(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293200 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.03

(22) Дата подачи заявки
2021.05.04

(51) Int. Cl. ***C12N 15/90*** (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) ОТБОР ПОСРЕДСТВОМ НОКИНА СУЩЕСТВЕННЫХ ГЕНОВ

(31) **63/019,950**
(32) **2020.05.04**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/030744**
(87) **WO 2021/226151 2021.11.11**
(88) **2021.12.02**

(71) Заявитель:
ЭДИТАС МЕДИСИН, ИНК.;
БЛЮРОК ТЕРАПЬЮТИКС ЛП (US)

(72) Изобретатель:
Зурис Джон Энтони, Маргулиес Кэрри Мари, Сох Чю-Ли, Тонге Питер, Томишима Марк Джэймс, Маколифф Конор Брайан, Монетти Клаудио (US)

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

(57) Предусмотрены стратегии, системы, композиции и способы для эффективного получения подвергнутых нокину клеточных клонов без репортерных генов. Нацеливание на существенный ген происходит с использованием нокин-кассеты, которая содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена (или "последовательность груза") в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). Нежелательные события нацеливания приводят к получению нефункциональной версии существенного гена, по существу к нокауту гена, который "спасается" путем правильной интеграции нокин-кассеты, при которой восстанавливается кодирующая область существенного гена, так что продуцируется функциональный продукт гена, и последовательность груза располагается в рамке считывания с кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее.

202293200 A1

202293200 A1

ОТБОР ПОСРЕДСТВОМ НОКИНА СУЩЕСТВЕННЫХ ГЕНОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 63/019950, поданной 4 мая 2020 г., содержание которой включено в данный документ во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Одна из основных проблем со стратегиями целенаправленной интеграции для получения генетически сконструированных клеток заключается в том, что успешные события целенаправленной интеграции могут быть редкими, особенно при использовании двухнитевой ДНК (dsDNA) в качестве матрицы, где значения эффективности нокина часто составляют менее 5%. Поэтому обычно требуется стратегия скрининга или отбора, которая обеспечивает обогащение клеточными клонами, несущими успешно интегрированный аллель или ген. Было разработано множество стратегий отбора для идентификации подвергнутых правильному целенаправленному воздействию клонов, например, путем коинтеграции репортерных генов, которые придают флуоресценцию, устойчивость к антибиотикам и т. д. Однако эти стратегии отбора являются времязатратными, неэффективными и нежелательными для использования в терапевтическом контексте. Действительно, даже для одной целенаправленной интеграции может потребоваться скрининг сотен, а иногда и тысяч клонов, чтобы идентифицировать подвергнутый успешному целенаправленному воздействию клон. В ситуациях, когда необходимы множественные редактирования, может потребоваться скрининг десятков тысяч клонов или больше.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В настоящем изобретении предусмотрены стратегии, системы, композиции и способы для генетического конструирования клеток посредством целенаправленной интеграции, которые не требуют внешних маркеров отбора, таких как флуоресцентные маркеры или маркеры устойчивости к антибиотикам, обеспечивая при этом высокую частоту подвергнутых правильному целенаправленному воздействию клонов. В целом, стратегии, системы, композиции и способы для генетического конструирования клеток посредством целенаправленной интеграции, предусмотренные в данном документе, характеризуются внесением целенаправленного разрыва в существенный ген, опосредованным нуклеазой, и интеграцией экзогенной нокин-кассеты, которая при правильной вставке приводит к получению функционального варианта существенного гена, а также содержит экспрессионную конструкцию, несущую последовательность груза.

[0004] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу редактирования генома клетки (например, клетки в популяции клеток), при этом способ включает приведение клетки (или популяции клеток) в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в

результате этого клетки с отредактированным геномом, которая экспрессирует: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0005] В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки.

[0006] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, клетка больше не экспрессирует продукт гена, кодируемый существенным геном, или его функциональный вариант.

[0007] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0008] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах предпоследнего экзона существенного гена.

[0009] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше клеток, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза

способна вводить вставки/делеции (вставки или делеции) в по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше клеток, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение клетки (или популяции клеток) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, выбранную из таблицы 5. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула связывается с CRISPR/Cas и опосредует ее расщепление в местоположении в пределах существенного гена, которое необходимо для функционирования (например, функциональной экспрессии гена или функции белка). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0010] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0011] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме клетки, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме клетки.

[0012] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из

продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0013] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0014] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует C-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном. В некоторых вариантах осуществления C-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления C-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

[0015] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, например, менее чем на 99%, менее чем на 95%, менее чем на 90%, менее чем на 85% или менее чем на 80% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете на 80%-99% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, например, на 85%-95% или 90%-99% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или с увеличением экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

[0016] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере

один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0017] В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой GAPDH, TBP, E2F4, G6PD или KIF11. В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой ген, выбранный из таблицы 3, таблицы 4 или таблицы 17.

[0018] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0019] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов из одного и того же аллеля существенного гена и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов из разных аллелей существенного гена и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0020] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение клетки (или популяции клеток) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в первом аллеле существенного гена и вторую нокин-кассету во втором аллеле существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0021] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение клетки (или популяции клеток) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету,

содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью первого существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью второго существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях первого существенного гена и вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукты генов, кодируемые первым и вторым существенными генами, которые необходимы для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0022] В другом аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированной клетке, содержащей геном с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и где по меньшей мере часть кодирующей последовательности существенного гена содержит экзогенную кодирующую последовательность.

[0023] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность существенного гена содержит приблизительно 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности существенного гена.

[0024] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность существенного гена кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

[0025] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность существенного гена менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность существенного гена была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке с удалением сайта-мишени для нуклеазы, например, Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность существенного гена содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0026] В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой GAPDH, TBP, E2F4, G6PD или KIF11.

[0027] В некоторых вариантах осуществления геном клетки содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего

интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления геном клетки содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

[0028] В некоторых вариантах осуществления геном клетки содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0029] В некоторых вариантах осуществления геном клетки не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0030] В другом аспекте настоящее изобретение относится к сконструированной клетке, содержащей геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в геноме клетки, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей продукт гена из существенного гена или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где клетка экспрессирует представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, необязательно экспрессируются из эндогенного промотора существенного гена.

[0031] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая продукт гена из существенного гена, содержит приблизительно 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности существенного гена.

[0032] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая продукт гена из существенного гена, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

[0033] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая продукт гена из существенного гена, менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая продукт гена из существенного гена, была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности

существенного гена в клетке с удалением сайта-мишени для нуклеазы, например, Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая продукт гена из существенного гена, содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0034] В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой GAPDH, TBP, E2F4, G6PD или KIF11.

[0035] В некоторых вариантах осуществления геном клетки содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления геном клетки содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

[0036] В некоторых вариантах осуществления геном клетки содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0037] В некоторых вариантах осуществления геном клетки не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0038] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0039] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления

сконструированная клетка содержит первую нокин-кассету и вторую нокин-кассету в первом аллеле существенного гена, где сконструированная клетка необязательно также содержит первую нокин-кассету и вторую нокин-кассету во втором аллеле существенного гена. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит первую нокин-кассету в первом аллеле существенного гена и вторую нокин-кассету во втором аллеле существенного гена. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0040] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью первого существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью второго существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях первого существенного гена и вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукты генов, кодируемые первым и вторым существенными генами, которые необходимы для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0041] В другом аспекте настоящее изобретение относится к любой из клеток, описанных в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата и/или для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, заболевания, нарушения или состояния, описанного в данном документе, например, рака, например, рака, описанного в данном документе.

[0042] В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке или популяции клеток, полученным любым из способов, описанных в данном документе, или их потомству.

[0043] В другом аспекте настоящее изобретение относится к системе для редактирования генома клетки (или клетки в популяции клеток), при этом система содержит клетку (или популяцию клеток), нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее).

[0044] В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции клеток в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют

собой клетки с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции клеток в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции клеток в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции клеток в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции клеток в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки.

[0045] В некоторых вариантах осуществления после приведения клетки или популяции клеток в контакт с нуклеазой и донорной матрицей, если нокин-кассета не интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, клетка больше не экспрессирует продукт гена, кодируемый существенным геном, или его функциональный вариант.

[0046] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0047] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена.

[0048] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше клеток, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение клетки (или популяции клеток) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых

вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0049] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0050] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме клетки, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме клетки.

[0051] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0052] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия

последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0053] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

[0054] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или с увеличением экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

[0055] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0056] В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой GAPDH, TBP, E2F4, G6PD или KIF11.

[0057] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0058] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции клеток в контакт с нуклеазой и донорной матрицей клетка с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0059] В некоторых вариантах осуществления система содержит первую донорную матрицу, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной

кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции клеток в контакт с нуклеазой и донорными матрицами клетка с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в первом аллеле существенного гена и вторую нокин-кассету во втором аллеле существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0060] В некоторых вариантах осуществления система содержит первую донорную матрицу, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью первого существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью второго существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции клеток в контакт с нуклеазой и донорными матрицами клетка с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях первого существенного гена и вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукты генов, кодируемые первым и вторым существенными генами, которые необходимы для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0061] В другом аспекте настоящее изобретение относится к донорной матрице, содержащей нокин-кассету с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки.

[0062] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица предназначена для применения при редактировании генома клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR).

[0063] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0064] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от сайта-мишени в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица

содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от сайта-мишени в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от сайта-мишени в геноме клетки, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от сайта-мишени в геноме клетки.

[0065] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0066] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0067] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

[0068] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или с увеличением экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

[0069] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0070] В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой GAPDH, TBP, E2F4, G6PD или KIF11.

[0071] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0072] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения популяции модифицированных клеток, при этом способ включает приведение клеток в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена во множестве клеток, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клеток, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном множества клеток посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого клеток с отредактированным геномом, которые экспрессируют: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации множества клеток, или их функциональный вариант, и где после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки, за счет чего обеспечивается получение популяции модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных клеток представляют собой клетки с

отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки.

[0073] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, клетка больше не экспрессирует продукт гена, кодируемый существенным геном, или его функциональный вариант.

[0074] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0075] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена.

[0076] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше клеток, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение клетки (или популяции клеток) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0077] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0078] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-

стороны от разрыва в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме клетки, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме клетки.

[0079] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0080] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0081] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

[0082] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или с увеличением экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

[0083] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность

существенного гена в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0084] В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой GAPDH, TBP, E2F4, G6PD или KIF11.

[0085] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0086] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления клетки с отредактированным геномом содержат нокин-кассеты в одном или обоих аллелях существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетки с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клеток, или их функциональный вариант.

[0087] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение клеток (или популяции клеток) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления клетки с отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в первом аллеле существенного гена и вторую нокин-кассету во втором аллеле существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетки с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клеток, или их функциональный вариант.

[0088] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение клеток (или популяции клеток) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью первого существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью второго существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления клетки с

отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях первого существенного гена и вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетки с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукты генов, кодируемые первым и вторым существенными генами, необходимые для выживания и/или пролиферации клеток, или их функциональный вариант.

[0089] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу отбора и/или идентификации клетки, включающему нокин представляющего интерес продукта гена в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, при этом способ включает приведение популяции клеток в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена во множестве клеток, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клеток, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном множества клеток посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, и идентификацию в популяции клеток клетки с отредактированным геномом, которая экспрессирует: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0090] В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных клеток в популяции клеток представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных клеток в популяции клеток

представляют собой клетки с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции клеток, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные клетки.

[0091] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, клетка больше не экспрессирует продукт гена, кодируемый существенным геном, или его функциональный вариант.

[0092] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0093] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена.

[0094] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше клеток, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение клетки (или популяции клеток) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0095] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0096] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-

стороны от разрыва в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме клетки, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме клетки.

[0097] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0098] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0099] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

[0100] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или с увеличением экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

[0101] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность

существенного гена в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0102] В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой GAPDH, TBP, E2F4, G6PD или KIF11.

[0103] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0104] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0105] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение популяции клеток в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления клетки с отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в первом аллеле существенного гена и вторую нокин-кассету во втором аллеле существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетки с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0106] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение популяции клеток в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью первого существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью второго существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления клетки с

отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях первого существенного гена и вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления клетка с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) продукты генов, кодируемые первым и вторым существенными генами, которые необходимы для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

[0107] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу редактирования генома индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC) (например, iPSC в популяции iPSC), при этом способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) в iPSC, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого iPSC с отредактированным геномом, которая экспрессирует: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0108] В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0109] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессируют GAPDH или его функциональный вариант.

[0110] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0111] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0112] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0113] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0114] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-

стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0115] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0116] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0117] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого геном GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0118] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0119] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один

сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0120] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0121] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0122] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0123] В другом аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированной iPSC, содержащей геном с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где по меньшей мере часть кодирующей последовательности гена GAPDH содержит экзогенную кодирующую последовательность.

[0124] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH содержит приблизительно 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH содержит приблизительно 200 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH.

[0125] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого геном GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент

содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0126] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, например, Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0127] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого геном GAPDH, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

[0128] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0129] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0130] В другом аспекте настоящее изобретение относится к сконструированной iPSC, содержащей геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в геноме iPSC, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей GAPDH или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где iPSC экспрессирует представляющий интерес продукт гена и GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена и GAPDH необязательно экспрессируются из эндогенного промотора GAPDH.

[0131] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, содержит приблизительно 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, содержит приблизительно 200 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH.

[0132] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0133] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, например, Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0134] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого геном GAPDH, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

[0135] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0136] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0137] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0138] В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0139] В другом аспекте настоящее изобретение относится к иммунной клетке (например, iNK-клетке или Т-клетке), дифференцированной из iPSC, описанной в данном документе.

[0140] В другом аспекте настоящее изобретение относится к любой из iPSC (или iNK- или Т-клеток, дифференцировавшихся из iPSC), описанных в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата и/или для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, заболевания, нарушения или состояния, описанного в данном документе, например, рака, например, рака, описанного в данном документе.

[0141] В другом аспекте настоящее изобретение относится к iPSC или популяции iPSC, полученным любым из способов, описанных в данном документе, или их потомству.

[0142] В другом аспекте настоящее изобретение относится к системе для редактирования генома iPSC (или iPSC в популяции iPSC), при этом система содержит iPSC (или популяцию iPSC), нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее).

[0143] В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной

матрицей по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0144] В некоторых вариантах осуществления после приведения iPSC или популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессирует GAPDH или его функциональный вариант.

[0145] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0146] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0147] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах

осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0148] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0149] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0150] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0151] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0152] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0153] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0154] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0155] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0156] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0157] В некоторых вариантах осуществления система содержит первую донорную матрицу, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорными матрицами iPSC с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0158] В другом аспекте настоящее изобретение относится к донорной матрице, содержащей нокин-кассету с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена

в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее).

[0159] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица предназначена для применения при редактировании генома iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR).

[0160] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0161] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC.

[0162] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0163] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0164] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-

концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH.

[0165] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0166] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0167] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0168] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения популяции модифицированных iPSC, при этом способ включает приведение iPSC в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH во множестве iPSC, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном множества iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого iPSC с отредактированным геномом, которые экспрессируют: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) GAPDH или их функциональный вариант, и где после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC, за счет чего обеспечивается получение популяции модифицированных iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC представляют

собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0169] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессирует GAPDH или его функциональный вариант.

[0170] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0171] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0172] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0173] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах

осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0174] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0175] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0176] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0177] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0178] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая

последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0179] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0180] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0181] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0182] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0183] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу отбора и/или идентификации iPSC, включающему нокин представляющего интерес продукта гена в пределах эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC, при этом способ включает приведение популяции iPSC в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH во множестве iPSC, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном множества iPSC

посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, и идентификацию в популяции iPSC iPSC с отредактированным геномом, которая экспрессирует: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0184] В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0185] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессирует GAPDH или его функциональный вариант.

[0186] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0187] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0188] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную

активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0189] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0190] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0191] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность,

кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0192] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0193] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0194] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0195] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0196] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0197] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0198] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение популяции iPSC в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0199] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу редактирования генома индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC) (например, iPSC в популяции iPSC), при этом способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) в iPSC, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого iPSC с отредактированным геномом, которая экспрессирует: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

[0200] В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения

в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0201] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессируют GAPDH или его функциональный вариант.

[0202] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0203] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0204] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0205] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0206] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0207] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0208] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0209] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого геном GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0210] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична

соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0211] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0212] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0213] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0214] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0215] В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или нескольких из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR +

(HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит биаллельные нокины (например, первый представляющий интерес продукт гена в первом аллеле гена GAPDH и второй представляющий интерес продукт гена во втором аллеле гена GAPDH) следующих пар представляющих интерес продуктов генов: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR.

[0216] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью второго существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях гена GAPDH и вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов, (b) GAPDH и (c) продукт гена, кодируемый вторым существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации iPSC, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой ген, представленный в таблице 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой TBP.

[0217] В другом аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированной iPSC, содержащей геном с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где по меньшей мере часть кодирующей последовательности гена GAPDH содержит экзогенную кодирующую последовательность, и где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

[0218] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH содержит приблизительно 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH содержит приблизительно 200 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH.

[0219] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH кодирует C-концевой фрагмент белка, кодируемого геном GAPDH. В некоторых вариантах

осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0220] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, например, Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0221] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого геном GAPDH, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

[0222] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0223] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0224] В другом аспекте настоящее изобретение относится к сконструированной iPSC, содержащей геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в геноме iPSC, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей GAPDH или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где iPSC экспрессирует представляющий интерес продукт гена и GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена и GAPDH необязательно экспрессируются из эндогенного промотора GAPDH, и где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный

антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

[0225] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, содержит приблизительно 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, содержит приблизительно 200 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH.

[0226] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0227] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, например, Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0228] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого геном GAPDH, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

[0229] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0230] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0231] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0232] В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0233] В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или нескольких из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR. В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит биаллельные нокины (например, первый представляющий интерес продукт гена в первом аллеле гена GAPDH и второй представляющий интерес продукт гена во втором аллеле гена GAPDH) следующих пар представляющих интерес продуктов генов: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR.

