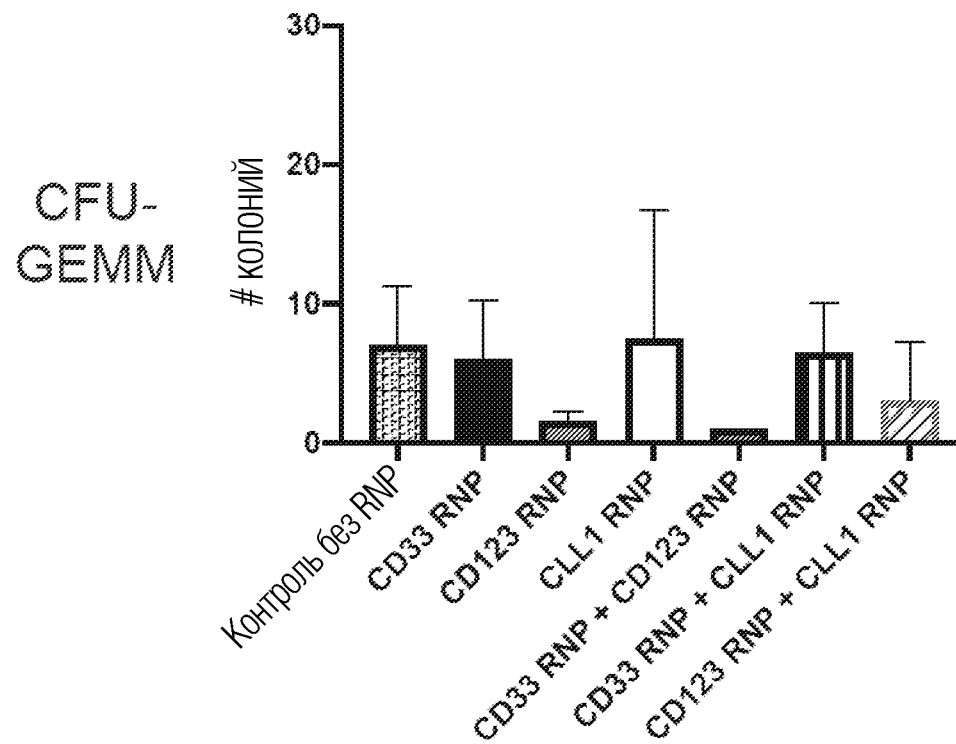
ФИГ. 8А



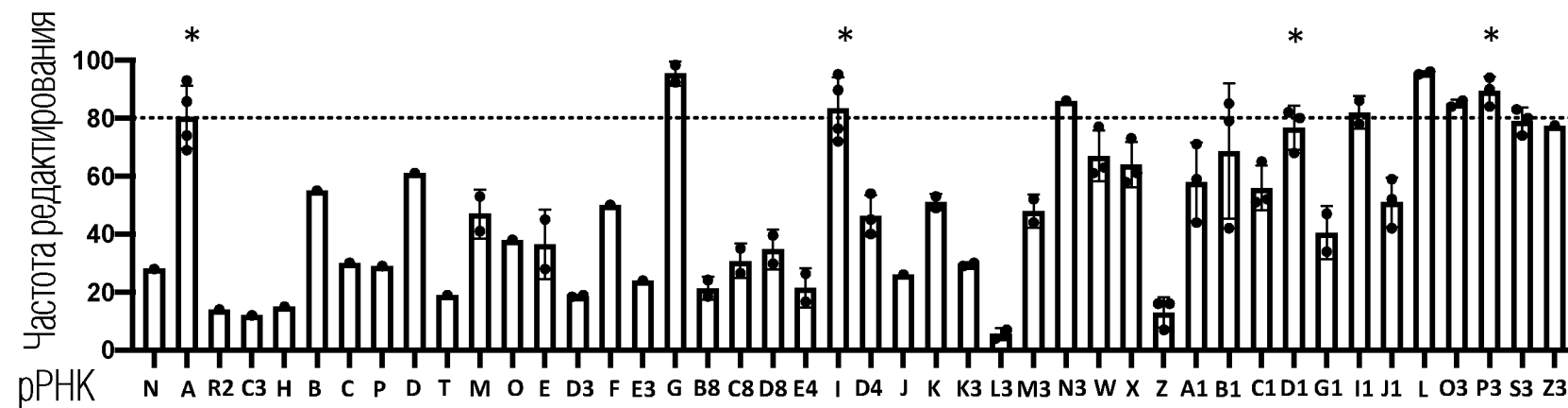
ФИГ. 8В



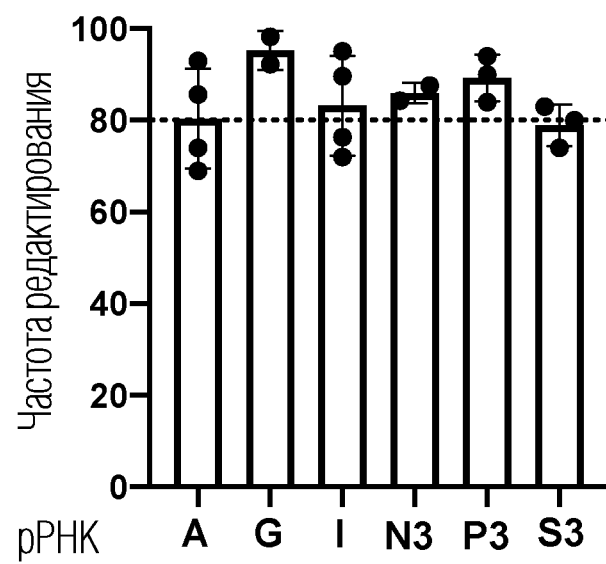
ФИГ. 8С

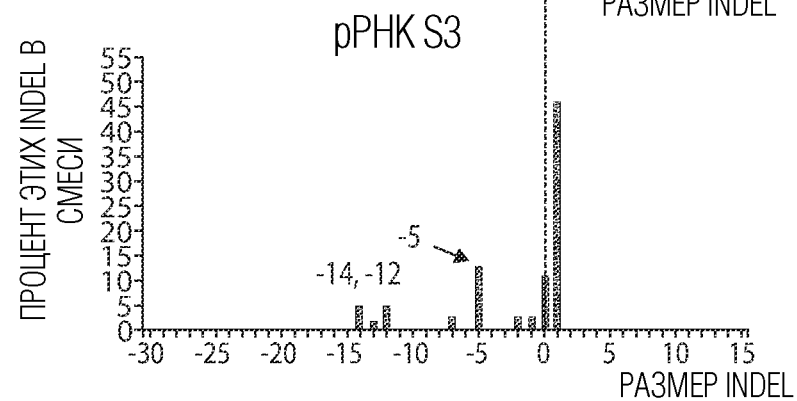
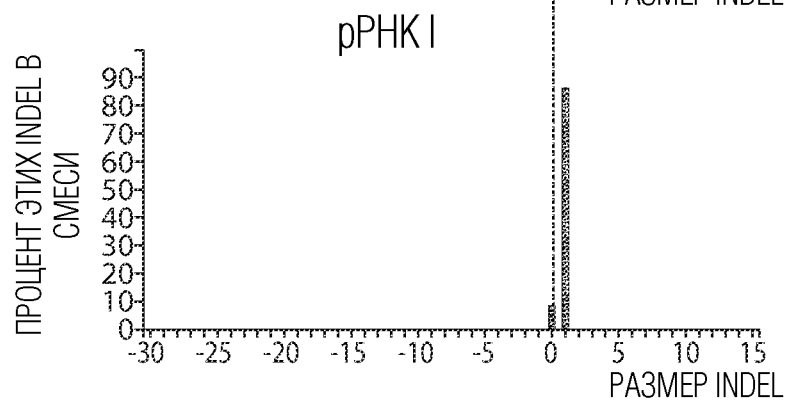
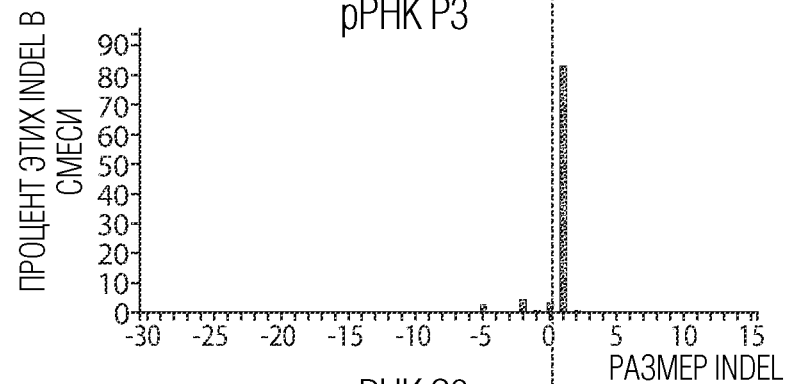
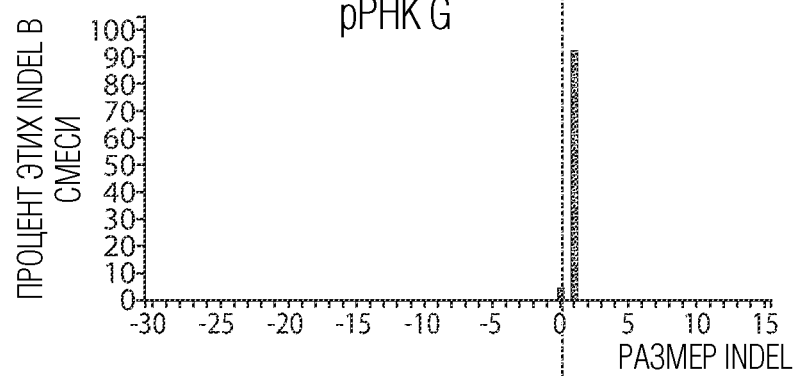
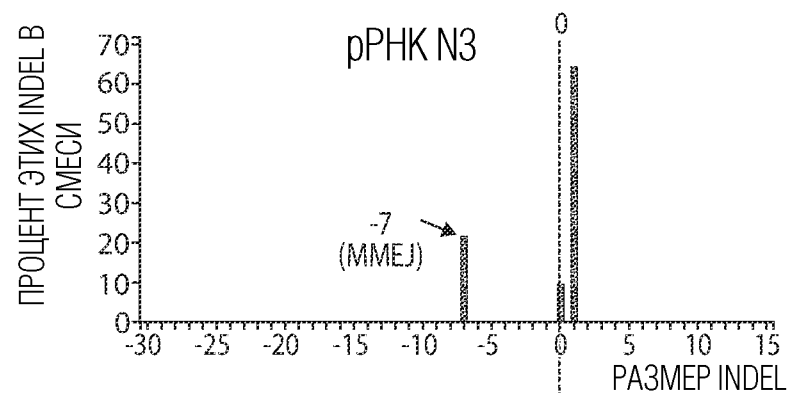
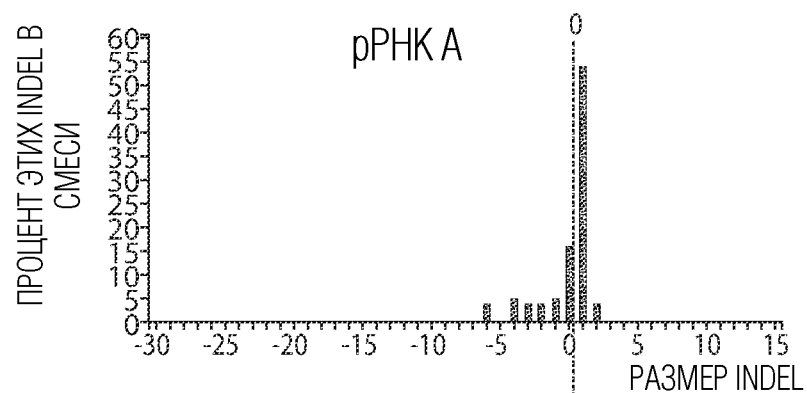