[0234] В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях гена GAPDH и вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов, (b) GAPDH и (c) продукт гена, кодируемый вторым существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации iPSC, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой ген, представленный в таблице 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой TBP.

[0235] В другом аспекте настоящее изобретение относится к иммунной клетке (например, iNK-клетке или Т-клетке), дифференцированной из iPSC, описанной в данном документе.

[0236] В другом аспекте настоящее изобретение относится к любой из iPSC (или iNK- или Т-клеток, дифференцировавшихся из iPSC), описанных в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата и/или для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, заболевания, нарушения или состояния, описанного в данном документе, например, рака, например, рака, описанного в данном документе.

[0237] В другом аспекте настоящее изобретение относится к iPSC или популяции iPSC, полученным любым из способов, описанных в данном документе, или их потомству.

[0238] В другом аспекте настоящее изобретение относится к системе для редактирования генома iPSC (или iPSC в популяции iPSC), при этом система содержит iPSC (или популяцию iPSC), нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

[0239] В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции iPSC, не имеющих

интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0240] В некоторых вариантах осуществления после приведения iPSC или популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессирует GAPDH или его функциональный вариант.

[0241] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0242] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0243] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0244] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0245] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0246] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0247] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0248] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0249] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-

мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0250] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0251] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0252] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0253] В некоторых вариантах осуществления система содержит первую донорную матрицу, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорными матрицами iPSC с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0254] В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей или матрицами iPSC содержат полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или более из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR. В некоторых вариантах осуществления iPSC содержат биаллельные нокины (например, первый

представляющий интерес продукт гена в первом аллеле гена GAPDH и второй представляющий интерес продукт гена во втором аллеле гена GAPDH) следующих пар представляющих интерес продуктов генов: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR.

[0255] В некоторых вариантах осуществления iPSC содержат первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях гена GAPDH и вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов, (b) GAPDH и (c) продукт гена, кодируемый вторым существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации iPSC, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой ген, представленный в таблице 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой TBP.

[0256] В другом аспекте настоящее изобретение относится к донорной матрице, содержащей нокин-кассету с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

[0257] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица предназначена для применения при редактировании генома iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR).

[0258] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0259] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC.

[0260] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и

регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0261] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0262] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует C-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления C-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления C-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления C-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH.

[0263] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0264] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0265] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0266] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения популяции модифицированных iPSC, при этом способ включает приведение iPSC в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH во множестве iPSC, и (ii)

донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном множества iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого iPSC с отредактированным геномом, которые экспрессируют: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них, и где после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC, за счет чего обеспечивается получение популяции модифицированных iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0267] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессирует GAPDH или его функциональный вариант.

[0268] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0269] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар

оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0270] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0271] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0272] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0273] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В

некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0274] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0275] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0276] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0277] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0278] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0279] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего

интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0280] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0281] В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или нескольких из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат биаллельные нокины (например, первый представляющий интерес продукт гена в первом аллеле гена GAPDH и второй представляющий интерес продукт гена во втором аллеле гена GAPDH) следующих пар представляющих интерес продуктов генов: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR.

[0282] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью второго существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях гена GAPDH и

вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов, (b) GAPDH и (c) продукт гена, кодируемый вторым существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации iPSC, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой ген, представленный в таблице 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой TBP.

[0283] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу отбора и/или идентификации iPSC, включающему нокин представляющего интерес продукта гена в пределах эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC, при этом способ включает приведение популяции iPSC в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH во множестве iPSC, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном множества iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, и идентификацию в популяции iPSC iPSC с отредактированным геномом, которая экспрессирует: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

[0284] В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой

жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0285] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессирует GAPDH или его функциональный вариант.

[0286] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0287] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0288] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0289] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0290] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-

стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0291] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0292] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0293] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0294] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0295] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0296] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0297] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0298] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение популяции iPSC в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0299] В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или нескольких из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат биаллельные нокины (например, первый представляющий интерес продукт гена в первом аллеле гена GAPDH и второй представляющий интерес продукт гена во втором аллеле гена GAPDH) следующих пар представляющих интерес продуктов генов: CD16 + IL15; IL15 + CD16; CD16 + CAR; CAR + CD16; IL15 + CAR; CAR + IL15; CD16 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CD16; IL15 + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E,

или HLA-G, или CD47) + IL15; CAR + (HLA-E, или HLA-G, или CD47); (HLA-E, или HLA-G, или CD47) + CAR.

[0300] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью второго существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в одном или обоих аллелях гена GAPDH и вторую нокин-кассету в одном или обоих аллелях второго существенного гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов, (b) GAPDH и (c) продукт гена, кодируемый вторым существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации iPSC, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой ген, представленный в таблице 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления второй существенный ген представляет собой TBP.

[0301] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу редактирования генома индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC) (например, iPSC в популяции iPSC), при этом способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) в iPSC, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого iPSC с отредактированным геномом, которая экспрессирует: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена представляет собой PD-L1 или поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47).

[0302] В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и

приблизительно 20% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0303] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессируют GAPDH или его функциональный вариант.

[0304] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0305] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0306] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах

осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0307] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0308] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0309] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0310] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0311] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого геном GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0312] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0313] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0314] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0315] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0316] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0317] В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или нескольких из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: PD-L1 + CD47 или CD47 + PD-L1. В

некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит биаллельные нокины (например, первый представляющий интерес продукт гена в первом аллеле гена GAPDH и второй представляющий интерес продукт гена во втором аллеле гена GAPDH) следующих пар представляющих интерес продуктов генов: PD-L1 + CD47.

[0318] В другом аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированной iPSC, содержащей геном с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где по меньшей мере часть кодирующей последовательности гена GAPDH содержит экзогенную кодирующую последовательность, и где представляющий интерес продукт гена представляет собой PD-L1 или поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47).

[0319] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH содержит приблизительно 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH содержит приблизительно 200 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH.

[0320] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого геном GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0321] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, например, Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность гена GAPDH содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0322] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого геном GAPDH, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

[0323] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия

последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0324] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0325] В другом аспекте настоящее изобретение относится к сконструированной iPSC, содержащей геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в геноме iPSC, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей GAPDH или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где iPSC экспрессирует представляющий интерес продукт гена и GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена и GAPDH необязательно экспрессируются из эндогенного промотора GAPDH, и где представляющий интерес продукт гена представляет собой PD-L1 или поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47).

[0326] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, содержит приблизительно 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, содержит приблизительно 200 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH.

[0327] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0328] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, например, Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность, кодирующая GAPDH, содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0329] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого геном GAPDH, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов

генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

[0330] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0331] В некоторых вариантах осуществления геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0332] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0333] В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0334] В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или нескольких из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: PD-L1 + CD47; CD47 + PD-L1. В некоторых вариантах осуществления сконструированная iPSC содержит биаллельные нокины (например, первый представляющий интерес продукт гена в первом аллеле гена GAPDH и второй представляющий интерес продукт гена во втором аллеле гена GAPDH) PD-L1 + CD47.

[0335] В другом аспекте настоящее изобретение относится к иммунной клетке (например, iNK-клетке или T-клетке), дифференцированной из iPSC, описанной в данном документе.

[0336] В другом аспекте настоящее изобретение относится к любой из iPSC (или iNK- или T-клеток, дифференцировавшихся из iPSC), описанных в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата и/или для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, заболевания, нарушения или состояния, описанного в данном документе, например, рака, например, рака, описанного в данном документе.

[0337] В другом аспекте настоящее изобретение относится к iPSC или популяции iPSC, полученным любым из способов, описанных в данном документе, или их потомству.

[0338] В другом аспекте настоящее изобретение относится к системе для редактирования генома iPSC (или iPSC в популяции iPSC), при этом система содержит iPSC (или популяцию iPSC), нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где представляющий интерес продукт гена представляет собой PD-L1 или поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47).

[0339] В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0340] В некоторых вариантах осуществления после приведения iPSC или популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессирует GAPDH или его функциональный вариант.

[0341] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0342] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0343] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0344] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0345] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-

плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0346] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0347] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0348] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0349] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0350] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один

сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0351] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0352] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0353] В некоторых вариантах осуществления система содержит первую донорную матрицу, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и вторую донорную матрицу, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорными матрицами iPSC с отредактированным геномом содержит первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0354] В некоторых вариантах осуществления после приведения популяции iPSC в контакт с нуклеазой и донорной матрицей или матрицами iPSC содержат полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или более из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: PD-L1 + CD47; CD47 + PD-L1.

[0355] В другом аспекте настоящее изобретение относится к донорной матрице, содержащей нокин-кассету с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где представляющий интерес продукт гена представляет собой PD-L1 или поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47).

[0356] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица предназначена для применения при редактировании генома iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR).

[0357] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0358] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от сайта-мишени в геноме iPSC.

[0359] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0360] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0361] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH.

[0362] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична

соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0363] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0364] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0365] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения популяции модифицированных iPSC, при этом способ включает приведение iPSC в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH во множестве iPSC, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном множества iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого iPSC с отредактированным геномом, которые экспрессируют: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена представляет собой PD-L1 или поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47), и где после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC, за счет чего обеспечивается получение популяции модифицированных iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно

90% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0366] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессирует GAPDH или его функциональный вариант.

[0367] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0368] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0369] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0370] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0371] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0372] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0373] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0374] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует C-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления C-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления C-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления C-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0375] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-

мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0376] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0377] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0378] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0379] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0380] В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или нескольких из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: PD-L1 + CD47; CD47 + PD-L1.

[0381] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу отбора и/или идентификации iPSC, включающему нокин представляющего интерес продукта гена в пределах эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC, при этом способ включает приведение популяции iPSC в контакт с: (i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH во множестве iPSC, и (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с

экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном множества iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, и идентификацию в популяции iPSC iPSC с отредактированным геномом, которая экспрессирует: (a) представляющий интерес продукт гена и (b) GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена представляет собой PD-L1 или поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47).

[0382] В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и/или приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 10% или меньше или приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 80% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 20% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 60% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 40% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 90% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 10% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC. В некоторых вариантах осуществления после стадии приведения в контакт по меньшей мере приблизительно 95% жизнеспособных iPSC в популяции iPSC представляют собой iPSC с отредактированным геномом, и приблизительно 5% или меньше популяции iPSC, не имеющих интегрированной нокин-кассеты, представляют собой жизнеспособные iPSC.

[0383] В некоторых вариантах осуществления, если нокин-кассета не интегрируется в геном iPSC посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, iPSC больше не экспрессирует GAPDH или его функциональный вариант.

[0384] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

[0385] В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 2000, 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0386] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза является высокоэффективной, например, способна редактировать по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере

приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше iPSC, приводимых в контакт с нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение iPSC (или популяции iPSC) в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 или Cas12a или их вариант (например, нуклеазу, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 58-66). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, комплементарную части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит последовательность нацеливающего домена, которая отличается не более чем 3 нуклеотидами от последовательности, комплементарной части эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула специфично связывается с частью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула не связывается с эндогенной кодирующей последовательностью другого гена, например, другого существенного гена. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 94-157 и 225-1885.

[0387] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

[0388] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 5'-стороны от разрыва в геноме iPSC, и донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность, гомологичную последовательности, расположенной с 3'-стороны от разрыва в геноме iPSC.

[0389] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A представляет собой элемент T2A (например, EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (например, ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A

(например, QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (например, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0390] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, и в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0391] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент GAPDH. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент имеет длину менее чем приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH, охватывающей разрыв.

[0392] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC. В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для нуклеазы, с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC или с увеличением экспрессии GAPDH и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

[0393] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas (например, Cas9 или Cas12a), экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете содержит по меньшей мере один сайт PAM для Cas, и по меньшей мере один сайт PAM (или все сайты PAM) был оптимизирован по кодонам или насыщен молчащими и/или миссенс-мутациями.

[0394] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0395] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой полицистронную (например, бицистронную) нокин-кассету, содержащую экзогенные кодирующие последовательности для двух или более представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена, линкер (например, T2A, P2A и/или IRES) и вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержит нокин-кассеты в одном или обоих аллелях гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессирует (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0396] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение популяции iPSC в контакт с первой донорной матрицей, которая содержит первую нокин-кассету, содержащую первую экзогенную кодирующую последовательность для первого представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и со второй донорной матрицей, которая содержит вторую нокин-кассету, содержащую вторую экзогенную кодирующую последовательность для второго представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат первую нокин-кассету в первом аллеле гена GAPDH и вторую нокин-кассету во втором аллеле гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом экспрессируют (a) первый и второй представляющие интерес продукты генов и (b) GAPDH или их функциональный вариант.

[0397] В некоторых вариантах осуществления iPSC с отредактированным геномом содержат полицистронные нокины (например, в одном или обоих аллелях гена GAPDH) двух или более представляющих интерес продуктов генов, например, одного или нескольких из следующих представляющих интерес продуктов генов, в следующем порядке: PD-L1 + CD47; CD47 + PD-L1.

[0398] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения генетически модифицированной клетки млекопитающего, содержащей кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в заранее определенном геномном положении, включающему: получение по меньшей мере одной донорной матрицы, содержащей кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена, фланкированную первым плечом гомологии и вторым плечом гомологии, где первое и второе плечи гомологии по существу гомологичны первой геномной области (GR) и второй GR соответственно, где первая GR и вторая GR прилегают к заранее определенному геномному положению в экзоне существенного гена в клетке млекопитающего и фланкируют его, где клетка становится нежизнеспособной, если экзон разрушается; получение системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение; введение по меньшей мере одной донорной матрицы и системы редактирования генов в популяцию клеток млекопитающих; культивирование популяции клеток млекопитающих и идентификацию выжившей клетки, которая содержит кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена, где идентифицированная выжившая клетка представляет собой генетически модифицированную клетку млекопитающего, содержащую кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в заранее определенном геномном положении. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу отбора клетки млекопитающего, содержащей кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена, которая интегрировалась точно в заранее определенное геномное положение, включающему: получение по меньшей мере одной донорной матрицы, содержащей кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена, фланкированную первым плечом гомологии и вторым плечом гомологии, где первое и второе плечи гомологии по существу гомологичны первой геномной области (GR) и второй GR соответственно, где первая GR и вторая GR прилегают к заранее определенному геномному положению в экзоне существенного гена в клетке млекопитающего и фланкируют его, где клетка становится нежизнеспособной, если экзон разрушается; получение системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение; введение донорной матрицы и

системы редактирования генов в популяцию клеток млекопитающих; культивирование популяции клеток млекопитающих и идентификацию выжившей клетки, которая содержит кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена, где идентифицированная выжившая клетка содержит кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена, интегрированную точно в заранее определенное геномное положение.

[0399] В некоторых вариантах осуществления экзон является последним или предпоследним экзоном существенного гена, если существенный ген имеет более одного экзона. В некоторых вариантах осуществления заранее определенное геномное положение в экзоне существенного гена находится в пределах приблизительно 200 п. о. выше стоп-кодона или в пределах приблизительно 200 п. о. ниже стартового кодона существенного гена.

[0400] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов представляет собой систему на основе мегануклеазы, систему на основе нуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZFN), систему на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), систему на основе CRISPR или систему на основе NgAgo.

[0401] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов представляет собой систему на основе CRISPR, содержащую нуклеазу или мРНК или ДНК, кодирующую нуклеазу, и направляющую РНК (gRNA), нацеленную на заранее определенное геномное положение, где система редактирования генов необязательно представляет собой рибонуклеопротеиновый (RNP) комплекс, содержащий нуклеазу и gRNA.

[0402] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Cas5, Cas6, Cas7, Cas9 (необязательно saCas9 или spCas9), Cas12a или Csm1.

[0403] В некоторых вариантах осуществления существенный ген выбран из локусов генов, представленных в таблице 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой ген GAPDH, RPL13A, RPL7 или RPLP0.

[0404] В некоторых вариантах осуществления первое плечо гомологии и/или второе плечо гомологии содержат молчащую мутацию, блокирующую PAM, или модификацию кодона, которая предотвращает расщепление донорной матрицы нуклеазой, так что локус существенного гена после модификации не расщепляется нуклеазой.

[0405] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность для представляющего интерес продукта гена связана в рамке считывания с последовательностью существенного гена через кодирующую последовательность для саморасщепляющегося пептида, или кодирующая последовательность для представляющего интерес продукта гена содержит участок внутренней посадки рибосомы (IRES) на 5'-конце.

[0406] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена представляет собой терапевтический белок (необязательно антитело, сконструированный антигенный рецептор или его антигенсвязывающий фрагмент), иммуномодулирующий белок, репортерный белок или сигнал переключателя безопасности.

[0407] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение популяции клеток млекопитающих в контакт с ингибитором негомологичного соединения концов.

[0408] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток млекопитающих представляет собой клетки человека. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток млекопитающих представляют собой плюрипотентные стволовые клетки (PSC). В некоторых вариантах осуществления PSC представляют собой эмбриональные стволовые клетки или индуцированные PSC (iPSC).

[0409] В некоторых вариантах осуществления способ включает получение более чем одной донорной матрицы. В некоторых вариантах осуществления каждая донорная матрица нацелена на существенный ген. В некоторых вариантах осуществления каждая донорная матрица содержит отдельную геномную последовательность. В некоторых вариантах осуществления каждая донорная матрица содержит кодирующую последовательность для более чем одного представляющего интерес продукта гена.

[0410] В некоторых вариантах осуществления геномные последовательности из одной донорной матрицы включаются в состав одного аллеля существенного гена, а геномные последовательности из другой донорной матрицы включаются в состав другого аллеля существенного гена. В некоторых вариантах осуществления каждая донорная матрица содержит кодирующую последовательность для более чем одного представляющего интерес продукта гена.

[0411] В некоторых вариантах осуществления каждая донорная матрица содержит по меньшей мере один переключатель безопасности. В некоторых вариантах осуществления каждая донорная матрица содержит по меньшей мере один компонент переключателя безопасности. В некоторых вариантах осуществления требуется димеризация переключателя безопасности для его функционирования в качестве "суицидального" переключателя.