ФИГ. 9

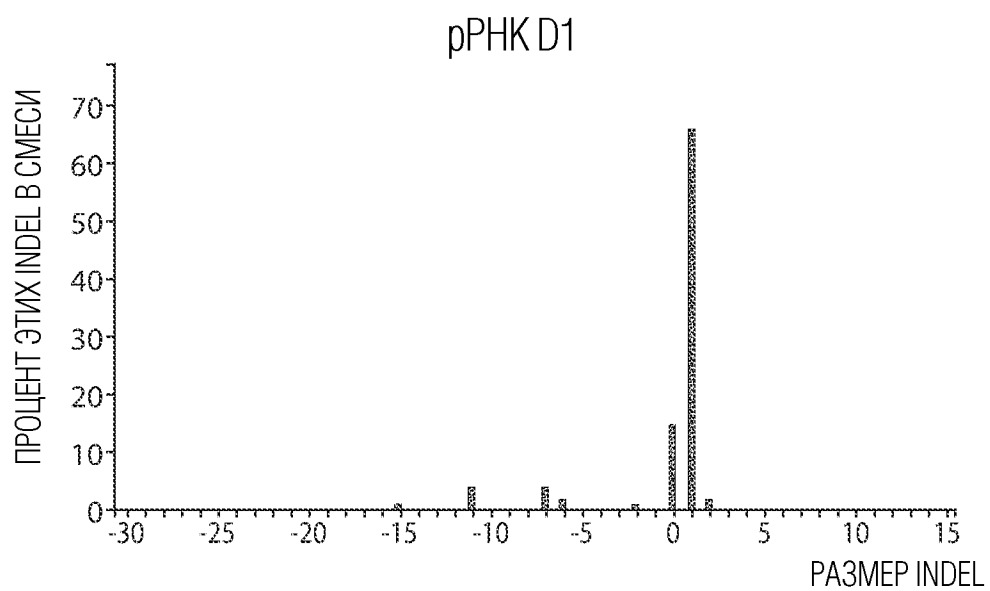


ФИГ. 10



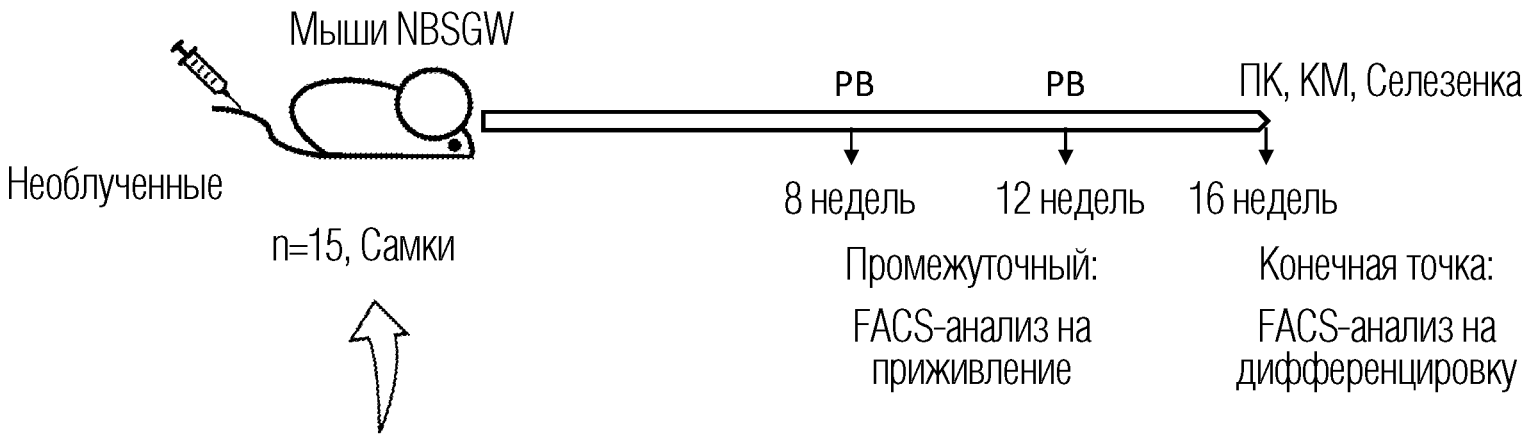


ФИГ. 11



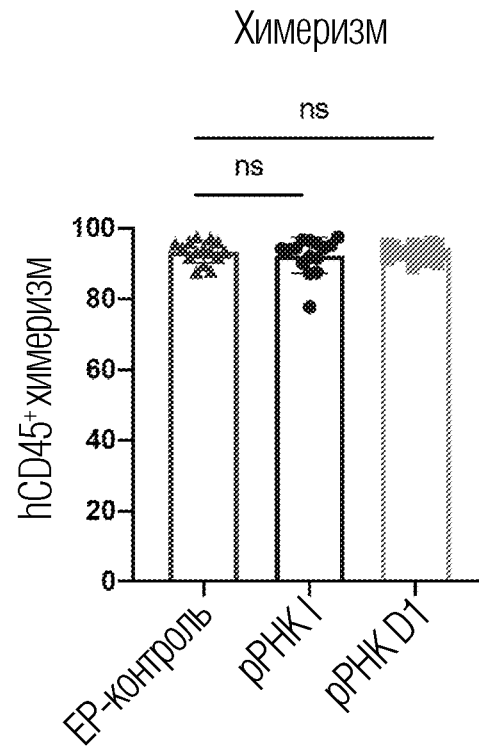
ФИГ. 12

ФИГ. 13

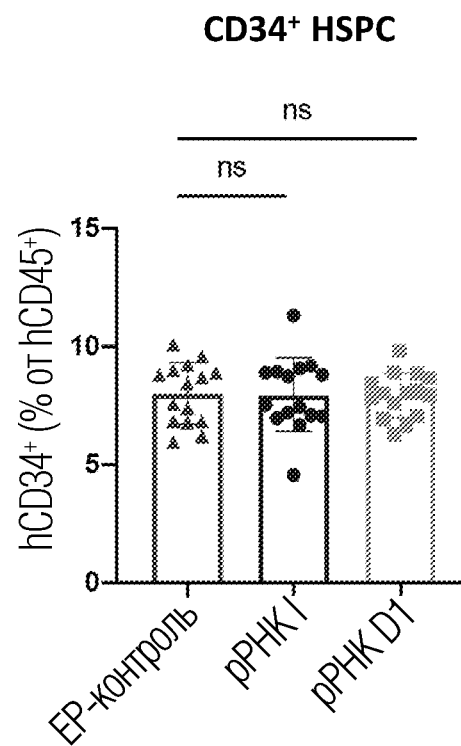


|                                                      |
|------------------------------------------------------|
| <b>CD34<sup>+</sup> HSPCs</b>                        |
| Только EP-контроль                                   |
| Отредактир. с использов. рРНК I CD123 (изоформа 1+2) |
| Отредактир. с использов. рРНК I CD123 (изоформа 1)   |

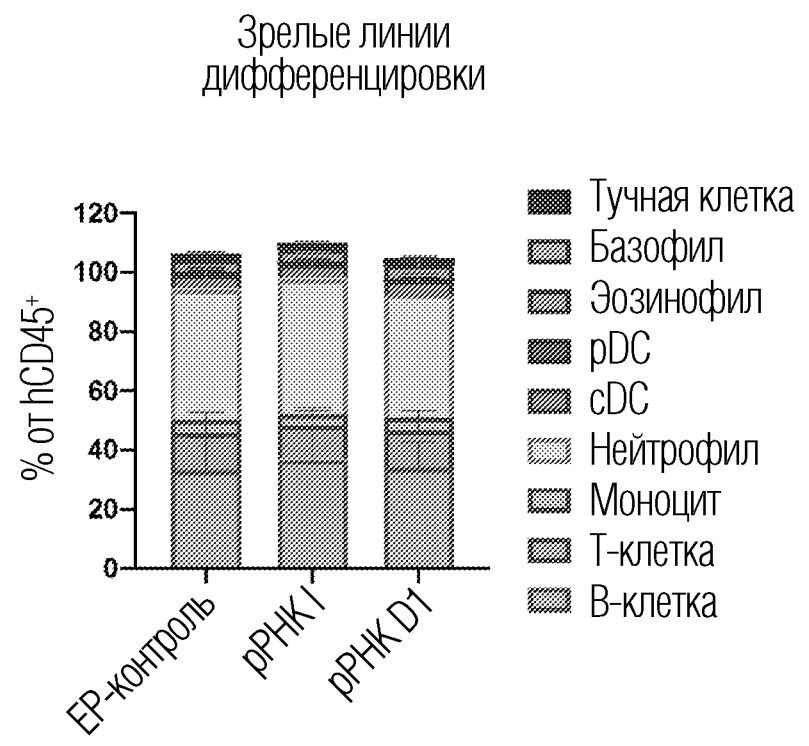
ФИГ. 14А



ФИГ. 14В



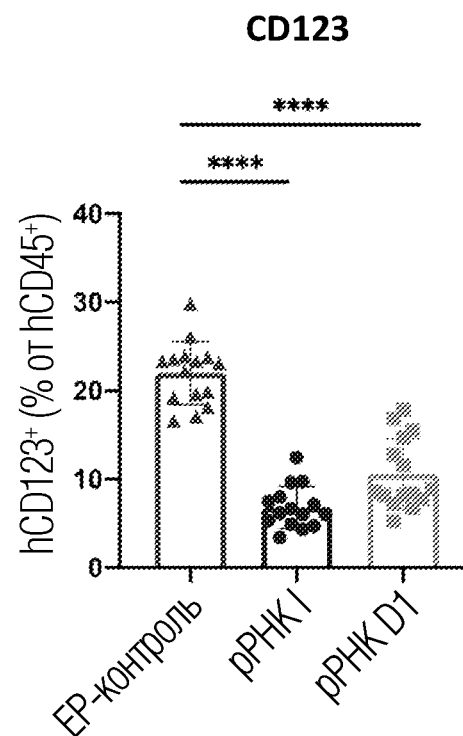
ФИГ. 14С



16/25

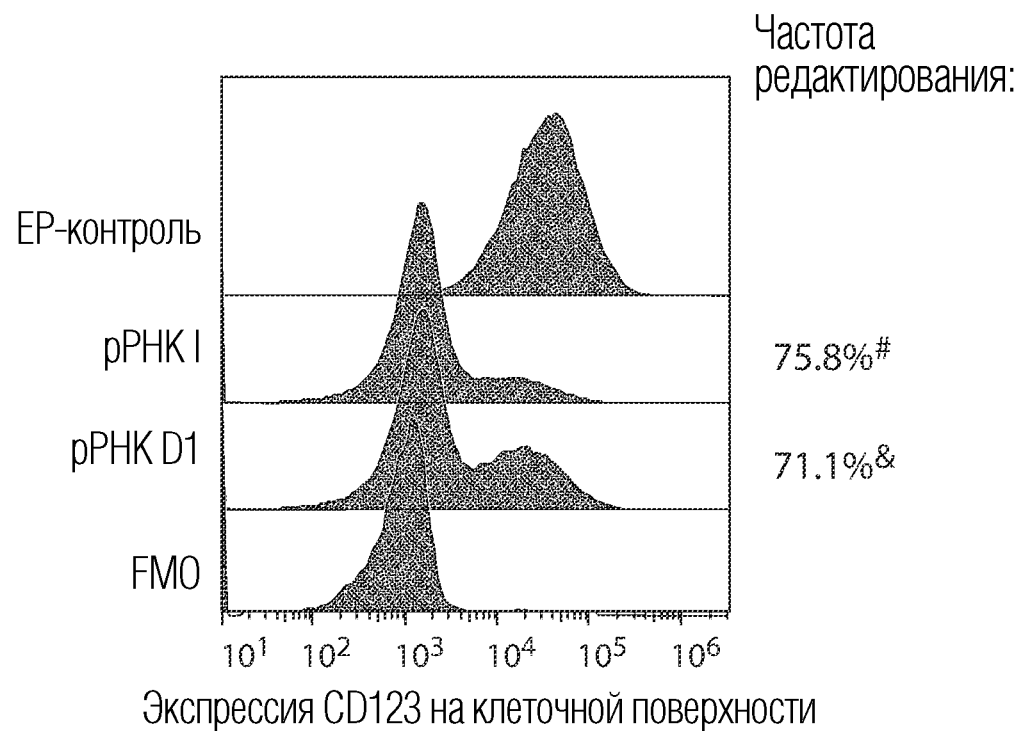
Анализ костного мозга через 16 недель после приживления  
N=15, среднее  $\pm$  ст.от.; непарный однофакторный ANOVA

## ФИГ. 15



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

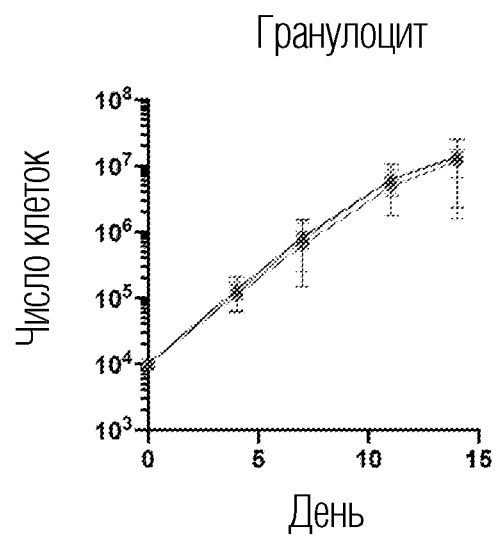
## Эффективность редактирования CD123



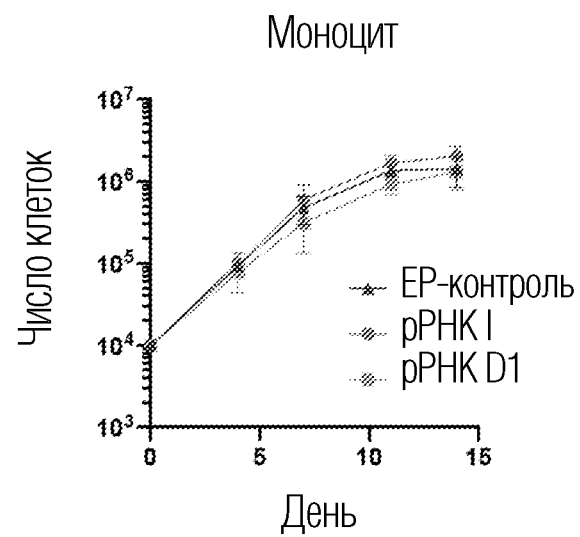
# Частота редактирования, оцененная с помощью *TIDE*  
 & Частота редактирования, оцененная путем секвенирования ампликона