[0412] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает дополнительные стадии предоставления выжившим клеткам системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение; необязательно повторного введения по меньшей мере одной донорной матрицы для получения второй популяции клеток млекопитающих; культивирования второй популяции клеток млекопитающих и идентификации выжившей клетки из второй популяции клеток млекопитающих, которая содержит кодирующие последовательности для представляющих интерес продуктов генов из донорных матриц; где идентифицированная выжившая клетка из второй популяции клеток млекопитающих представляет собой генетически модифицированную клетку млекопитающего, содержащую кодирующие последовательности для представляющих интерес продуктов генов из донорных матриц в заранее определенном геномном положении.

[0413] В некоторых вариантах осуществления процентная доля выживших клеток после второй стадии культивирования, содержащих кодирующие последовательности для представляющих интерес продуктов генов, обогащена в по меньшей мере четыре раза относительно выживших клеток после первой стадии культивирования, содержащих кодирующие последовательности для представляющих интерес продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления процентная доля выживших клеток после второй стадии культивирования, содержащих кодирующие последовательности для представляющих интерес продуктов генов из донорных матриц, составляет по меньшей мере 2%.

[0414] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает отделение клетки млекопитающего, содержащей кодирующие последовательности для представляющих интерес продуктов генов из донорных матриц. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выращивание клетки млекопитающего, содержащей кодирующие последовательности для представляющих

интерес продуктов генов из донорных матриц, до множества клеток, содержащих кодирующие последовательности для представляющих интерес продуктов генов из донорных матриц.

[0415] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток млекопитающих представляет собой PSC. В некоторых вариантах осуществления PSC представляют собой эмбриональные стволовые клетки или iPSC.

[0416] В другом аспекте настоящее изобретение относится к генетически сконструированной клетке, которую можно получить любым из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированная клетка представляет собой PSC. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированная клетка представляет собой iPSC.

[0417] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения дифференцированной клетки, включающему культивирование генетически сконструированной iPSC, которую можно получить любым из способов, описанных в данном документе, в культуральной среде, которая обеспечивает возможность дифференцировки iPSC в дифференцированную клетку или генетически модифицированную дифференцированную клетку, полученную таким способом. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка представляет собой иммунную клетку, необязательно выбранную из Т-клетки, Т-клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), супрессивной Т-клетки, миелоидной клетки, дендритной клетки и иммуносупрессивного макрофага; клетку нервной системы, необязательно выбранную из дофаминергического нейрона, микроглиальной клетки, олигодендроцита, астроцита, кортикального нейрона, спинномозгового нейрона или нейрона глазодвигательного нерва, энтерального нейрона, клетки, происходящей из плакоды, шванновской клетки и нейрона тройничного нерва или чувствительного нейрона; клетку глазной системы, необязательно выбранную из клетки пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторной колбочковой клетки, фоторецепторной палочковой клетки, биполярной клетки и ганглиозной клетки; клетку сердечно-сосудистой системы, необязательно выбранную из кардиомиоцита, эндотелиальной клетки и клетки лимфатического узла; или клетку метаболической системы, необязательно выбранную из гепатоцита, холангиоцита и бета-клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка представляет собой клетку человека.

[0418] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей любую из описанных в данном документе клеток. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения нуждающегося в этом пациента-человека, включающему введение пациенту фармацевтической композиции, где фармацевтическая композиция содержит дифференцированные клетки человека. В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения при лечении нуждающегося в этом пациента-человека, где фармацевтическая композиция содержит дифференцированные клетки человека. В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции для изготовления лекарственного препарата для лечения нуждающегося в этом пациента-человека, где фармацевтическая композиция содержит дифференцированные клетки человека. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки человека представляют собой аутологичные или аллогенные клетки.

[0419] В другом аспекте настоящее изобретение относится к системе редактирования генома клетки млекопитающего, при этом система содержит популяцию клеток млекопитающих, нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке

млекопитающего, и множество донорных матриц, каждая из которых содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где после приведения популяции клеток млекопитающих в контакт с нуклеазой и донорными матрицами и необязательно приведения популяции клеток млекопитающих в контакт с нуклеазой и необязательно с донорными матрицами во второй раз по меньшей мере приблизительно 2% жизнеспособных клеток в популяции клеток млекопитающих представляют собой клетки с отредактированным геномом, которые экспрессируют представляющие интерес продукты генов из множества донорных матриц. В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой GAPDH.

[0420] В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой PSC. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой iPSC.

[0421] В некоторых вариантах осуществления разрыв представляет собой двухнитевой разрыв. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 1000, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности гена GAPDH. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

[0422] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и система дополнительно содержит направляющую молекулу для нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу.

[0423] В некоторых вариантах осуществления донорные матрицы представляют собой донорные ДНК-матрицы, где донорные ДНК-матрицы необязательно являются двухнитевыми. В некоторых вариантах осуществления донорные матрицы содержат плечи гомологии по обе стороны от экзогенных кодирующих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии соответствуют последовательностям, расположенным по обе стороны от разрыва в геноме клетки млекопитающего.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0424] Идеи, описанные в данном документе, будут более понятны из следующего описания различных иллюстративных вариантов осуществления, если их читать вместе с прилагаемыми графическими материалами. Следует понимать, что графические материалы, описанные ниже, предназначены только для иллюстративных целей и никоим образом не предназначены для ограничения объема идей настоящего изобретения.

[0425] На фиг. 1 показаны местоположения в гене *GAPDH*, где связываются иллюстративные направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), и результаты скрининга иллюстративных направляющих РНК, нацеленных на ген *GAPDH*, через три дня после трансфекции. Результаты получены для gDNA живых клеток.

[0426] На фиг. 2 показаны результаты скрининга иллюстративных направляющих РНК AsCpf1 (AsCas12a), нацеленных на ген *GAPDH*, через три дня после трансфекции. Результаты получены для gDNA живых клеток.

[0427] На фиг. 3A показана иллюстративная стратегия интеграции, нацеленная на существенный ген, в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения. В конкретных вариантах осуществления введение двухнитевого разрыва посредством редактирования гена с помощью CRISPR (например, с помощью Cas12a или Cas9) в пределах концевого экзона (например, в пределах приблизительно 500 п. о. выше (с 5'-стороны от) стоп-кодона существенного гена) и введение донорной плазмиды с плечами гомологии, предназначенной для опосредования направляемой гомологией репарации (HDR) в сайте расщепления, приводит к получению популяции жизнеспособных клеток, несущих представляющий интерес груз, интегрированный в локус существенного гена. Те клетки, в которых произошло редактирование посредством нуклеазы CRISPR, но было безуспешным осуществление интеграции груза в локус существенного гена, не выживают.

[0428] На фиг. 3B показана иллюстративная стратегия интеграции, нацеленная на ген *GAPDH*, в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения. Хотя на фиг. 3B показана стратегия, где ген *GAPDH* модифицируется в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке (iPSC), эта стратегия может быть применена к различным типам клеток, включая первичные клетки, стволовые клетки и клетки, дифференцированные из iPSC.

[0429] На фиг. 3C показана иллюстративная стратегия интеграции, нацеленная на ген *GAPDH*, в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения. На схеме показано, что единственными клетками, которые должны выжить с течением времени, являются те клетки, которые подверглись целенаправленной интеграции кассеты, восстанавливающей локус *GAPDH* и содержащей представляющий интерес груз, а также не подвергнутые редактированию клетки. Популяция не подвергнутых редактированию клеток после редактирования с помощью CRISPR должна быть небольшой, если нуклеаза и направляющая РНК являются высокоэффективными при расщеплении сайта-мишени в существенном гене и вводят вставки/делеции, которые приводят к значительному снижению функции продукта существенного гена.

[0430] На фиг. 3D показана иллюстративная стратегия интеграции, нацеленная на существенный ген, в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения. В конкретных вариантах осуществления введение двухнитевого разрыва посредством редактирования гена с помощью CRISPR (например, с помощью Cas12a или Cas9) для нацеливания на 5'-концевой экзон (например, в пределах приблизительно 500 п. о. ниже (с 3'-стороны от) стартового кодона существенного гена) и введение донорной плазмиды с плечами гомологии, предназначенной для опосредования направляемой гомологией репарации (HDR) в сайте расщепления, приводит к получению популяции жизнеспособных клеток, несущих представляющий интерес груз, интегрированный в локус существенного гена. Те клетки, в которых произошло редактирование посредством нуклеазы CRISPR, но было безуспешным осуществление интеграции груза в локус существенного гена, не выживают.

[0431] На фиг. 4 показана эффективность редактирования при различных концентрациях (от 0,625 мкМ до 4 мкМ) иллюстративной направляющей РНК AsCpf1 (AsCas12a), которая нацелена на ген *GAPDH*.

[0432] На фиг. 5 показана эффективность нокина (KI) у "груза", кодирующего CD47, в гене *GAPDH* через 4 дня после электропорации, когда также присутствовала dsDNA-плазмида ("PLA"). Эффективность нокина измеряли с двумя различными концентрациями плазмиды. Нокин измеряли с помощью ddPCR, нацеленной на 3'-концевые положения "груза", используемого для нокина.

[0433] На фиг. 6 показана эффективность нокина у "груза", кодирующего CD47, в гене *GAPDH* через 9 дней после электропорации, когда также присутствовала dsDNA-плазмида. Нокин измеряли с использованием ddPCR, нацеленной как на 5'-, так и на 3'-концевые положения "груза", используемого для нокина, что повышало надежность результата.

[0434] На фиг. 7 картированы направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), нацеленные на концевые экзоны гена *RPLP0*.

[0435] На фиг. 8 картированы направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), нацеленные на концевые экзоны гена *RPLP0*.

[0436] На фиг. 9 картированы направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), нацеленные на концевые экзоны гена *RPL13A*.

[0437] На фиг. 10 картированы направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), нацеленные на концевые экзоны гена *RPL13A*.

[0438] На фиг. 11 картированы направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), нацеленные на концевые экзоны гена *RPL7*.

[0439] На фиг. 12 картированы направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), нацеленные на концевые экзоны гена *RPL7*.

[0440] На фиг. 13 показана эффективность интеграции нокин-кассеты, содержащей последовательность "груза", кодирующую белок GFP, в локус GAPDH в iPSC, измеренная через 7 дней после трансфекции. На **(A)** изображены иллюстративные полученные при помощи микроскопии (светлопольной и флуоресцентной) изображения, а на **(B)** изображены иллюстративные данные проточной цитометрии. Изображения и данные проточной цитометрии показывают значения скорости вставки для трансфекции грузом в отдельности (PLA1593 или PLA1651) по сравнению с трансфекцией грузом и направляющей РНК (RSQ22337 + PLA1593 или RSQ24570 + PLA1651), кроме того, значения скорости вставки при использовании иллюстративной нацеленной на экзонные кодирующие области направляющей РНК с соответствующим грузом (RSQ22337 + PLA1593) сравнивают со значениями скорости вставки при использовании нацеленной на интроны направляющей РНК с соответствующим грузом (RSQ24570 + PLA1651).

[0441] На фиг. 14A изображено схематическое представление бицистронной нокин-кассеты (например, содержащей два цистрона, разделенных линкером) для вставки в локус GAPDH, при этом лидерная кодирующая область экзона 9 GAPDH и экзогенные последовательности, кодирующие представляющие интерес белки, разделены линкерными последовательностями, и второй аллель GAPDH может содержать целевую вставку нокин-кассеты, вставки/делеции или может быть дикого типа (WT).

[0442] На фиг. 14B изображено схематическое представление биаллельных нокин-кассет для вставки в локус GAPDH. Экзогенные последовательности "грузов", кодирующие представляющие интерес белки, расположены в разных нокин-кассетах, и в каждой конструкции лидерная кодирующая область экзона 9 GAPDH отделена от экзогенной последовательности, кодирующей представляющий интерес белок, линкерной последовательностью.

[0443] На фиг. 15A изображено схематическое представление бицистронной нокин-кассеты для вставки в локус GAPDH, при этом лидерная кодирующая область экзона 9 GAPDH и экзогенные

последовательности, кодирующие GFP и mCherry, разделены линкерными последовательностями P2A, T2A и/или IRES.

[0444] Фиг. 15B представляет собой панель иллюстративных полученных при помощи микроскопии (светлопольной и флуоресцентной) изображений iPSC через девять дней после нуклеофекции RNP, содержащих RSQ22337 (SEQ ID NO: 95), нацеленную на GAPDH, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), и бицистронной нокин-кассеты, содержащей последовательность "груза", кодирующую молекулы GFP и mCherry, вставленной в локус GAPDH. Показаны iPSC, содержащие иллюстративные молекулы-"грузы" PLA1582 (содержащую донорную матрицу под SEQ ID NO: 41) с линкерами P2A и T2A, PLA1583 (содержащую донорную матрицу под SEQ ID NO: 42) с линкерами T2A и P2A и PLA1584 (содержащую донорную матрицу SEQ ID NO: 43) с линкерами T2A и IRES. Результаты показывают, что по меньшей мере два разных груза могут быть подвергнуты вставке бицистронным способом, и экспрессия может быть выявлена независимо от используемого типа линкера. Все изображения были получены с увеличением 2×100 мкм на микроскопе Keyence.

[0445] На фиг. 15C показана количественная оценка экспрессии (ось Y) иллюстративных молекул-"грузов" GFP и mCherry из различных бицистронных молекул, содержащих описанные пары линкеров (ось X). mCherry в качестве единственного белка-"груза" использовали в качестве относительного контроля.

[0446] На фиг. 16A изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для биаллельного нокина GFP и mCherry в гене *GAPDH*.

[0447] На фиг. 16B изображена флуоресцентная визуализация популяций клеток перед анализом с помощью проточной цитометрии после биаллельного нокина GFP и mCherry в гене *GAPDH*.

[0448] Фиг. 16C представляет собой гистограммы, на которых изображены иллюстративные данные анализа с помощью проточной цитометрии для биаллельного нокина GFP и mCherry в гене *GAPDH*. Клетки подвергали нуклеофекции посредством 0,5 мкМ RNP, содержащих Cas12a (SEQ ID NO: 62), и RSQ22337 (SEQ ID NO: 95), и 2,5 мкг (5 испытаний) или 5 мкг (1 испытание) донорных матриц с GFP и mCherry.

[0449] На фиг. 17A изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для экспрессии GFP в iPSC через семь дней после трансфекции с использованием gRNA и соответствующей донорной матрицы, содержащей нокин-кассету с последовательностью "груза", кодирующей GFP, которая была встроена путем рекомбинации в различные локусы.

[0450] На фиг. 17B изображена процентная доля клеток, имеющих события редактирования, согласно измерению с помощью анализов методом выведения редактирований CRISPR (ICE) через 48 часов после трансфекции с использованием указанной gRNA.

[0451] На фиг. 17C изображена относительная интенсивность экспрессии интегрированного "груза" (GFP), определенная с помощью проточной цитометрии, проводимой с каналом FITC для фильтрации сигнала GFP, для iPSC, трансфицированных с использованием указанных комбинаций иллюстративных gRNA и нокин-кассет.

[0452] На фиг. 18 изображены иллюстративные данные проточной цитометрии, подчеркивающие эффективность интеграции донорной матрицы, содержащей нокин-кассету, содержащую последовательность "груза", кодирующую белок GFP, в локус *TBP* в iPSC.

[0453] На фиг. 19 представлены иллюстративные результаты ddPCR, описывающие показатели интеграции нокин-кассет в аллели *GAPDH* или *TBP* в популяции iPSC.

[0454] Фиг. 20 представляет собой гистограмму, на которой представлены иллюстративные данные проточной цитометрии в отношении AAV6-опосредованного нокина GFP в Т-клетках с использованием RNP, содержащих RSQ22337, нацеленную на GAPDH, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), при различных концентрациях RNP и различных показателях множественности заражения (MOI) AAV6 (vg/клетка) при измерении через семь дней после электропорации и трансдукции. По оси Y представлена процентная доля популяции клеток, экспрессирующая GFP, тогда как по оси X изображена MOI AAV6.

[0455] Фиг. 21 представляет собой гистограмму, на которой представлены иллюстративные данные проточной цитометрии, отображающие жизнеспособность клеток после AAV6-опосредованного нокина GFP в гене *GAPDH* в дифференцированных клетках. Показана жизнеспособность Т-клеток через четыре дня после AAV6-опосредованной трансдукции груза GFP и электропорации с использованием 1 мкМ RNP, содержащих RSQ22337 и Cas12a (SEQ ID NO: 62); по оси Y указана жизнеспособность клеток в зависимости от общей популяции клеток, а по оси X представлены различные MOI, используемые для трансдукции клеток.

[0456] На фиг. 22A изображены иллюстративные графики проточной цитометрии для популяции Т-клеток, трансдуцированных с использованием AAV6, содержащего используемый для нокина груз GFP, нацеленный на GAPDH, при 5E4 MOI и трансформированных с использованием 4 мкМ RNP, содержащего Cas12a (SEQ NO: 62) и RSQ22337.

[0457] На фиг. 22B изображены иллюстративные графики проточной цитометрии в контрольном эксперименте для Т-клеток, которые не были трансдуцированы с использованием AAV6, а были только трансформированы с использованием 4 мкМ RNP, содержащего Cas12a (SEQ NO: 62) и RSQ22337.

[0458] Фиг. 23 представляет собой гистограммы, на которых изображены иллюстративные данные проточной цитометрии в отношении AAV6-опосредованного нокина GFP в Т-клетках в локусе GAPDH с использованием RNP, содержащих RSQ22337 и Cas12a (SEQ ID NO: 62), либо в локусе TRAC. Каждая из интеграционных конструкций содержала плечи гомологии длиной примерно 500 п. о., и Т-клетки трансдуцировали при одинаковой концентрации RNP и MOI AAV. Показаны среднее значение и стандартное отклонение для трех независимых биологических повторностей, наблюдались значимые различия в целенаправленной интеграции ($p = 0,0022$ с использованием непарного t-критерия).

[0459] Фиг. 24A представляет собой гистограмму, на которой изображена эффективность нокина у "груза", кодирующего CD16, интегрированного в ген *GAPDH* в iPSC. Целенаправленную интеграцию (TI) измеряли в день 0 и день 19 у подвергнутых массовому редактированию популяций клеток с использованием ddPCR, нацеленной на 5'-концевые (5'-анализ) и 3'-концевые (3'-анализ) положения груза, используемого для нокина.