ФИГ. 16А

ФИГ. 16В

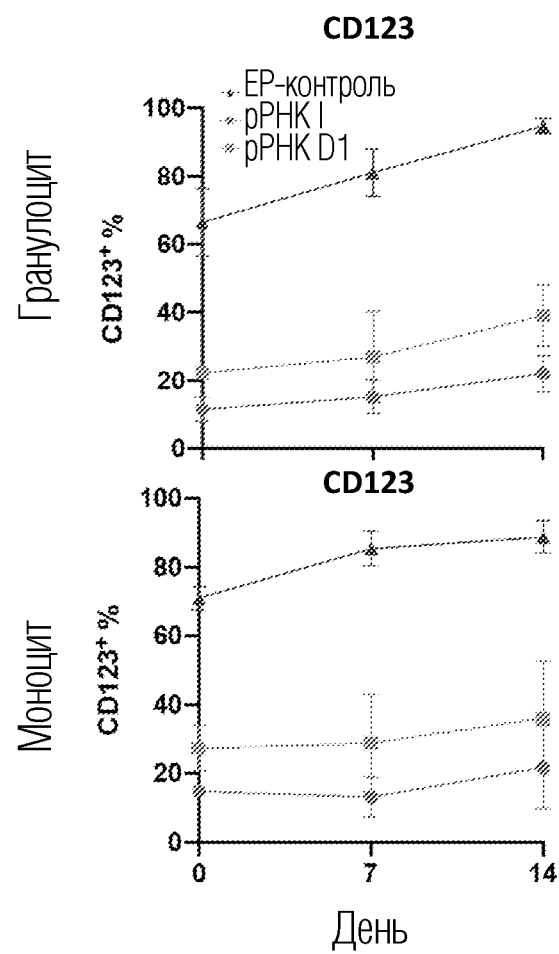


ФИГ. 16С



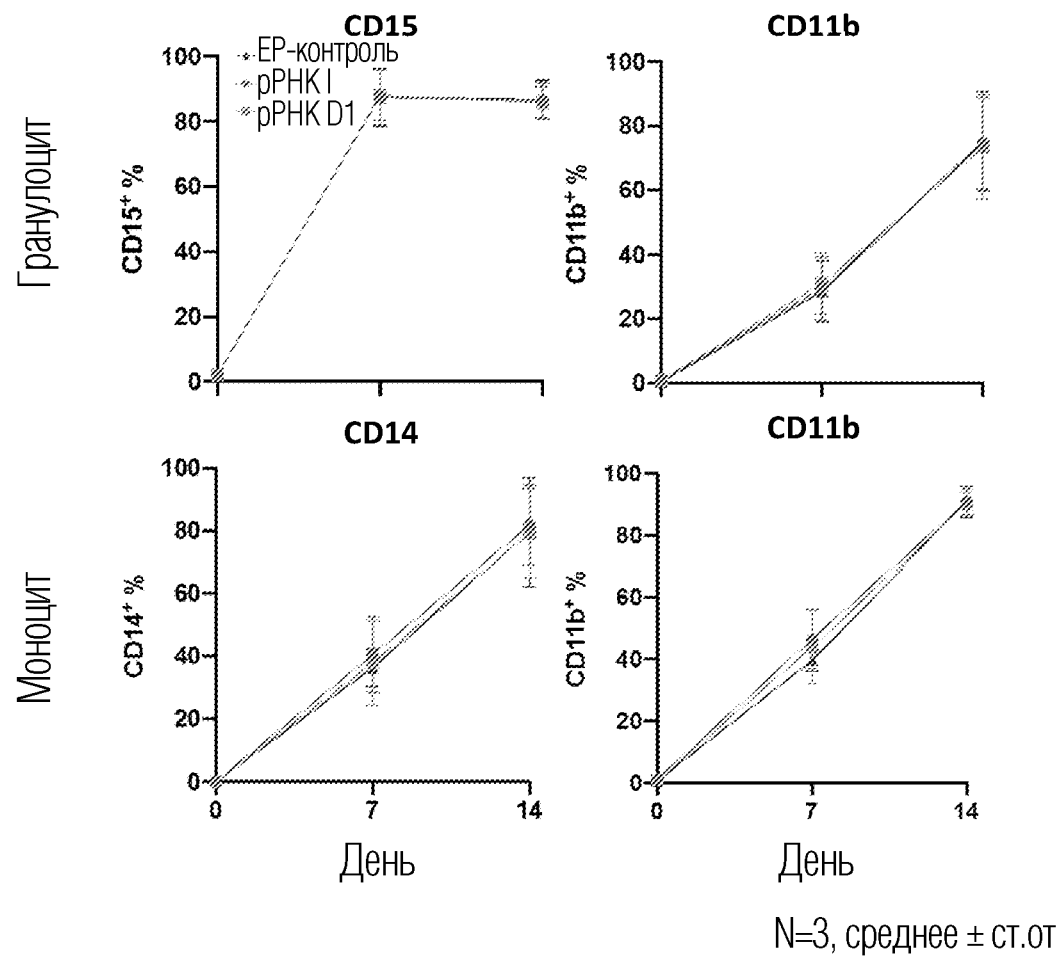
N=2, среднее  $\pm$  ст.от.

# ФИГ. 17

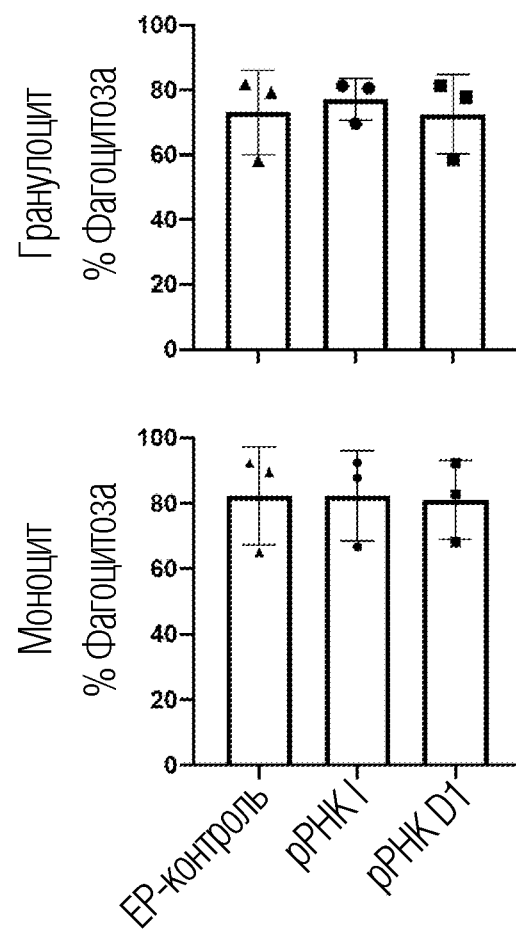


N=3, среднее ± ст.от.