[0460] Фиг. 24B представляет собой гистограмму, на которой изображены генотипы клонов iPSC с "грузом", кодирующим CD16, интегрированным в ген *GAPDH*, при измерении с помощью ddPCR, нацеленной на 5'-концевые (5'-CDN-зонд) и 3'-концевые (3'-поли(A)-зонд) положения груза, используемого для нокина. Показаны результаты для четырех иллюстративных линий клеток: две линии были классифицированы как гомозиготные по нокину с показателями целенаправленной интеграции (TI) 88,5%

(клон 1) и 90,5% (клон 2) соответственно, и две линии были классифицированы как гетерозиготные по нокину с показателями TI 45,6% (клон 1) и 46,5% (клон 2) соответственно.

[0461] На фиг. 25A изображены иллюстративные данные проточной цитометрии от дня 32 дифференцировки гомозиготного клона 1 iPSC с нокином CD16 в iNK. Данные подчеркивают эффективность интеграции и высокий уровень экспрессии (например, примерно 98%) нокин-кассеты, содержащей последовательность "груза", кодирующую белок CD16, в гене *GAPDH* в iPSC. Кроме того, данные показывают, что нокин "груза" в гене *GADPH* не ингибирует процесс дифференцировки, о чем свидетельствуют высокие доли CD56+ CD45+ в популяции.

[0462] На фиг. 25B изображены иллюстративные данные проточной цитометрии от дня 32 дифференцировки гомозиготного клона 2 iPSC с нокином CD16 в iNK. Данные подчеркивают эффективность интеграции и экспрессии нокин-кассеты, содержащей последовательность "груза", кодирующую белок CD16, в гене *GAPDH* в iPSC.

[0463] На фиг. 25C изображены иллюстративные данные проточной цитометрии от дня 32 дифференцировки гетерозиготного клона 1 iPSC с нокином CD16 в iNK. Данные подчеркивают эффективность интеграции и высокий уровень экспрессии (например, примерно 97,8%) нокин-кассеты, содержащей последовательность "груза", кодирующую белок CD16, в гене *GAPDH* в iPSC.

[0464] На фиг. 25D изображены иллюстративные данные проточной цитометрии от дня 32 дифференцировки гетерозиготного клона 2 iPSC с нокином CD16 в iNK. Данные подчеркивают эффективность интеграции и экспрессии нокин-кассеты, содержащей последовательность "груза", кодирующую белок CD16, в гене *GAPDH* в iPSC.

[0465] Фиг. 26 представляет собой схематическое представление иллюстративного анализа уничтожения клеток солидной опухоли, в котором изображено применение подвергнутых нокину iPSC, дифференцировавшихся в iNK-клетки, для уничтожения 3D-сфероидов, образовавшихся из линии раковых клеток (например, раковых клеток яичника SK-OV-3). Антитела и/или цитокины могут быть необязательно добавлены в ходе стадии уничтожения 3D-сфероидов.

[0466] На фиг. 27A показаны результаты анализа уничтожения солидных опухолей, описанного на фиг. 26. Гомозиготные клоны, содержащие нокин CD16 в гене *GAPDH*, подвергали дифференцировке в iNK-клетки, и они функционировали для уменьшения размера сфероидов из опухолевых клеток, особенно после добавления антитела, например, 10 мкг/мл трастузумаба; добавление антитела способствует антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и уничтожению опухолевых клеток с помощью iNK. Контрольные клетки "PCS WT" представляли собой не подвергнутые массовому редактированию исходные клоны, которые подвергали электропорации без RNP или плазмид и которые находились на той же стадии дифференцировки iNK-клеток, что и тестируемые клетки. По оси Y изображена нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов — косвенный показатель обилия опухолевых клеток, тогда как по оси X изображено соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T).

[0467] На фиг. 27B показаны результаты анализа уничтожения солидных опухолей, описанного на фиг. 26. Гетерозиготные клоны, содержащие нокин CD16 в гене *GAPDH*, подвергали дифференцировке в iNK-клетки, и они функционировали для уменьшения размера сфероидов из опухолевых клеток, особенно после добавления антитела, например, 10 мкг/мл трастузумаба; добавление антитела способствует ADCC и уничтожению опухолевых клеток с помощью iNK. Контрольные клетки "PCS WT" представляли собой не

подвергнутые массовому редактированию исходные клоны, которые подвергали электропорации без RNP или плазмид и которые находились на той же стадии дифференцировки iNK-клеток, что и тестируемые клетки. По оси Y изображена нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов — косвенный показатель обилия опухолевых клеток, тогда как по оси X изображено соотношение E:T.

[0468] На фиг. 28 показаны результаты анализа серийного уничтожения *in vitro*, где гомозиготные или гетерозиготные клоны, содержащие нокин CD16 в гене *GAPDH*, подвергали дифференцировке в iNK-клетки и подвергали серийной стимуляции гематологическими раковыми клетками (например, клетками Raji) с добавлением или без добавления антитела — 0,1 мкг/мл ритуксимаба. По оси X представлено время (0-598 часов) с добавлением дополнительной болюсной дозы опухолевых клеток (5000 клеток) примерно каждые 48 часов, по оси Y представлена эффективность уничтожения, измеренная по нормализованной общей площади красных объектов (например, присутствию опухолевых клеток). Звездочка (*) обозначает начало добавления 0,1 мкг/мл ритуксимаба в испытаниях, в которых ритуксимаб ранее отсутствовал. Данные показывают, что подвергнутые редактированию iNK-клетки (нокин CD16 в гене *GAPDH*; клоны "Homo_C1", "Homo_C2", "Het_C1" и "Het_C2") продолжают уничтожать гематологические раковые клетки, тогда как не подвергнутые редактированию ("PCS") или контрольные подвергнутые редактированию iNK ("GFP массово"), полученные из исходных iPSC, утрачивают эту функцию в эквивалентные моменты времени.

[0469] На фиг. 29 изображена корреляция (R^2, составляющий 0,768) между экспрессией CD16 и уменьшением размера опухолевых сфероидов при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T), составляющем 3,16:1. Показаны дифференцированные iNK-клетки, полученные из подвергнутых массовому редактированию клеток iPSC либо из индивидуальных клонов iPSC с нокином CD16 в гене *GAPDH*. По оси Y представлены нормализованные величины уничтожения опухолевых клеток, тогда как по оси X представлена процентная доля популяции клеток, экспрессирующая CD16.

[0470] Фиг. 30A представляет собой гистограмму, на которой изображены иллюстративные данные ddPCR при измерении в день 9 после нуклеофекции двух разных линий iPSC плазмидами и 2 мкМ RNP, содержащих RSQ22337, нацеленную на ген *GAPDH*, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), для нокина груза CD16, груза CAR или биаллельного груза GFP/mCherry в ген *GAPDH*.

[0471] На фиг. 30B изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для линий iPSC, подвергнутых редактированию с помощью плазмид и 2 мкМ RNP, содержащих RSQ22337, нацеленную на ген *GAPDH*, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), для нокина груза CXCR2 в ген *GAPDH* (GAPDH::CXCR2), или контрольных iPSC, трансформированных с использованием только RNP (дикий тип). Экспрессия CXCR2 указана по оси X, подвергнутые редактированию клетки, экспрессирующие CXCR2, составляли 29,2% от подвергнутой массовому редактированию популяции клеток, тогда как поверхностная экспрессия CXCR2 составляла 8,53% в подвергнутой массовому редактированию популяции клеток.

[0472] Фиг. 31 представляет собой гистограмму, на которой изображена эффективность нокина у ряда последовательностей нокин-кассет с грузами, таких как CD16-P2A-CAR, CD16-IRES-CAR, CAR-P2A-CD16, CAR-IRES-CD16 и mbIL-15, в ген *GAPDH* с использованием RNP, содержащих RSQ22337, нацеленную на ген *GAPDH*, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), измеренная в день 0 после электропорации при измерении с помощью ddPCR, нацеленной на 5'-концевые (5'-CDN-зонд) и 3'-концевые (3'-поли(A)-зонд) положения "груза", используемого для нокина.

[0473] На фиг. 32 схематически изображена конструкция мембраносвязанного IL15.IL15Rα (mbIL-15), которую можно применять в качестве последовательности груза, используемого для нокина, как описано в данном документе.

[0474] Фиг. 33 представляет собой гистограмму, на которой изображена TI mbIL-15 в ген *GAPDH* с течением времени, измеренная в виде процентной доли от подвергнутой массовому редактированию популяции. Показаны показатели TI для iPSC, которые находятся на дне 28 процесса дифференцировки в iNK-клетки.

[0475] На фиг. 34A изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для подвергнутых массовому редактированию популяций iPSC с нокином mbIL-15 в гене *GAPDH* в день 39 дифференцировки в iNK.

[0476] На фиг. 34B изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для подвергнутых массовому редактированию популяций iPSC с нокином mbIL-15 в гене *GAPDH* в день 39 дифференцировки в iNK.

[0477] На фиг. 34C показаны фенотипы поверхностной экспрессии (измеряемой в виде процентной доли от популяции) подвергнутых массовому редактированию популяций iPSC с нокином mbIL-15 в гене *GAPDH*, которые дифференцируются в iNK-клетки, по сравнению с клетками исходных клонов, также дифференцирующимися в iNK-клетки ("WT"), в день 32, день 39, день 42 и день 49 дифференцировки iPSC.

[0478] На фиг. 35 показаны результаты двух анализов уничтожения опухолевых клеток *in vitro*. Две биологические повторности подвергнутых массовому редактированию популяций iPSC (S1 и S2), содержащих нокин mbIL-15 в гене *GAPDH*, подвергали дифференцировке в iNK-клетки (день 56 дифференцировки для S2 и день 63 дифференцировки для S1), и они функционировали для уменьшения сигнала флуоресценции гематологических раковых клеток (например, клеток Raji) по сравнению с исходными клетками WT, также дифференцирующимися в iNK-клетки, при измерении в отсутствие или в присутствии 10 мкг/мл ритуксимаба, при соотношении E:T 1 (A) или 2,5 (B) (эксперименты выполняются в двух повторностях, R1 и R2).

[0479] На фиг. 36 показаны результаты анализа уничтожения солидных опухолей, описанного на фиг. 26. Две биологические повторности подвергнутых массовому редактированию популяций iPSC (S1 и S2), содержащих нокин mbIL-15 в гене *GAPDH*, подвергали дифференцировке в iNK-клетки (день 39 дифференцировки iPSC), и они функционировали для уменьшения размера сфероидов из опухолевых клеток по сравнению с исходными клетками WT, также дифференцирующимися в iNK-клетки. Добавление 5 нг/мл экзогенного IL-15 приводило к увеличению уничтожения опухолевых клеток с помощью iNK. По оси Y изображена нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов — косвенный показатель обилия опухолевых клеток, тогда как по оси X изображено соотношение E:T.

[0480] На фиг. 37A показаны результаты анализов уничтожения солидных опухолей, описанных на фиг. 26. Две биологические повторности подвергнутых массовому редактированию популяций iPSC (S1 и S2), содержащих нокин mbIL-15 в гене *GAPDH*, подвергали дифференцировке в iNK-клетки (день 63 дифференцировки iPSC для S1 и день 56 дифференцировки iPSC для S2), и они функционировали для уменьшения размера сфероидов из опухолевых клеток. По оси Y представлена эффективность уничтожения, измеренная по нормализованной общей площади красных объектов (например, присутствию опухолевых

клеток), тогда как по оси X представлено соотношение клеток E:T; эксперименты проводили в двух или трех повторностях — R1, R2 и R2.1.

[0481] На фиг. 37B показаны результаты анализов уничтожения солидных опухолей, описанных на фиг. 37A, но с добавлением 10 мкг/мл антитела герцептина — добавки, которая запускает уничтожение опухолевых клеток посредством ADCC.

[0482] На фиг. 37C показаны результаты анализов уничтожения солидных опухолей, описанных на фиг. 37A, но с добавлением 5 нг/мл экзогенного IL-15.

[0483] На фиг. 37D показаны результаты анализов уничтожения солидных опухолей, описанных на фиг. 37A, но с добавлением 5 нг/мл экзогенного IL-15 и 10 мкг/мл антитела герцептина — добавки, которая запускает уничтожение опухолевых клеток посредством ADCC.

[0484] На фиг. 38 изображены совокупные результаты для двух независимых наборов клеток и 3-5 повторностей анализов уничтожения солидных опухолей, описанных на фиг. 26. Две независимые подвергнутые массовому редактированию популяции (S1 и S2), содержащие нокин mbIL-15 в гене *GAPDH*, подвергали дифференцировке в iNK-клетки (дни 39 и 49 дифференцировки iPSC для набора 1 и день 42 дифференцировки iPSC для S2), и они функционировали для значимого уменьшения размера сфероидов из опухолевых клеток по сравнению с iNK, дифференцированными из исходных клеток WT, в отсутствие экзогенного IL-15 (P = 0,034, +/- стандартное отклонение, непарный t-критерий); кроме того, дифференцированные клетки с нокином были склонны к значимому уменьшению размера сфероидов из опухолевых клеток по сравнению с дифференцированными исходными клетками WT в присутствии 5 нг/мл экзогенного IL-15 (P = 0,052, +/- стандартное отклонение, непарный t-критерий).

[0485] На фиг. 39A схематически изображена последовательность нокин-кассеты с грузом, содержащая мембраносвязанный IL15.IL15Rα (mbIL-15), связанная с последовательностью GFP, для интеграции в ген-мишень, как описано в данном документе.

[0486] На фиг. 39B схематически изображена последовательность нокин-кассеты с грузом, содержащая CD16, IL15 и IL15Rα, для интеграции в ген-мишень, как описано в данном документе.

[0487] На фиг. 39C схематически изображена последовательность нокин-кассеты с грузом, содержащая CD16 и мембраносвязанный IL15.IL15Rα (mbIL-15), для интеграции в ген-мишень, как описано в данном документе.

[0488] На фиг. 40A изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для подвергнутых массовому редактированию популяций iPSC через семь дней после трансформации с использованием PLA1829 (см. фиг. 39A), содержащей последовательность груза с мембраносвязанным IL15.IL15Rα (mbIL-15), связанную с последовательностью GFP, вставленной в ген *GAPDH* с использованием RNP, содержащих RSQ22337, нацеленную на ген *GAPDH*, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), или контрольных клеток WT, трансформированных с использованием только RNP, при измерении с помощью ddPCR. По оси Y показана экспрессия IL-15Rα, тогда как экспрессия GFP показана по оси X.

[0489] На фиг. 40B изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для подвергнутых массовому редактированию популяций iPSC через семь дней после трансформации с использованием PLA1832 или PLA1834 (см. фиг. 39B и 39C), содержащих последовательность груза с CD16, IL-15 и IL15Rα или содержащих последовательность груза с CD16 и мембраносвязанным IL15.IL15Rα (mbIL-15); вставленных в ген *GAPDH* с использованием RNP, содержащих RSQ22337, нацеленную на ген

GAPDH, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), при измерении с помощью ddPCR. По оси Y показана экспрессия IL-15Rα, по оси X показана экспрессия GFP.

[0490] Фиг. 41A представляет собой гистограмму, на которой изображены генотипы отдельных колоний после трансформации, как описано на фиг. 40A, с использованием PLA1829 (5 мкг) и 2 мкМ RNP, содержащих RSQ22337, нацеленную на ген *GAPDH*, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), при измерении с помощью ddPCR. Показаны отдельные гомозиготные клетки (TI ~ 100%), гетерозиготные клетки (TI ~ 50%) или клетки дикого типа (TI ~ 0%).

[0491] Фиг. 41B представляет собой гистограмму, на которой изображены генотипы отдельных колоний после трансформации, как описано на фиг. 40B, с использованием PLA1832 (5 мкг) и 2 мкМ RNP, содержащих RSQ22337, нацеленную на ген *GAPDH*, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), при измерении с помощью ddPCR. Показаны отдельные гомозиготные клетки (TI ~ 100%), гетерозиготные клетки (TI ~ 50%) или клетки дикого типа (TI ~ 0%).

[0492] Фиг. 41C представляет собой гистограмму, на которой изображены генотипы отдельных колоний после трансформации, как описано на фиг. 40B, с использованием PLA1834 (5 мкг) и 2 мкМ RNP, содержащих RSQ22337, нацеленную на ген *GAPDH*, и Cas12a (SEQ ID NO: 62), при измерении с помощью ddPCR. Показаны отдельные гомозиготные клетки (TI ~ 100%), гетерозиготные клетки (TI ~ 50%) или клетки дикого типа (TI ~ 0%).

[0493] На фиг. 42A изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для клеток, содержащих последовательности грузов, используемых для нокина, из PLA1829, PLA1832 или PLA1834 в гене *GAPDH* (как описано на фиг. 40A-40C), при измерении в день 32 дифференцировки в iNK; клетки "WT" трансформировали с использованием только RNP, и они также находились на дне 32 дифференцировки в iNK. Данные подчеркивают эффективность интеграции и экспрессии нокин-кассет, содержащих последовательность "груза", кодирующую белок IL-15Rα. По оси Y указана количественная оценка процентной доли клеток из указанной популяции, которая экспрессирует IL-15Rα, тогда как по оси X указан генотип колонии.

[0494] На фиг. 42B изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для клеток, содержащих последовательности грузов, используемых для нокина, из PLA1829, PLA1832 или PLA1834 в гене *GAPDH* (как описано на фиг. 40A-40C), при измерении в день 32 дифференцировки в iNK; клетки "WT" трансформировали с использованием только RNP, и они также находились на дне 32 дифференцировки в iNK. Данные подчеркивают эффективность интеграции и экспрессии нокин-кассет, содержащих последовательность "груза", кодирующую белок CD16. По оси Y указана количественная оценка процентной доли клеток из указанной популяции, которая экспрессирует CD16, тогда как по оси X указан генотип колонии.

[0495] На фиг. 42C изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для клеток, содержащих последовательности грузов, используемых для нокина, из PLA1829, PLA1832 или PLA1834 в гене *GAPDH* (как описано на фиг. 40A-40C), при измерении в день 32 дифференцировки в iNK; клетки "WT" трансформировали с использованием только RNP, и они также находились на дне 32 дифференцировки в iNK. Данные подчеркивают эффективность интеграции и экспрессии нокин-кассет, содержащих последовательность "груза", кодирующую белок IL-15Rα. По оси Y указана количественная оценка медианной интенсивности флуоресценции (MFI) популяции клеток, экспрессирующей IL-15Rα, тогда как по оси X указан генотип колонии.