ФИГ. 18

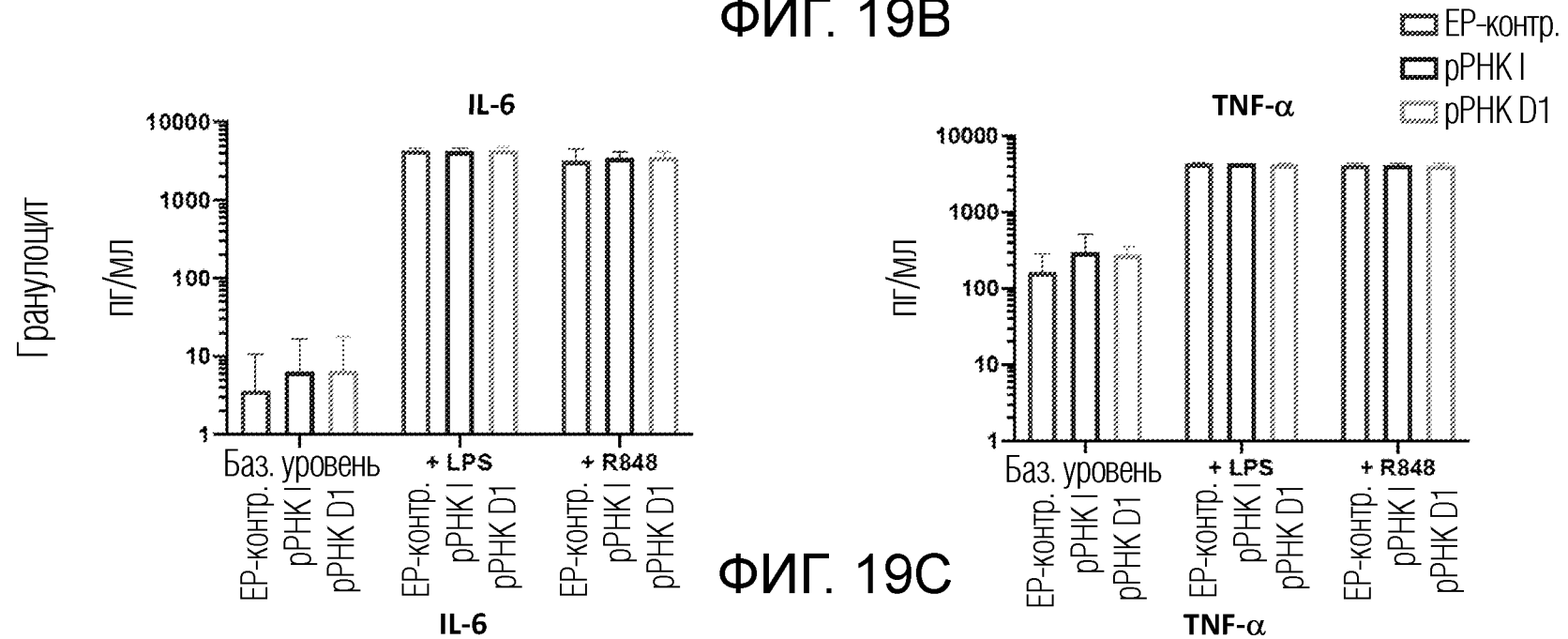


ФИГ. 19А

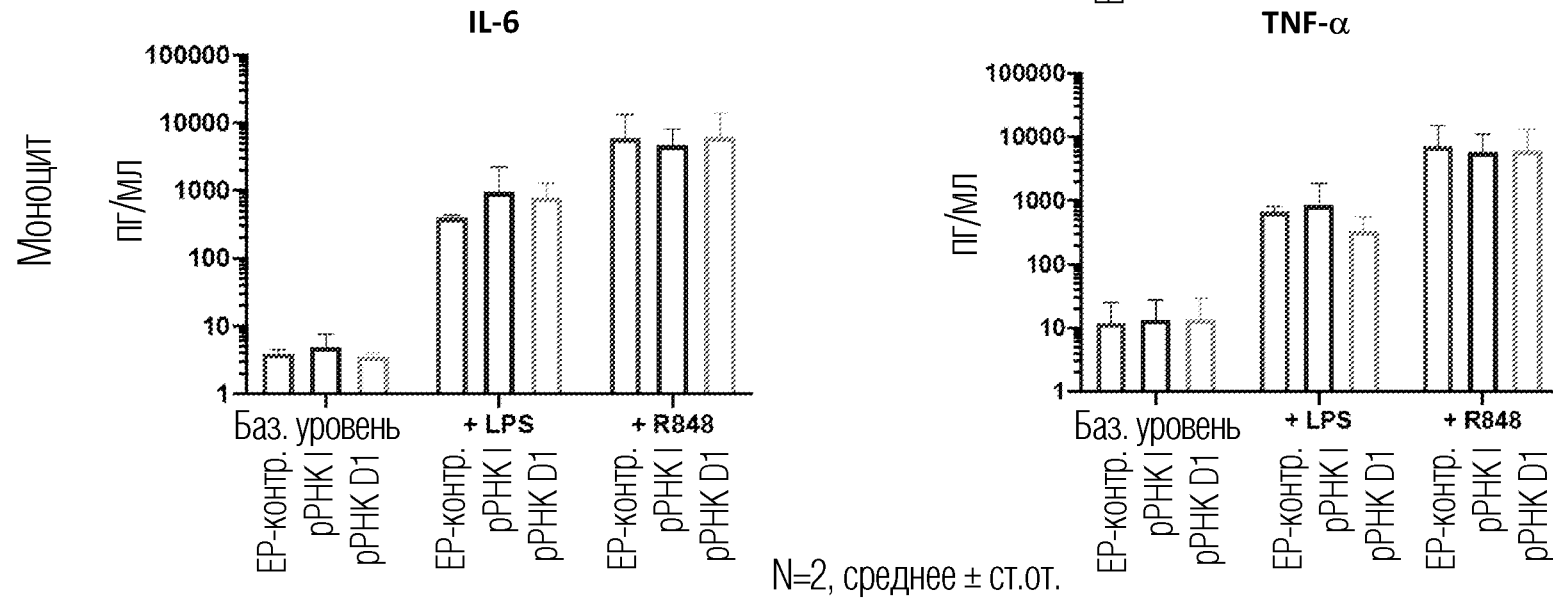


N=3, среднее  $\pm$  ст.от.

ФИГ. 19В

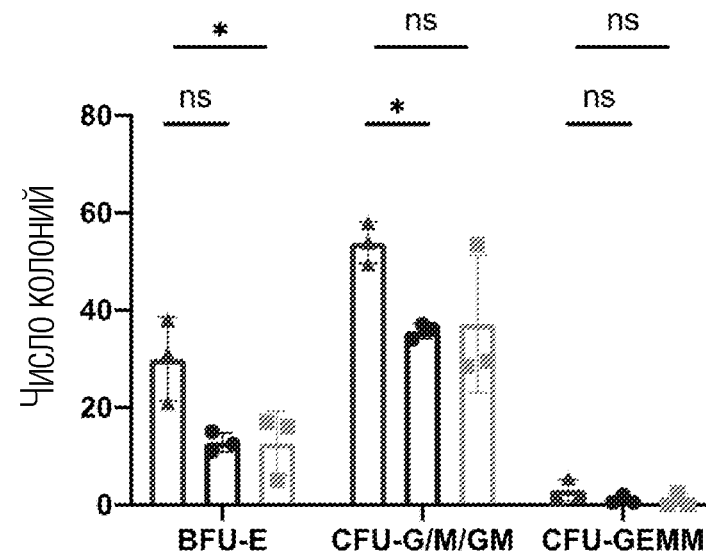


ФИГ. 19С



N=2, среднее  $\pm$  ст.от.

ФИГ. 20А

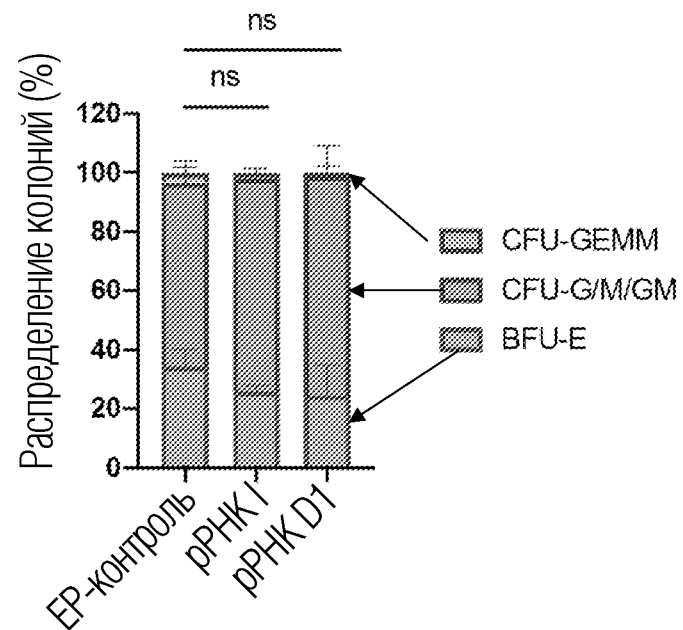


Частота редактирования:

- EP-контроль
- pRNA I  $77.9 \pm 4.5\%$
- pRNA D1  $72.5 \pm 5.6\%$

Парный однофакторный ANOVA  
N=3, среднее  $\pm$  ст.от.

ФИГ. 20В



Парный двухфакторный ANOVA

N=3, среднее  $\pm$  ст.от.