[0496] На фиг. 42D изображены иллюстративные данные проточной цитометрии для клеток, содержащих последовательности грузов, используемых для нокина, из PLA1829, PLA1832 или PLA1834 в гене *GAPDH* (как описано на фиг. 40A-40C), при измерении в день 32 дифференцировки в iNK; клетки "WT" трансформировали с использованием только RNP, и они также находились на дне 32 дифференцировки в iNK. Данные подчеркивают эффективность интеграции и экспрессии нокин-кассет, содержащих последовательность "груза", кодирующую белок CD16. По оси Y указана количественная оценка медианной интенсивности флуоресценции (MFI) популяции клеток, экспрессирующей CD16, тогда как по оси X указан генотип колонии.

[0497] Фиг. 43A представляет собой панель цитометрических точечных диаграмм, на которых показано дополнительное обогащение по PSC, которые были подвергнуты редактированию с включением трансгена на основе PDL1, подвергнуты редактированию с включением трансгена на основе CD47 или подвергнуты биаллельному редактированию с включением трансгена на основе PDL1 и трансгена на основе CD47, нацеленных на локус гена *GAPDH*, после второго цикла редактирования с использованием рибонуклеопротеина ("RNP") и донорных конструкций на основе PDL1 и CD47 или RNP в отдельности.

[0498] Фиг. 43B представляет собой панель цитометрических точечных диаграмм, на которых показано дополнительное обогащение по PSC, которые были подвергнуты редактированию с включением трансгена на основе PDL1, нацеленного на ген *GAPDH*, после второго цикла редактирования с использованием RNP в отдельности.

[0499] На фиг. 44 изображены две цитометрические точечные диаграммы, на которых показаны не подвергнутые редактированию PSC или обогащение по PSC, которые были подвергнуты редактированию в локусе GAPDH с использованием двух разных донорных матриц, в основе одной из которых лежит PDL1, и в основе другой из которых лежит CD47. При редактировании с использованием двух разных донорных конструкций можно наблюдать клетки, которые подвергаются редактированию с использованием одной уникальной донорной конструкции (на основе PDL1 либо на основе CD47) либо подвергаются биаллельному редактированию с включением как трансгена на основе PDL1, так и трансгена на основе CD47, нацеленных на ген *GAPDH*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения и сокращения

[0500] Если не указано иное, каждый из следующих терминов имеет значение, указанное в данном разделе.

[0501] Формы единственного числа относятся к по меньшей мере одному из связанных существительных и используются взаимозаменяемо с терминами "по меньшей мере один" и "один или несколько". Союзы "или" и "и/или" используются взаимозаменяемо как неисключающие дизъюнкции.

[0502] Используемый в данном документе термин "раковый" (также используемый взаимозаменяемо с термином "неопластический") относится к клеткам, обладающим способностью к автономному росту, т. е. аномальному статусу или состоянию, характеризующемуся клеточным ростом с быстрой пролиферацией. Раковые болезненные состояния могут быть отнесены к категории патологических, т. е. характеризующихся или составляющих болезненное состояние, например, рост злокачественной опухоли, или могут быть отнесены к категории непатологических, т. е. к отклонению от нормы, но не

ассоциированному с болезненным состоянием, например, клеточная пролиферация, ассоциированная с заживлением ран.

[0503] Используемый в данном документе термин "нуклеаза CRISPR/Cas" относится к любому белку системы CRISPR/Cas с активностью ДНК-нуклеазы, например, белку Cas9 или Cas12, который проявляет специфическую ассоциацию (или "нацеливание") в отношении сайта-мишени ДНК, например, в пределах геномной последовательности в клетке в присутствии направляющей молекулы. В стратегиях, системах и способах, раскрытых в данном документе, можно применять любую комбинацию нуклеазы CRISPR/Cas, раскрытой в данном документе или известной средним специалистам в данной области. Средним специалистам в данной области будут известны дополнительные нуклеазы CRISPR/Cas и варианты, подходящие для применения в контексте настоящего изобретения, и будет понятно, что настоящее изобретение не ограничивается в этом отношении.

[0504] Используемый в данном документе термин "дифференцировка" представляет собой процесс, посредством которого неспециализированная ("некоммитированная") или менее специализированная клетка приобретает характеристики специализированной клетки, такой как, например, клетка крови. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка или клетка с индуцированной дифференцировкой представляет собой клетку, которая заняла более специализированное ("коммитированное") положение в линии дифференцировки клетки. Например, клетка iPS (iPSC) может дифференцироваться в различные более дифференцированные типы клеток, например, в гемопоэтическую стволовую клетку, лимфоцит и другие типы клеток, после обработки подходящими факторами дифференцировки в среде для культивирования клеток. Подходящие способы, факторы дифференцировки и среды для культивирования клеток для дифференцировки плюри- и мультипотентных типов клеток в более дифференцированные типы клеток хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления термин "коммитированная" применяется в отношении процесса дифференцировки для обозначения клетки, которая прошла по пути дифференцировки до точки, где при нормальных обстоятельствах она бы продолжила или будет продолжать дифференцироваться в определенный тип клеток или подмножество типов клеток и при нормальных обстоятельствах не может дифференцироваться в другой тип клеток (отличный от определенного типа клеток или подмножества типов клеток) или вернуться к менее дифференцированному типу клеток.

[0505] Используемые в данном документе термины "маркер дифференцировки", "маркерный ген дифференцировки" или "ген дифференцировки" относятся к генам или белкам, экспрессия которых указывает на дифференцировку клеток, происходящую внутри клетки, такой как плюрипотентная клетка. В некоторых вариантах осуществления маркерные гены дифференцировки включают без ограничения следующие гены: CD34, CD4, CD8, CD3, CD56 (NCAM), CD49, CD45, рецептор NK-клеток (кластер дифференцировки 16 (CD16)), член D группы 2 белков естественных киллеров (NKG2D), CD69, NKp30, NKp44, NKp46, CD158b, FOXA2, FGF5, SOX17, XIST, NODAL, COL3A1, OTX2, DUSP6, EOMES, NR2F2, NR0B1, CXCR4, CYP2B6, GATA3, GATA4, ERBB4, GATA6, HOXC6, INHA, SMAD6, RORA, NIPBL, TNFSF11, CDH11, ZIC4, GAL, SOX3, PITX2, APOA2, CXCL5, CER1, FOXQ1, MLL5, DPP10, GSC, PCDH10, CTCFL, PCDH20, TSHZ1, MEGF10, MYC, DKK1, BMP2, LEFTY2, HES1, CDX2, GNAS, EGR1, COL3A1, TCF4, HEPH, KDR, TOX, FOXA1, LCK, PCDH7, CD1D, FOXG1, LEFTY1, TUJ1, ген T (Brachyury), ZIC1, GATA1, GATA2, HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, PAX5, RBPJ, RUNX1, STAT1 и STAT3.

[0506] Используемые в данном документе термины "профиль маркерных генов дифференцировки" или "профиль генов дифференцировки", "профиль экспрессии генов дифференцировки", "сигнатура экспрессии генов дифференцировки", "панель экспрессии генов дифференцировки", "панель генов дифференцировки" или "сигнатура генов дифференцировки" относится к экспрессии или уровням экспрессии множества маркерных генов дифференцировки.

[0507] Используемый в данном документе термин "нуклеаза" относится к любому белку, который катализирует расщепление фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой ДНК-нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой "никазу", которая вызывает однонитевой разрыв при расщеплении двухнитевой ДНК, например, геномной ДНК в клетке. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза вызывает двухнитевой разрыв при расщеплении двухнитевой ДНК, например, геномной ДНК в клетке. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза связывается со специфическим сайтом-мишенью в двухнитевой ДНК, который перекрывается с местоположением образовавшегося разрыва или прилегает к нему. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза вызывает двухнитевой разрыв, который содержит выступы длиной от 0 (тупые концы) до 22 нуклеотидов как в 3'-, так и в 5'-ориентациях. Как обсуждается в данном документе, нуклеазы CRISPR/Cas, нуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и мегануклеазы представляют собой иллюстративные нуклеазы, которые можно применять в соответствии со стратегиями, системами и способами согласно настоящему изобретению.

[0508] Используемый в данном документе термин "эмбриональная стволовая клетка" относится к плюрипотентным стволовым клеткам, происходящим из внутренней клеточной массы эмбриональной бластоцисты. В некоторых вариантах осуществления эмбриональные стволовые клетки являются плюрипотентными и в процессе развития дают начало всем производным трех первичных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы. В некоторых таких вариантах осуществления эмбриональные стволовые клетки не участвуют в развитии внеэмбриональных мембран или плаценты, т. е. не являются тотипотентными.

[0509] Используемый в данном документе термин "эндогенный" применительно к нуклеиновым кислотам относится к нативной нуклеиновой кислоте (например, гену, кодирующей белок последовательности) в ее естественном местоположении, например, в геноме клетки.

[0510] Термин "существенный ген", используемый в данном документе в отношении клетки, относится к гену, который кодирует по меньшей мере один продукт гена, необходимый для выживания и/или пролиферации клетки. Существенный ген может представлять собой "ген домашнего хозяйства", который существенно важен для выживания всех типов клеток, или ген, экспрессия которого требуется в конкретном типе клеток для выживания и/или пролиферации в определенных условиях культивирования, например, для правильной дифференцировки клеток iPS или ES или размножения клеток, происходящих из iPS или ES. Потеря функции существенного гена приводит в некоторых вариантах осуществления к значительному снижению выживаемости клеток, например, к снижению времени, в течение которого выживает клетка, характеризующаяся потерей функции существенного гена, по сравнению с клеткой, принадлежащей к тому же типу клеток, но не характеризующейся потерей функции того же существенного гена. В некоторых вариантах осуществления потеря функции существенного гена приводит к гибели пораженной клетки. В некоторых вариантах осуществления потеря функции существенного гена приводит к значительному снижению клеточной пролиферации, например, к снижению способности клетки делиться,

что может проявляться в значительном периоде времени, необходимом клетке для завершения клеточного цикла, или, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления, в потере способности клетки завершать клеточный цикл и, таким образом, вообще пролиферировать.

[0511] Термин "экзогенный", используемый в данном документе применительно к нуклеиновым кислотам, относится к нуклеиновой кислоте (нативной или ненативной), которая была искусственно введена в созданную руками человека конструкцию (например, нокин-кассету или донорную матрицу) или в геном клетки с использованием, например, методик редактирования генов или методик генной инженерии, например, методик интеграции на основе HDR.

[0512] Термин "направляющая молекула", или "направляющая РНК", или "gRNA" при использовании в отношении системы CRISPR/Cas означает любую нуклеиновую кислоту, которая способствует специфической ассоциации (или "нацеливанию") нуклеазы CRISPR/Cas, например, белка Cas9 или Cas12, в отношении сайта-мишени ДНК, как, например, находящегося в пределах геномной последовательности в клетке. Хотя направляющие молекулы обычно представляют собой молекулы РНК, из уровня техники хорошо известно, что в качестве направляющих молекул можно использовать химически модифицированные молекулы РНК, включая гибридные молекулы ДНК/РНК.

[0513] Используемые в данном документе термины "гемопоэтическая стволовая клетка" или "дефинитивная гемопоэтическая стволовая клетка" относятся к CD34-положительным (CD34+) стволовым клеткам. В некоторых вариантах осуществления CD34-положительные стволовые клетки способны давать начало зрелым миелоидным и/или лимфоидным типам клеток. В некоторых вариантах осуществления миелоидные и/или лимфоидные типы клеток включают, например, Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK) и/или В-клетки.

[0514] Используемые в данном документе термины "индуцированная плюрипотентная стволовая клетка", "клетка iPS" или "iPSC" относятся к стволовой клетке, полученной из дифференцированной соматической клетки (например, клетки взрослого организма, новорожденного или плода) с помощью процесса, называемого перепрограммированием (например, дедифференцировки). В некоторых вариантах осуществления перепрограммированные клетки способны дифференцироваться в ткани всех трех зародышевых или дермальных листков: мезодермы, энтодермы и эктодермы. iPSC не встречаются в природе.

[0515] Используемые в данном документе термины "NK-клетка, происходящая из iPS" или "iNK-клетка" относятся к естественной клетке-киллеру, которая была получена путем дифференцировки клетки iPS, при этом данная клетка iPS может иметь или не иметь генетическую модификацию.

[0516] Используемые в данном документе термины "Т-клетка, происходящая из iPS" или "iT-клетка" относятся к Т-клетке, которая была получена путем дифференцировки клетки iPS, при этом данная клетка iPS может иметь или не иметь генетическую модификацию.

[0517] Используемый в данном документе термин "мультипотентная стволовая клетка" относится к клетке, которая имеет потенциал развития для дифференцировки в клетки одного или нескольких зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы), но не всех трех зародышевых листков. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мультипотентную клетку также можно назвать "частично дифференцированной клеткой". Мультипотентные клетки хорошо известны из уровня техники, и примеры мультипотентных клеток включают стволовые клетки взрослых организмов, такие как, например,

гемопоэтические стволовые клетки и нейрональные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления термин "мультипотентный" указывает на то, что клетка может образовывать многие типы клеток данной линии дифференцировки, но не клетки других линий дифференцировки. Например, мультипотентная гемопоэтическая клетка может образовывать множество различных типов клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты и т. д.), но она не может образовывать нейроны. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления термин "мультипотентность" относится к состоянию клетки со степенью потенциала развития ниже тотипотентного и плюрипотентного.

[0518] Используемый в данном документе термин "плюрипотентный" относится к способности клетки образовывать все линии дифференцировки тела или сомы (т. е. собственно эмбриона) или данного организма (например, человека). Например, эмбриональные стволовые клетки представляют собой тип плюрипотентных стволовых клеток, которые способны образовывать клетки из каждого из трех зародышевых листков — эктодермы, мезодермы и энтодермы. В целом, плюрипотентность может быть описана как континуум способностей к развитию, варьирующийся от не полностью или частично плюрипотентной клетки (например, стволовой клетки эпибласта или EpiSC), которая не способна дать начало полноценному организму, до более примитивной, более плюрипотентной клетки, которая способна дать начало полноценному организму (например, эмбриональной стволовой клетки или индуцированной плюрипотентной стволовой клетки).

[0519] Используемый в данном документе термин "плюрипотентность" относится к клетке, которая имеет потенциал развития для дифференцировки в клетки всех трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы). В некоторых вариантах осуществления плюрипотентность можно частично определить путем оценки характеристик плюрипотентности клеток. В некоторых вариантах осуществления характеристики плюрипотентности включают без ограничения (i) морфологию плюрипотентных стволовых клеток; (ii) потенциал неограниченного самообновления; (iii) экспрессию маркеров плюрипотентных стволовых клеток, в том числе без ограничения SSEA1 (только мыши), SSEA3/4, SSEA5, TRA1-60/81, TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD133/проминина, CD140a, CD56, CD73, CD90, CD105, OCT4 (также известного как POU5F1), NANOG, SOX2, CD30 и/или CD50; (iv) способность дифференцироваться во все три соматические линии дифференцировки (эктодерму, мезодерму и энтодерму); (v) образование тератомы, состоящей из трех соматических линий дифференцировки; и (vi) образование эмбриоидных телец, состоящих из клеток трех соматических линий дифференцировки.

[0520] Используемый в данном документе термин "морфология плюрипотентных стволовых клеток" относится к классическим морфологическим признакам эмбриональной стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления нормальная морфология эмбриональных стволовых клеток характеризуется маленькой и округлой формой, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, заметным присутствием ядрышек и типичным межклеточным расстоянием.

[0521] Термин "мультицистронный" или "полицистронный" при использовании в данном документе в отношении нокин-кассеты относится к тому факту, что нокин-кассета может экспрессировать два или более белка из одного и того же мРНК-транскрипта. Аналогичным образом "бицистронная" нокин-кассета представляет собой нокин-кассету, которая может экспрессировать два белка из одного и того же мРНК-транскрипта.

[0522] Используемый в данном документе термин "полинуклеотид" (в том числе без ограничения "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты",

"последовательность нуклеиновой кислоты" и "олигонуклеотид") относится к ряду нуклеотидных оснований (также называемых "нуклеотидами") в ДНК и РНК и означают любую цепь из двух или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, нуклеотидные последовательности, нуклеиновые кислоты и т. д. могут представлять собой химерные смеси или их производные или модифицированные версии — однонитевые или двухнитевые. В некоторых таких вариантах осуществления модификации могут иметь место во фрагменте-основании, сахарном фрагменте или фосфатном остове, например, для улучшения стабильности молекулы, ее параметров гибридизации и т. д. Как правило, нуклеотидная последовательность обычно несет генетическую информацию, в том числе без ограничения информацию, используемую клеточными механизмами для производства белков и ферментов. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность и/или генетическая информация содержит двухнитевую или однонитевую геномную ДНК, РНК, любые синтетические и полученные путем генетических манипуляций полинуклеотиды и/или смысловые и/или антисмысловые полинуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты содержат модифицированные основания.

[0523] В нуклеотидных последовательностях, представленных в данном документе, используются общепринятые обозначения по IUPAC, как показано в таблице 1 ниже (см. также Cornish-Bowden, Nucleic Acids Res. 1985; 13(9):3021-30, включенную в данный документ посредством ссылки). Однако следует отметить, что "T" обозначает "тимин или урацил" в тех случаях, когда последовательность может кодироваться либо ДНК, либо РНК, например, в определенных нацеливающих доменах направляющей молекулы CRISPR/Cas.

Таблица 1. Обозначение нуклеиновых кислот по IUPAC

Символ	**Основание**
A	Аденин
T	Тимин или урацил
G	Гуанин
C	Цитозин
U	Урацил
K	G или T/U
M	A или C
R	A или G
Y	C или T/U
S	C или G
W	A или T/U
B	C, G или T/U
V	A, C или G
H	A, C или T/U
D	A, G или T/U
N	A, C, G или T/U

[0524] Используемые в данном документе термины "потентность" или "потентность к развитию" относятся к сумме всех вариантов развития, доступных для клетки (т. е. потентности к развитию), в

частности, например, применительно к потенциалу развития клетки. В некоторых вариантах осуществления континуум потентности клетки включает без ограничения тотипотентные клетки, плюрипотентные клетки, мультипотентные клетки, олигопотентные клетки, унипотентные клетки и окончательно дифференцированные клетки.

[0525] Используемые в данном документе термины "предупреждать", "осуществление предупреждения" и "предупреждение" относятся к предупреждению заболевания у млекопитающего, например, у человека, включая (a) избегание или предотвращение заболевания; (b) воздействие на предрасположенность к заболеванию; или (c) предупреждение или задержку начала проявления по меньшей мере одного симптома заболевания.

[0526] Используемые в данном документе термины "белок", "пептид" и "полипептид" используются взаимозаменяемо для обозначения последовательной цепи аминокислот, связанных между собой пептидными связями. Термины включают отдельные белки, группы или комплексы белков, которые ассоциируют между собой, а также фрагменты или части, варианты, производные и аналоги таких белков. Если не указанно иное, пептидные последовательности представлены в данном документе с использованием общепринятых обозначений, начиная с амино- или N-конца слева и переходя к карбокси- или C-концу справа. Могут использоваться стандартные однобуквенные или трехбуквенные сокращения.

[0527] Используемый в данном документе термин "представляющий интерес продукт гена" может относиться к любому продукту, кодируемому геном, включая любой полинуклеотид или полипептид. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой белок, который в природе не экспрессируется клеткой-мишенью по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой белок, который придает клетке новую терапевтическую активность, такой как без ограничения химерный антигенный рецептор (CAR) или его антигенсвязывающий фрагмент, Т-клеточный рецептор или его антигенсвязывающая часть, не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любая комбинация двух или более из них. Следует понимать, что способы и клетки по настоящему изобретению не ограничиваются каким-либо конкретным представляющим интерес продуктом гена, и что выбор представляющего интерес продукта гена будет зависеть от типа клетки и конечного применения клеток.

[0528] Используемый в данном документе термин "репортерный ген" относится к экзогенному гену, который был введен в клетку, например, интегрирован в геном клетки, который придает признак, пригодный для искусственного отбора. Распространенные репортерные гены представляют собой гены флуоресцентных репортерных белков, которые кодируют флуоресцентный белок, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), и гены устойчивости к антибиотикам, которые придают клеткам устойчивость к антибиотикам.

[0529] Используемые в данном документе термины "перепрограммирование", или "дедифференцировка", или "повышение потентности клетки", или "повышение потентности к развитию" относятся к способу повышения потентности клетки или дедифференцировки клетки до менее дифференцированного состояния. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка, которая характеризуется повышенной потентностью клетки, имеет большую пластичность в развитии (т. е. может

дифференцироваться в большее количество типов клеток) по сравнению с той же клеткой в неперепрограммированном состоянии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления перепрограммированная клетка представляет собой клетку, которая находится в менее дифференцированном состоянии, чем такая же клетка в неперепрограммированном состоянии. В некоторых вариантах осуществления "перепрограммирование" относится к дедифференцировке соматической клетки или мультипотентной стволовой клетки в плюрипотентную стволовую клетку, также называемую индуцированной плюрипотентной стволовой клеткой или iPSC. Подходящие способы получения iPSC из соматических или мультипотентных стволовых клеток хорошо известны специалистам в данной области.

[0530] Используемый в данном документе термин "субъект" обозначает человека или животное, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек может быть любого возраста (например, являться плодом, младенцем, ребенком, молодым человеком или взрослым). В некоторых вариантах осуществления субъект-человек может иметь риск развития заболевания или страдать им или может нуждаться в изменении гена или комбинации конкретных генов. В качестве альтернативы в некоторых вариантах осуществления субъект может представлять собой животное, отличное от человека, которое может включать без ограничения млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления отличное от человека животное представляет собой отличного от человека примата, грызуна (например, мышь, крысу, хомяка, морскую свинку и т. д.), кролика, собаку, кошку и т. д. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения отличный от человека субъект-животное представляет собой домашний скот, например, корову, лошадь, овцу, козу и т. д. В определенных вариантах осуществления отличный от человека субъект-животное представляет собой домашнюю птицу, например, курицу, индейку, утку и т. д.

[0531] Используемые в данном документе термины "лечение", "лечить" и "осуществление лечения" относятся к клиническому вмешательству, направленному на обращение вспять, облегчение, задержку начала проявления или подавление прогрессирования, уменьшение интенсивности проявлений, снижение тяжести, предупреждение или задержку рецидива заболевания, нарушения или состояния или одного или нескольких его симптомов и/или на улучшение одного или нескольких симптомов заболевания, нарушения или состояния, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления состояние включает повреждение. В некоторых вариантах осуществления повреждение может быть острым или хроническим (например, может представлять собой повреждение ткани в результате первопричинного заболевания или нарушения, которое вызывает, например, вторичное повреждение, такое как повреждение ткани). В некоторых вариантах осуществления лечение, например, в форме NK-клетки, происходящей из iPSC, или популяции NK-клеток, происходящих из iPSC, как описано в данном документе, может проводиться субъекту после развития одного или нескольких симптомов и/или после диагностирования заболевания. Лечение может проводиться при отсутствии симптомов, например, для предупреждения или задержки начала проявления симптома или подавления начала проявления или прогрессирования заболевания. Например, в некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться восприимчивому субъекту до начала проявления симптомов (например, с учетом генетических факторов или других факторов восприимчивости). В некоторых вариантах осуществления лечение также может быть продолжено после устранения симптомов, например, для предупреждения или задержки их рецидива. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к улучшению и/или устранению одного или нескольких симптомов заболевания, нарушения или состояния.

[0532] Используемый в данном документе термин "вариант" относится к объекту, такому как полипептид или полинуклеотид, который демонстрирует значительную структурную идентичность с эталонным объектом, но структурно отличается от эталонного объекта по наличию или уровню одного или нескольких химических фрагментов по сравнению с эталонным объектом. Во многих вариантах осуществления вариант также функционально отличается от своего эталонного объекта. Как правило, то, считается ли должным образом конкретный объект "вариантом" эталонного объекта, зависит от степени его структурной идентичности с эталонным объектом. Используемый в данном документе термин "функциональный вариант" относится к варианту, который придает ту же функцию, что и эталонный объект, например, функциональный вариант продукта гена из существенного гена представляет собой вариант, который способствует выживанию и/или пролиферации клетки. Следует понимать, что функциональный вариант не обязательно должен быть функционально эквивалентен эталонному объекту, при условии, что он придает ту же функцию, что и эталонный объект.

Способы редактирования генома клетки

[0533] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы редактирования генома клетки. В определенных вариантах осуществления способ включает приведение клетки в контакт с нуклеазой, которая вызывает разрыв в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует по меньшей мере один продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки. Клетку также приводят в контакт с (i) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и/или (ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и выше нее (с 5'-стороны от нее) (фиг. 3D). Нокин-кассета интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва с получением в результате этого клетки с отредактированным геномом, которая экспрессирует представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант. Генетически модифицированная "подвергнутая нокину" клетка выживает и размножается, производя клетки-потомки с геномами, которые также содержат экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена. Это продемонстрировано на фиг. 3A в отношении иллюстративного способа.

[0534] Если нокин-кассета не интегрируется должным образом в геном клетки, нежелательные события редактирования, возникающие в результате разрыва, например, NHEJ-опосредованное образование вставок/делеций, могут привести к получению нефункциональной версии существенного гена, например, находящейся вне рамки считывания. В результате этого получают "подвергнутую нокауту" клетку, где эффективность редактирования у нуклеазы достаточно высока, чтобы разрушить оба аллеля. В определенных вариантах осуществления в результате этого получают "подвергнутую нокауту" клетку, где эффективность редактирования у нуклеазы достаточно высока, чтобы разрушить один аллель. Без достаточного количества функциональных копий существенного гена эти "подвергнутые нокауту" клетки не способны выжить и не производят каких-либо клеток-потомков.

[0535] Поскольку "подвергнутые нокину" клетки выживают, а "подвергнутые нокауту" клетки не выживают, способ позволяет автоматически отбирать "подвергнутые нокину" клетки при его применении к популяции исходных клеток. Примечательно, что в определенных вариантах осуществления в способе не требуются высокие значения эффективности нокина ввиду этого аспекта автоматического отбора. Поэтому он особенно подходит для способов, в которых донорная матрица представляет собой dsDNA (например, плазмиду), где значения эффективности нокина часто ниже 5%. Как отмечено в иллюстративном способе на фиг. 3C, в некоторых вариантах осуществления некоторые клетки в популяции исходных клеток могут оставаться не подвергнутыми редактированию, т. е. не затронутыми нуклеазой. Эти клетки также будут выживать и производить потомство с геномами, которые не содержат экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена. Если эффективность редактирования у нуклеазы является высокой, например, составляет приблизительно 60-90% или выше, процентная доля не подвергнутых редактированию клеток будет относительно низкой по сравнению с процентной долей генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления высокие значения эффективности редактирования у нуклеазы (например, более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90% или более 95%) содействуют эффективной интеграции трансгенов в масштабах всей популяции, поскольку процентная доля не подвергнутых редактированию клеток будет относительно низкой по сравнению с процентной долей генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в данном документе, по меньшей мере приблизительно 65% клеток (например, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% клеток) подвергаются редактированию нуклеазой, например, Cas12a или Cas9. В некоторых вариантах осуществления RNP, содержащие нуклеазу CRISPR (например, Cas9 или Cas12a) и направляющую молекулу, способны расщеплять локус существенного гена (например, концевой экзон в локусе любого существенного гена, представленного в таблице 3) в по меньшей мере 65% клеток в популяции клеток (например, в по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% клеток в популяции клеток). В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования определяют до полной гибели клеток-мишеней, например, в день 1 и/или день 2 после трансфекции или трансдукции. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования, измеренная в день 1 и/или день 2 после трансфекции или трансдукции, может не отражать полную долю клеток, в которых произошло редактирование, поскольку в некоторых вариантах осуществления определенные события редактирования могут приводить к почти немедленной и/или быстрой гибели клеток. В некоторых вариантах осуществления почти немедленная и/или быстрая гибель клеток может происходить в течение любого периода времени менее 48 часов после трансфекции или трансдукции, например, менее 48 часов, менее 44 часов, менее 40 часов, менее 36 часов, менее 32 часов, менее 28 часов, менее 24 часов, менее 20 часов, менее 16 часов, менее 15 часов, менее 14 часов, менее 13 часов, менее 12 часов, менее 11 часов, менее 10 часов, менее 9 часов, менее 8 часов, менее 7 часов, менее 6 часов, менее 5 часов, менее 4 часов, менее 3 часов, менее 2 часов или менее 1 часа после трансфекции или трансдукции.

[0536] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза вызывает двухнитевой разрыв. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза вызывает однонитевой разрыв, например, в некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой никазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой средство праймированного редактирования, которое содержит никазный домен, слитый с доменом обратной транскриптазы. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой РНК-направляемое средство праймированного редактирования, и gRNA содержит донорную матрицу. В некоторых вариантах осуществления используется система с двумя никазами, которая вызывает двухнитевой разрыв посредством двух однонитевых разрывов в противоположных нитях двухнитевой ДНК, например, геномной ДНК клетки.

[0537] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы, подходящие для высокоэффективного нокина (например, где высокая доля популяции клеток содержит подвергнутый нокину аллель), что позволяет решить серьезную производственную проблему. Исторически сложилось, что нокин представляющего интерес гена с использованием плазмидных векторов в результате приводит к значениям эффективности от 0,1 до 5% (см., например, Zhu et al., CRISPR/Cas-Mediated Selection-free Knockin Strategy in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2015;4(6):1103-1111), такая низкая эффективность нокина может обуславливать необходимость затрат большого количества времени и ресурсов на скрининг потенциально подвергнутых редактированию клонов.

[0538] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген, подвергнутый нокину в клетке, может играть роль в эффекторной функции, специфичности, скрытности, персистенции, хоминге/хемотаксисе и/или устойчивости к определенным химическим веществам (см., например, Saetersmoen et al., Seminars in Immunopathology, 2019).

[0539] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы получения подвергнутых нокину клеток, в которых поддерживаются высокие уровни экспрессии независимо от возраста, статуса дифференцировки и/или экзогенных условий. Например, в некоторых вариантах осуществления интегрированный груз экспрессируется на оптимальном уровне с желаемой субклеточной локализацией в зависимости от сайта вставки. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены такие клетки.

Системы редактирования генома клетки

[0540] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены системы редактирования генома клетки. В некоторых вариантах осуществления система содержит клетку (или популяцию клеток), нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее).

[0541] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза вызывает двухнитевой разрыв. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза вызывает однонитевой разрыв, например, в некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой никазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой средство праймированного редактирования, которое содержит никазный домен, слитый с доменом обратной транскриптазы. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза

представляет собой РНК-направляемое средство праймированного редактирования, и gRNA содержит донорную матрицу. В некоторых вариантах осуществления используется система с двумя никазами, которая вызывает двухнитевой разрыв посредством двух однонитевых разрывов в противоположной нити двухнитевой ДНК, например, геномной ДНК клетки.

[0542] Системы редактирования генома могут быть реализованы (например, введены или доставлены в клетку или субъекту) различными путями, и различные реализации могут быть подходящими для различных путей применения. Например, в определенных вариантах осуществления система редактирования генома реализована в виде комплекса белок/РНК (рибонуклеопротеина или RNP). В определенных вариантах осуществления система редактирования генома реализована в виде одной или нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты в виде РНК-направляемой нуклеазы и направляющей РНК, описанные в данном документе (необязательно с одним или несколькими дополнительными компонентами); в определенных вариантах осуществления система редактирования генома реализована в виде одного или нескольких векторов, содержащих такие нуклеиновые кислоты, например, в виде вирусного вектора, такого как аденоассоциированный вирус; и в определенных вариантах осуществления система редактирования генома реализована в виде комбинации любого из вышеизложенного. Дополнительные или модифицированные реализации, которые функционируют в соответствии с изложенными в данном документе принципами, будут очевидны специалисту в данной области и находятся в пределах объема настоящего изобретения.

[0543] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают выполнение определенных стадий в по меньшей мере двух повторностях. Например, в некоторых вариантах осуществления интеграция определенных представляющих интерес продуктов генов, в частности, включая несколько представляющих интерес генов или большое количество экзогенных последовательностей генов, может привести к начальному циклу отбора, который приводит к более низкому, чем желаемый, уровню целенаправленной интеграции. В определенных вариантах осуществления более низкие, чем желаемые, уровни нуклеазной активности и/или целенаправленной интеграции нокин-кассеты могут приводить к более низкой, чем желаемая, процентной доле выживших клеток и/или клеток, содержащих нокин-кассету; это может затруднить идентификацию клетки с генетической нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления для дополнительного обогащения по популяции подвергнутых редактированию клеток клетки необязательно размножали, а затем подвергали повторному редактированию путем получения пула подвергнутых редактированию клеток как с RNP, так и с донорными матрицами (например, с одной или несколькими RNP-частицами, нацеленными на один или несколько локусов, и одной или несколькими донорными матрицами, предназначенными для целенаправленной интеграции в один или несколько локусов) либо с RNP в отдельности (например, одним или несколькими RNP, которые используют остаточную донорную матрицу).

[0544] В некоторых вариантах осуществления при выполнении нескольких циклов редактирования с использованием RNP и/или донорной матрицы обогащение осуществляют путем: i) удаления клеток, в которые не была включена генетическая нагрузка, и/или ii) получения большего количества клеток с включенной нокин-кассетой. В некоторых вариантах осуществления эффективность дополнительных стадий обогащения в зависимости от груза в зависимости от того, используется ли несколько конструкций, мишени в пределах существенного гена или других факторов может привести к по меньшей мере приблизительно двукратному, трехкратному, четырехкратному, пятикратному или большему

улучшению процентной доли клеток, в которые включена нокин-кассета из донорной матрицы. В некоторых вариантах осуществление такое обогащение может привести к поглощению "груза" в пределах существенного гена клеток млекопитающих, составляющему более 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или более 95%.

[0545] В некоторых вариантах осуществления донорные матрицы (например, донорные конструкции на основе нуклеиновой кислоты) содержат трансген, фланкированный первой гомологичной областью (HR), например, плечом гомологии, и второй HR, например, вторым плечом гомологии, предназначенными для отжига с первой геномной областью (GR) и второй GR в существенном гене клетки. Чтобы иметь возможность отжига, HR и GR не обязательно должны быть абсолютно гомологичными. В некоторых вариантах осуществления примеры включают небольшое количество неингибирующих (менее 6 и в некоторых случаях всего 1) мутаций в PAM с 5'-стороны от трансгена в нокин-кассете. В некоторых вариантах осуществления другие неингибирующие изменения включают оптимизацию кодонов, где ненужные нуклеотиды в экзоне дикого типа удаляются из нуклеотидной последовательности в нокин-кассете. В некоторых вариантах осуществления дополнительно рассматриваются другие такие молчащие мутации, блокирующие PAM, или модификации кодонов, которые предотвращают расщепление донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 90% гомологии достаточно для функционального отжига для целей приведенных в данном документе примеров. В некоторых вариантах осуществления уровень гомологии между HR и GR составляет более 90%, более 92%, более 94%, более 96%, более 98% или более 99%. Другие варианты осуществления и концепции, представленные в этом абзаце, рассматриваются и включаются в термин "по существу гомологичный".

Генетически модифицированные клетки

[0546] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены генетически модифицированные клетки или сконструированные клетки, в том числе популяции таких клеток и потомство таких клеток.

[0547] В некоторых вариантах осуществления клетку получают посредством способа по настоящему изобретению, например, способа, который включает приведение клетки в контакт с нуклеазой, которая вызывает разрыв в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует по меньшей мере один продукт гена, необходимый для выживания и/или пролиферации клетки. Клетку также приводят в контакт с донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). Нокин-кассета интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва с получением в результате этого клетки с отредактированным геномом, которая экспрессирует представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант. Это продемонстрировано на фиг. 3 в отношении иллюстративного способа. В некоторых вариантах осуществления клетку приводят в контакт с донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в

рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и выше нее (с 5'-стороны от нее).

[0548] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геном с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки.

[0549] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геном с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с кодирующей последовательностью существенного гена и выше нее (с 5'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки.

[0550] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в геноме клетки, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей продукт гена из существенного гена или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где клетка экспрессирует представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, экспрессируются из эндогенного промотора существенного гена.

Донорная матрица

[0551] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена донорная матрица, содержащая нокин-кассету с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки.

[0552] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен стимул для разработки донорных матриц, содержащих нокин-кассету с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и выше нее (с 5'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки; см., например, фиг. 3D.

[0553] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица предназначена для применения при редактировании генома клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR).

[0554] Конструкция донорной матрицы подробно описана в литературе, например, в публикации согласно PCT № WO2016/073990A1. Донорные матрицы могут быть однонитевыми или двухнитевыми и могут использоваться для содействия репарации двухнитевых разрывов (DSB) на основе HDR, и они особенно применимы для вставки новой последовательности в последовательность-мишень или для полной

замены последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу. В некоторых вариантах осуществления донорная ДНК-матрица является двухнитевой.

[0555] Независимо от того, являются ли они однонитевыми или двухнитевыми, донорные матрицы обычно содержат области, которые гомологичны областям ДНК, находящимся в пределах подлежащей расщеплению последовательности-мишени или рядом с ней (например, фланкирующим ее или прилегающим к ней). Эти гомологичные области называются в данном документе "плечами гомологии" и схематически проиллюстрированы ниже относительно нокин-кассеты (которая может быть отделена от одного или обоих плеч гомологии дополнительными спейсерными последовательностями, которые не показаны):

[0556] [5'-плечо гомологии] – [нокин-кассета] – [3'-плечо гомологии].

[0557] Плечи гомологии могут иметь любую подходящую длину (включая 0 нуклеотидов, если используется только одно плечо гомологии), и 5'- и 3'-плечи гомологии могут иметь одинаковую длину или могут различаться по длине. На выбор подходящих длин плеч гомологии может влиять множество факторов, таких как желание избежать гомологий или микрогомологий с определенными последовательностями, такими как Alu-повторы или другие весьма распространенные элементы. Например, 5'-плечо гомологии может быть укорочено, чтобы избежать повторяющегося элемента последовательности. В других вариантах осуществления 3'-плечо гомологии может быть укорочено, чтобы избежать повторяющегося элемента последовательности. В некоторых вариантах осуществления как 5'-, так и 3'-плечо гомологии могут быть укорочены, чтобы избежать включения определенных повторяющихся элементов последовательностей.

[0558] В некоторых вариантах осуществления в популяцию клеток можно вводить более одной донорной матрицы. В некоторых вариантах осуществления более чем одна донорная матрица являются разными, например, каждая донорная матрица содействует нокину последовательностей "грузов", кодирующих разные представляющие интерес продукты генов. В некоторых вариантах осуществления более чем одна донорная матрица могут быть предоставлены одновременно, а их нагрузки могут быть включены в состав одного и того же существенного гена (например, одна может быть включена в состав одного аллеля, а другая может быть включена в состав другого аллеля). В некоторых вариантах осуществления это может быть особенно преимущественно, если конкретная трансгенная система и/или представляющий интерес продукт гена имеют функциональные последовательности, которые требуют их разделения в разные аллели существенного гена. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления наличие нескольких копий представляющих интерес генов-мишеней, которые отличаются друг от друга, но выполняют сходное назначение, например, наличие копий переключателей безопасности, может быть полезным для обеспечения функциональности и получения соответствующего фенотипа. В некоторых вариантах осуществления более чем одна копия переключателя безопасности может обеспечивать устранение клеток, когда это необходимо. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления требуется димеризация определенных переключателей безопасности для их функционирования в качестве системы "суицидального" переключателя (например, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления, когда в популяцию клеток вводят более одной донорной матрицы, такие донорные матрицы могут быть предназначены для интеграции в один и тот же генетический локус или в разные генетические локусы.

[0559] Донорная матрица может представлять собой вектор на основе нуклеиновой кислоты, такой как вирусный геном или кольцевая двухнитевая ДНК, например, плазмида. Векторы на основе нуклеиновых кислот, содержащие донорные матрицы, могут содержать другие кодирующие или некодирующие элементы. Например, донорная нуклеиновая кислота-матрица может быть доставленав качестве части вирусного генома (например, в геноме AAV, аденовируса, вируса Сендай или лентивируса), который содержит определенные элементы остова генома (например, инвертированные концевые повторы в случае генома AAV). В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержится в плазмиде, которая не была линеаризована. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержится в плазмиде, которая была линеаризована. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержится в линейном фрагменте dsDNA. В некоторых вариантах осуществления донорная нуклеиновая кислота-матрица может быть доставлена в качестве части генома AAV. В некоторых вариантах осуществления донорная нуклеиновая кислота-матрица может быть доставлена в виде донорного однонитевого олигонуклеотида (ssODN), например, в виде длинного ssODN из нескольких т. о., полученного в результате синтеза в фаге m13, или в качестве альтернативы в виде коротких ssODN, например, содержащих небольшие представляющие интерес гены, метки и/или зонды. В некоторых вариантах осуществления донорная нуклеиновая кислота-матрица может быть доставлена в виде ДНК-матрицы Doggybone™ (dbDNA™). В некоторых вариантах осуществления донорная нуклеиновая кислота-матрица может быть доставлена в виде миникольцевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления донорная нуклеиновая кислота-матрица может быть доставлена в виде лентивирусной частицы, дефектной по интеграции (IDLV). В некоторых вариантах осуществления донорная нуклеиновая кислота-матрица может быть доставлена в виде ретровируса, полученного из MMLV. В некоторых вариантах осуществления донорная нуклеиновая кислота-матрица может быть доставлена в виде последовательности piggyBac™. В некоторых вариантах осуществления донорная нуклеиновая кислота-матрица может быть доставлена в виде реплицирующейся эписомы EBNA1.

[0560] В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии может иметь длину от приблизительно 25 до приблизительно 1000 пар оснований, например, иметь длину по меньшей мере приблизительно 100, 200, 400, 600 или 800 пар оснований. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит приблизительно 50-800 пар оснований, например, 100-800, 200-800, 400-800, 400-600 или 600-800 пар оснований. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии может иметь длину от приблизительно 25 до приблизительно 1000 пар оснований, например, иметь длину по меньшей мере приблизительно 100, 200, 400, 600 или 800 пар оснований. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит приблизительно 50-800 пар оснований, например, 100-800, 200-800, 400-800, 400-600 или 600-800 пар оснований. В определенных вариантах осуществления 5'- и 3'-плечи гомологии симметричны по длине. В определенных вариантах осуществления 5'- и 3'-плечи гомологии асимметричны по длине.

[0561] В определенных вариантах осуществления длина 5'-плеча гомологии составляет менее чем приблизительно 3000 пар оснований, менее чем приблизительно 2900 пар оснований, менее чем приблизительно 2800 пар оснований, менее чем приблизительно 2700 пар оснований, менее чем приблизительно 2600 пар оснований, менее чем приблизительно 2500 пар оснований, менее чем приблизительно 2400 пар оснований, менее чем приблизительно 2300 пар оснований, менее чем приблизительно 2200 пар оснований, менее чем приблизительно 2100 пар оснований, менее чем приблизительно 2000 пар оснований, менее чем приблизительно 1900 пар оснований, менее чем

приблизительно 1800 пар оснований, менее чем приблизительно 1700 пар оснований, менее чем приблизительно 1600 пар оснований, менее чем приблизительно 1500 пар оснований, менее чем приблизительно 1400 пар оснований, менее чем приблизительно 1300 пар оснований, менее чем приблизительно 1200 пар оснований, менее чем приблизительно 1100 пар оснований, менее чем приблизительно 1000 пар оснований, менее чем приблизительно 900 пар оснований, менее чем приблизительно 800 пар оснований, менее чем приблизительно 700 пар оснований, менее чем приблизительно 600 пар оснований, менее чем приблизительно 500 пар оснований или менее чем приблизительно 400 пар оснований.

[0562] В определенных вариантах осуществления, например, если для введения нокин-кассеты посредством способа, описанного в данном документе, используется вирусный вектор, длина 5'-плеча гомологии составляет менее чем приблизительно 1000 пар оснований, менее чем приблизительно 900 пар оснований, менее чем приблизительно 800 пар оснований, менее чем приблизительно 700 пар оснований, менее чем приблизительно 600 пар оснований, менее чем приблизительно 500 пар оснований, менее чем приблизительно 400 пар оснований или менее чем приблизительно 300 пар оснований. В определенных вариантах осуществления, например, если для введения нокин-кассеты посредством способа, описанного в данном документе, используется вирусный вектор, длина 5'-плеча гомологии составляет приблизительно 400-600 пар оснований, например, приблизительно 500 пар оснований.

[0563] В определенных вариантах осуществления длина 3'-плеча гомологии составляет менее чем приблизительно 3000 пар оснований, менее чем приблизительно 2900 пар оснований, менее чем приблизительно 2800 пар оснований, менее чем приблизительно 2700 пар оснований, менее чем приблизительно 2600 пар оснований, менее чем приблизительно 2500 пар оснований, менее чем приблизительно 2400 пар оснований, менее чем приблизительно 2300 пар оснований, менее чем приблизительно 2200 пар оснований, менее чем приблизительно 2100 пар оснований, менее чем приблизительно 2000 пар оснований, менее чем приблизительно 1900 пар оснований, менее чем приблизительно 1800 пар оснований, менее чем приблизительно 1700 пар оснований, менее чем приблизительно 1600 пар оснований, менее чем приблизительно 1500 пар оснований, менее чем приблизительно 1400 пар оснований, менее чем приблизительно 1300 пар оснований, менее чем приблизительно 1200 пар оснований, менее чем приблизительно 1100 пар оснований, менее чем приблизительно 1000 пар оснований, менее чем приблизительно 900 пар оснований, менее чем приблизительно 800 пар оснований, менее чем приблизительно 700 пар оснований, менее чем приблизительно 600 пар оснований, менее чем приблизительно 500 пар оснований или менее чем приблизительно 400 пар оснований.

[0564] В определенных вариантах осуществления, например, если для введения нокин-кассеты посредством способа, описанного в данном документе, используется вирусный вектор, длина 3'-плеча гомологии составляет менее чем приблизительно 1000 пар оснований, менее чем приблизительно 900 пар оснований, менее чем приблизительно 800 пар оснований, менее чем приблизительно 700 пар оснований, менее чем приблизительно 600 пар оснований, менее чем приблизительно 500 пар оснований, менее чем приблизительно 400 пар оснований или менее чем приблизительно 300 пар оснований. В определенных вариантах осуществления, например, если для введения нокин-кассеты посредством способа, описанного в данном документе, используется вирусный вектор, длина 3'-плеча гомологии составляет приблизительно 400-600 пар оснований, например, приблизительно 500 пар оснований.

[0565] В определенных вариантах осуществления 5'- и 3'-плечи гомологии фланкируют разрыв и находятся на расстоянии менее 100, 75, 50, 25, 15, 10 или 5 пар оснований от края разрыва. В определенных вариантах осуществления 5'- и 3'-плечи гомологии фланкируют эндогенный стоп-кодон. В определенных вариантах осуществления 5'- и 3'-плечи гомологии фланкируют разрыв, расположенный в пределах приблизительно 500 пар оснований (например, приблизительно 500 пар оснований, приблизительно 450 пар оснований, приблизительно 400 пар оснований, приблизительно 350 пар оснований, приблизительно 300 пар оснований, приблизительно 250 пар оснований, приблизительно 200 пар оснований, приблизительно 150 пар оснований, приблизительно 100 пар оснований, приблизительно 50 пар оснований или приблизительно 25 пар оснований) выше (с 5'-стороны от) эндогенного стоп-кодона, например, стоп-кодона существенного гена. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии охватывает край разрыва.

Нокин-кассета

[0566] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета в пределах донорной матрицы содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета в пределах донорной матрицы содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и выше нее (с 5'-стороны от нее). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой мультицистронную нокин-кассету. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета представляет собой бицистронную нокин-кассету. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

[0567] В некоторых вариантах осуществления на один локус существенного гена будут нацелены две нокин-кассеты, содержащие разные последовательности "грузов". В некоторых вариантах осуществления в один аллель будет включена одна нокин-кассета, тогда как в другой аллель будет включена другая нокин-кассета. В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемая для получения соответствующего разрыва ДНК, может быть одинаковой для каждой из двух разных нокин-кассет. В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемые для получения соответствующих разрывов ДНК, могут быть разными для каждой из двух разных нокин-кассет, так что последовательность "груза" включается в разных положениях для каждого аллеля. В некоторых вариантах осуществления такие разные положения для каждого аллеля могут по-прежнему находиться в пределах кодирующей области последнего экзона. В некоторых вариантах осуществления такие разные положения для каждого аллеля могут находиться в пределах кодирующей области предпоследнего (второго с конца) экзона и/или последнего (конечного) экзона. В некоторых вариантах осуществления такие разные положения для по меньшей мере одного из аллелей могут находиться в пределах первого экзона. В некоторых вариантах осуществления такие разные положения для по меньшей мере одного из аллелей могут находиться в пределах первого или второго экзона.

[0568] Чтобы должным образом восстановить кодирующую область существенного гена в генетически модифицированной клетке (так, чтобы был получен функционирующий продукт гена), нокин-кассета не должна содержать экзогенную кодирующую последовательность, которая соответствует всей

кодирующей последовательности существенного гена. Действительно, в зависимости от местоположения разрыва в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена может быть возможным восстановление существенного гена путем предоставления нокин-кассеты, которая содержит частичную кодирующую последовательность существенного гена, например, которая соответствует части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, которая охватывает разрыв и всю область ниже разрыва (кроме стоп-кодона), и/или которая соответствует части эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, которая охватывает разрыв и всю область выше разрыва (вплоть до стартового кодона и необязательно включая его).

[0569] Для того чтобы свести к минимуму размер нокин-кассеты, в некоторых вариантах осуществления фактически может быть преимущественно, чтобы разрыв располагался в пределах последних 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, т. е. в направлении 3'-конца кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления местоположение пары оснований в кодирующей последовательности может быть определено в направлении 3'-5' от эндогенного стоп-сигнала трансляции (например, стоп-кодона). В некоторых вариантах осуществления используемый в данном документе термин "эндогенная кодирующая последовательность" может включать как экзонные, так и интронные пары оснований и относится к последовательности гена, находящейся с 5'-стороны от эндогенного функционального стоп-сигнала трансляции. В некоторых вариантах осуществления разрыв в пределах эндогенной кодирующей последовательности включает разрыв в пределах одной нити ДНК. В некоторых вариантах осуществления разрыв в пределах эндогенной кодирующей последовательности включает разрыв в пределах обеих нитей ДНК. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 1000 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 750 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 600 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 500 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 400 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 300 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 250 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 150 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 100 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 75 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последних 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах последней 21 пары оснований эндогенной кодирующей последовательности.

[0570] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого

существенным геном, например, фрагмент длиной менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете является кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете является кодон-оптимизированной с устранением по меньшей мере одного сайта PAM. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете является кодон-оптимизированной с устранением более одного сайта PAM. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете является кодон-оптимизированной для устранения всех имеющих значение нуклеазоспецифических сайтов PAM. В некоторых вариантах осуществления длина С-концевого фрагмента белка, кодируемого существенным геном, составляет приблизительно 140 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина С-концевого фрагмента белка, кодируемого существенным геном, составляет приблизительно 130 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина С-концевого фрагмента белка, кодируемого существенным геном, составляет приблизительно 120 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 1 экзона существенного гена. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 2 экзонов существенного гена. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 3 экзонов существенного гена. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 4 экзонов существенного гена. В некоторых вариантах осуществления С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 5 экзонов существенного гена.

[0571] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, например, фрагмент длиной менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 19 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 17 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная

кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 1 аминокислота.

[0572] В некоторых вариантах осуществления, например, если существенный ген содержит много экзонов, как показано в иллюстративном способе на фиг. 3А, может быть преимущественно, чтобы разрыв располагался в пределах последнего экзона существенного гена. В некоторых вариантах осуществления, например, если существенный ген содержит много экзонов, как показано в иллюстративном способе на фиг. 3А, может быть преимущественно, чтобы разрыв располагался в пределах предпоследнего экзона существенного гена. Однако следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным местоположением разрыва и что доступные положения будут варьироваться в зависимости от природы и длины существенного гена и длины экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена. Например, для существенных генов, которые содержат несколько экзонов, или если представляющий интерес продукт гена является небольшим, может быть возможным расположение разрыва в вышерасположенном экзоне.

[0573] Для того чтобы свести к минимуму размер нокин-кассеты, в некоторых вариантах осуществления фактически может быть преимущественно, чтобы разрыв располагался в пределах первых 1500, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, т. е. начиная от 5'-конца кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления местоположение пары оснований в кодирующей последовательности может быть определено в направлении 5'-3' от эндогенного стартового сигнала трансляции (например, стартового кодона). В некоторых вариантах осуществления используемый в данном документе термин "эндогенная кодирующая последовательность" может включать как экзонные, так и интронные пары оснований и относится к последовательности гена, находящейся с 3'-стороны от эндогенного функционального стартового сигнала трансляции. В некоторых вариантах осуществления разрыв в пределах эндогенной кодирующей последовательности включает разрыв в пределах одной нити ДНК. В некоторых вариантах осуществления разрыв в пределах эндогенной кодирующей последовательности включает разрыв в пределах обеих нитей ДНК. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 1000 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 750 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 600 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 500 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 400 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 300 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 250 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 200 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 150 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 100 пар оснований эндогенной кодирующей

последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 75 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первых 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления разрыв расположен в пределах первой 21 пары оснований эндогенной кодирующей последовательности.

[0574] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, например, фрагмент длиной менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина N-концевого фрагмента белка, кодируемого существенным геном, составляет приблизительно 140 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина N-концевого фрагмента белка, кодируемого существенным геном, составляет приблизительно 130 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина N-концевого фрагмента белка, кодируемого существенным геном, составляет приблизительно 120 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления N-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв. В некоторых вариантах осуществления N-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 1 экзона существенного гена. В некоторых вариантах осуществления N-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 2 экзонов существенного гена. В некоторых вариантах осуществления N-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 3 экзонов существенного гена. В некоторых вариантах осуществления N-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 4 экзонов существенного гена. В некоторых вариантах осуществления N-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности в пределах 5 экзонов существенного гена.

[0575] В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, например, фрагмент длиной менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 19 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 17 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в

нокин-кассете кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 1 аминокислота.

[0576] В некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, например, идентична менее чем на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% или менее чем на 50% (т. е. при выравнивании двух последовательностей с помощью стандартного инструмента для попарного выравнивания последовательностей, который доводит до максимума выравнивание между соответствующими последовательностями). Например, в некоторых вариантах осуществления экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете является кодон-оптимизированной относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, например, для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью. В качестве альтернативы или дополнительно она может быть кодон-оптимизирована с уменьшением вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки и/или с увеличением экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

[0577] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит один или несколько нуклеотидов или пар оснований, которые отличаются от эндогенного сайта нокина (например, представляют собой мутации). В некоторых вариантах осуществления такие мутации в нокин-кассете обеспечивают устойчивость к разрезанию нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления такие мутации в нокин-кассете предотвращают разрезание нуклеазой локусов-мишеней после гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления такие мутации в нокин-кассете имеют место в одной или нескольких кодирующих и/или некодирующих областях гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления такие мутации в нокин-кассете представляют собой молчащие мутации. В некоторых вариантах осуществления такие мутации в нокин-кассете представляют собой молчащие и/или миссенс-мутации.

[0578] В некоторых вариантах осуществления такие мутации в нокин-кассете имеют место в пределах протоспейсерного мотива-мишени и/или сайта-мишени, представляющего собой мотив, прилегающий к протоспейсеру (PAM). В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит протоспейсерный мотив-мишень и/или сайт PAM, насыщенные молчащими мутациями. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит протоспейсерный мотив-мишень и/или сайт PAM, которые на примерно 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% насыщены молчащими мутациями. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит протоспейсерный мотив-мишень и/или сайт PAM, насыщенные молчащими и/или миссенс-мутациями. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит протоспейсерный мотив-мишень и/или сайт PAM, которые содержат по меньшей мере одну мутацию, по меньшей мере 2 мутации, по меньшей мере 3 мутации, по меньшей мере 4 мутации, по меньшей мере 5 мутаций, по меньшей мере 6 мутаций, по меньшей мере 7 мутаций, по меньшей мере 8 мутаций, по меньшей мере 9 мутаций, по меньшей мере 10 мутаций, по меньшей мере 11 мутаций, по меньшей мере 12 мутаций, по меньшей мере 13 мутаций, по меньшей мере 14 мутаций или по меньшей мере 15 мутаций.

[0579] В некоторых вариантах осуществления определенные кодоны, кодирующие определенные аминокислоты в сайте-мишени, не могут быть подвергнуты мутации путем оптимизации кодонов без потери некоторой части естественной функции эндогенных белков. В некоторых вариантах осуществления определенные кодоны, кодирующие определенные аминокислоты в сайте-мишени, не могут быть подвергнуты мутации путем оптимизации кодонов.

[0580] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета является кодон-оптимизированной только в части кодирующей последовательности. Например, в некоторых вариантах осуществления нокин-кассета кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, например, фрагмент длиной менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 19 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 17 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 14 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 12 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 11 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 9 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная

кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 5 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной менее 5 аминокислот.

[0581] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета является кодон-оптимизированной только в части кодирующей последовательности. Например, в некоторых вариантах осуществления нокин-кассета кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, например, фрагмент длиной менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 19 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 17 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 14 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 12 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления

экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 11 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 9 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной 5 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете, которая была кодон-оптимизирована, кодирует N-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном, длиной менее 5 аминокислот.

[0582] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит одну или несколько последовательностей, кодирующих линкерный пептид, например, между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и последовательностью "груза" и/или регуляторным элементом, описанными в данном документе. Такие линкерные пептиды известны из уровня техники, и любой из них может быть включен в нокин-кассету, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

[0583] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит другие регуляторные элементы, такие как последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена. Если присутствует последовательность 3'-UTR, последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

[0584] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит другие регуляторные элементы, такие как 5'-UTR и стартовый кодон, расположенные выше экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена. Если присутствует последовательность 5'-UTR, последовательность 5'-UTR расположена с 5'-стороны от последовательности "груза" и/или экзогенной кодирующей последовательности.

Иллюстративные плечи гомологии (HA)

[0585] В определенных вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'- и/или 3'-плечи гомологии, гомологичные области локуса *GAPDH*. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность под SEQ ID NO: 1, 2 или 3 или состоящее из нее. В некоторых вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность под SEQ ID NO: 4 или 5 или состоящее из нее. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 4 или 5.

[0586] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 1, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 2, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 3, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 5.

[0587] В некоторых вариантах осуществления отрезок последовательности, фланкирующий сайт расщепления нуклеазой, может дуплицироваться как в 5'-, так и в 3'-плече гомологии. В некоторых вариантах осуществления такая дупликация предназначена для оптимизации эффективности HDR. В некоторых вариантах осуществления одна из дуплицированных последовательностей может быть кодон-оптимизированной, тогда как другая последовательность не является кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах осуществления обе дуплицированные последовательности могут быть кодон-оптимизированными. В некоторых вариантах осуществления оптимизация кодонов может приводить к удалению сайта-мишени PAM. В некоторых вариантах осуществления дуплицированная последовательность может составлять не более 100 п. о. в длину, 90 п. о. в длину, 80 п. о. в длину, 70 п. о. в длину, 60 п. о. в длину, 50 п. о. в длину, 40 п. о. в длину, 30 п. о. в длину или 20 п. о. в длину.

SEQ ID NO: 1 - иллюстративное 5'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAG

SEQ ID NO: 2 - иллюстративное 5'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC

TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCT

SEQ ID NO: 3 - иллюстративное 5'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *GAPDH*
GGCTTTCCCATAATTTCCTTTCAAGGTGGGGAGGGAGGTAGAGGGGTGATGTGGGGAGTACGCTGCAG
GGCCTCACTCCTTTTGCAGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCT
CCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCC
AAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCAC
TGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGA
AGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGT
CTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGA
CCACTTTGTCAAGCTCATCTCTTGGTACGACAATGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGAT
GGCTCATATGGCTAGCAAAGAG

SEQ ID NO: 4 - иллюстративное 3'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *GAPDH*
ATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGA
CCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACAC
TCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGG
GCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTG
TCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTG
GGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGA
ACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAG
GCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 5 - иллюстративное 3'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *GAPDH*
AGACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACA
ACTCTTTTCATCTTCTAGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCC
ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGA
GACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGT
TGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAA
GTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCT
GGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTA
GGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCT

[0588] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'- и/или 3'-плечи гомологии, гомологичные области локуса *TBP*. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность под SEQ ID NO: 6, 7 или 8 или состоящее из

нее. В некоторых вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность под SEQ ID NO: 9, 10 или 11 или состоящее из нее. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 9, 10 или 11.

[0589] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 6, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 7, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 8, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 11.

SEQ ID NO: 6 - иллюстративное 5'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *TBP*

GCAGACTTCCATTTACAGTGAGGAGGTGAGCATTGCATTGAACAAAAGATGGCGTTTTCACTTGGAAT
TAGTTATCTGAAGCTTTAGGATTCCTCAGCAATATGATTATGAGACAAGAAAGGAAGATTCAGAAATG
AGTCTAGTTGAAGGCAGCAATTCAGAGAAGAAGATTCAGTTGTTATCATTGCCGTCCTGCTTGGTTTAT
GGCCTGGTTCAGGACCAAGGAGAGAAGTGTGAATACATGCCTCTTGAGCTATAGAATGAGACGCTGG
AGTCACTAAGATGATTTTTTAAAAGTATTGTTTTATAAACAAAAATAAGATTGTGACAAGGGATTCCA
CTATTAATGTTTTCATGCCTGTGCCTTAATCTGACTGGGTATGGTGAGAATTGTGCTTGCAGCTTTAAG
GTAAGAATTTTACCATCTTAATATGTTAAGAAGTGCCATTTCAGTCTCTCATCTCTACTCCAACTTGTCT
TCTTAGGTGCTAAAGTCAGAGCCGAAATCTACGAGGCCTTCGAGAACATCTACCCCATCCTGAAGGGC
TTCAGAAAGACCACC

SEQ ID NO: 7 - иллюстративное 5'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *TBP*

CTGACCACAGCTCTGCAAGCAGACTTCCATTTACAGTGAGGAGGTGAGCATTGCATTGAACAAAAGAT
GGCGTTTTCACTTGGAATTAGTTATCTGAAGCTTTAGGATTCCTCAGCAATATGATTATGAGACAAGAA
AGGAAGATTCAGAAATGAGTCTAGTTGAAGGCAGCAATTCAGAGAAGAAGATTCAGTTGTTATCATTG
CCGTCCTGCTTGGTTTATGGCCTGGTTCAGGACCAAGGAGAGAAGTGTGAATACATGCCTCTTGAGCT
ATAGAATGAGACGCTGGAGTCACTAAGATGATTTTTTAAAAGTATTGTTTTATAAACAAAAATAAGAT
TGTGACAAGGGATTCCACTATTAATGTTTTCATGCCTGTGCCTTAATCTGACTGGGTATGGTGAGAATT
GTGCTTGCAGCTTTAAGGTAAGAATTTTACCATCTTAATATGTTAAGAAGTGCCATTTCAGTCTCTCAT
CTCTACTCCAACTTGTCTTCTTAGGGGCTAAAGTGCGGGCCGAGATCTACGAGGCCTTCGAGAATATCT
ACCCCATCCTGAAGGGCTTCAGAAAGACCACC

SEQ ID NO: 8 - иллюстративное 5'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *TBP*

ACAAAAGATGGCGTTTTCACTTGGAATTAGTTATCTGAAGCTTTAGGATTCCTCAGCAATATGATTATG
AGACAAGAAAGGAAGATTCAGAAATGAGTCTAGTTGAAGGCAGCAATTCAGAGAAGAAGATTCAGTT
GTTATCATTGCCGTCCTGCTTGGTTTATGGCCTGGTTCAGGACCAAGGAGAGAAGTGTGAATACATGC
CTCTTGAGCTATAGAATGAGACGCTGGAGTCACTAAGATGATTTTTTAAAAGTATTGTTTTATAAACAA
AAATAAGATTGTGACAAGGGATTCCACTATTAATGTTTTCATGCCTGTGCCTTAATCTGACTGGGTATG
GTGAGAATTGTGCTTGCAGCTTTAAGGTAAGAATTTTACCATCTTAATATGTTAAGAAGTGCCATTTCA

GTCTCTCATCTCTACTCCAACTTGTCTTCTTAGGTGCTAAAGTCAGAGCAGAAATTTATGAAGCATTCG
AGAACATCTACCCTATTCTAAAGGGATTCAGGAAGACGACG

SEQ ID NO: 9 - иллюстративное 3'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *TBP*
CAGAAATTTATGAAGCATTTGAAAACATCTACCCTATTCTAAAGGGATTCAGGAAGACGACGTAATGG
CTCTCATGTACCCTTGCCTCCCCCACCCCCTTCTTTTTTTTTTTTTTAAACAAATCAGTTTGTTTTGGTACC
TTTAAATGGTGGTGTTGTGAGAAGATGGATGTTGAGTTGCAGGGTGTGGCACCAGGTGATGCCCTTCT
GTAAGTGCCCACCGCGGGATGCCGGGAAGGGGCATTATTTGTGCACTGAGAACACCGCGCAGCGTGA
CTGTGAGTTGCTCATACCGTGCTGCTATCTGGGCAGCGCTGCCCATTTATTTATATGTAGATTTTAAAC
ACTGCTGTTGACAAGTTGGTTTGAGGGAGAAAACTTTAAGTGTTAAAGCCACCTCTATAATTGATTGG
ACTTTTTAATTTTAATGTTTTTCCCCATGAACCACAGTTTTTATATTTCTACCAGAAAAGTAAAAATCTT
TTTTAAAAGTGTTGTTTTT

SEQ ID NO: 10 - иллюстративное 3'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *TBP*
TAGGTGCTAAAGTCAGAGCAGAAATTTATGAAGCATTTGAAAACATCTACCCTATTCTAAAGGGATTC
AGGAAGACGACGTAATGGCTCTCATGTACCCTTGCCTCCCCCACCCCCTTCTTTTTTTTTTTTTTAAACAA
ATCAGTTTGTTTTGGTACCTTTAAATGGTGGTGTTGTGAGAAGATGGATGTTGAGTTGCAGGGTGTGGC
ACCAGGTGATGCCCTTCTGTAAGTGCCCACCGCGGGATGCCGGGAAGGGGCATTATTTGTGCACTGAG
AACACCGCGCAGCGTGACTGTGAGTTGCTCATACCGTGCTGCTATCTGGGCAGCGCTGCCCATTTATTT
ATATGTAGATTTTAAACACTGCTGTTGACAAGTTGGTTTGAGGGAGAAAACTTTAAGTGTTAAAGCCA
CCTCTATAATTGATTGGACTTTTTAATTTTAATGTTTTTCCCCATGAACCACAGTTTTTATATTTCTACC
AGAAAAGTAAAAATCTTT

SEQ ID NO: 11 - иллюстративное 3'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *TBP*
AAGGGATTCAGGAAGACGACGTAATGGCTCTCATGTACCCTTGCCTCCCCCACCCCCTTCTTTTTTTTT
TTTTAAACAAATCAGTTTGTTTTGGTACCTTTAAATGGTGGTGTTGTGAGAAGATGGATGTTGAGTTGC
AGGGTGTGGCACCAGGTGATGCCCTTCTGTAAGTGCCCACCGCGGGATGCCGGGAAGGGGCATTATTT
GTGCACTGAGAACACCGCGCAGCGTGACTGTGAGTTGCTCATACCGTGCTGCTATCTGGGCAGCGCTG
CCCATTTATTTATATGTAGATTTTAAACACTGCTGTTGACAAGTTGGTTTGAGGGAGAAAACTTTAAGT
GTTAAAGCCACCTCTATAATTGATTGGACTTTTTAATTTTAATGTTTTTCCCCATGAACCACAGTTTTTA
TATTTCTACCAGAAAAGTAAAAATCTTTTTTAAAAGTGTTGTTTTTCTAATTTATAACTCCTAGGGGTTA
TTTCTGTGCCAGACACA

[0590] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'- и/или 3'-плечи гомологии, гомологичные области локуса *G6PD*. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность под SEQ ID NO: 12 или состоящее из нее. В некоторых вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность под SEQ ID NO: 13 или состоящее из нее. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из

последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 13.

[0591] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 12, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 13.

SEQ ID NO: 12 - иллюстративное 5'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *G6PD*

GGCCCGGGGGACTCCACATGGTGGCAGGCAGTGGCATCAGCAAGACACTCTCTCCCTCACAGAACGT
GAAGCTCCCTGACGCCTATGAGCGCCTCATCCTGGACGTCTTCTGCGGGAGCCAGATGCACTTCGTGC
GCAGGTGAGGCCCAGCTGCCGGCCCCTGCATACCTGTGGGCTATGGGGTGGCCTTTGCCCTCCCTCCCT
GTGTGCCACCGGCCTCCCAAGCCATACCATGTCCCCTCAGCGACGAGCTCCGTGAGGCCTGGCGTATT
TTCACCCCACTGCTGCACCAGATTGAGCTGGAGAAGCCCAAGCCCATCCCCTATATTTATGGCAGGTG
AGGAAAGGGTGGGGGCTGGGGACAGAGCCCAGCGGGCAGGGGCGGGGTGAGGGTGGAGCTACCTCA
TGCCTCTCCTCCACCCGTCACTCTCCAGCCGAGGCCCCACGGAGGCAGACGAGCTGATGAAGAGAGTG
GGCTTCCAGTACGAGGGAACCTACAAATGGGTCAACCCTCACAAGCTG

SEQ ID NO: 13 - иллюстративное 3'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *G6PD*

GTGGGTGAACCCCCACAAGCTCTGAGCCCTGGGCACCCACCTCCACCCCCGCCACGGCCACCCTCCTT
CCCGCCGCCCGACCCCGAGTCGGGAGGACTCCGGGACCATTGACCTCAGCTGCACATTCCTGGCCCCG
GGCTCTGGCCACCCTGGCCCGCCCCTCGCTGCTGCTACTACCCGAGCCCAGCTACATTCCTCAGCTGCC
AAGCACTCGAGACCATCCTGGCCCCTCCAGACCCTGCCTGAGCCCAGGAGCTGAGTCACCTCCTCCAC
TCACTCCAGCCCAACAGAAGGAAGGAGGAGGGCGCCCATTCGTCTGTCCCAGAGCTTATTGGCCACTG
GGTCTCACTCCTGAGTGGGGCCAGGGTGGGAGGGAGGGACGAGGGGGAGGAAAGGGGCGAGCACCC
ACGTGAGAGAATCTGCCTGTGGCCTTGCCCGCCAGCCTCAGTGCCACTTGACATTCCTTGTCACCAGCA
ACATCTCGAGCCCCCTGGATGTCC

[0592] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'- и/или 3'-плечи гомологии, гомологичные области локуса *E2F4*. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность или состоящее из последовательности под SEQ ID NO: 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность или состоящее из последовательности под SEQ ID NO: 17, 18 или 19. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 17, 18 или 19.

[0593] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 14, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 15, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 16, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 19.

SEQ ID NO: 14 - иллюстративное 5'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *E2F4*

CCAGGGGGCTGTAGTGGGGCCAGGCTGGACCTCTGTGCCCTGAGCATGGCTTTCTTGTTTTTCAGTTTT
GGAACTCCCCAAAGAGCTGTCAGAAATCTTTGATCCCACACGAGGTAGGCTGCTGCATTCCTCCCTGA
GGCTAGGGGTAAGGGACACAGCTCATTGGGTCCTATGGCTGTTTTCTTGCCCTTTTGAGGACCTTGTTG
TGGCGCTTATGGTAACTGGGGCAAAGGGTGAAGTTCCTGATGGGCAGGTGGGGTTCCCTTTCCTGGGC
TTTGGTGGGTGGAGAGGTGGGAGCTGGAATGTTAGTAACTGAGCTCCCTCCATTCCCAGAGTGCATGA
GCTCGGAGCTGCTGGAGGAGTTGATGTCCTCAGAAGGTGGGTGGCCCTGGAAGGTGGGAGTGGGTGT
GGGCAGGGGTTGGGCTGCTGCTAGGGGAGCCCTGGCCCAGGGCCTGAGACTAGTGCTCTCTGCAGTGT
TCGCCCCTCTGCTGAGACTTTCTCCTCCTCCTGGCGACCACGACTACATCTACAACCTGGACGAGAGCG
AGGGCGTGTGCGACCTGTTTGATGTGCCCGTGCTGAACCTG

SEQ ID NO: 15 - иллюстративное 5'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *E2F4*
CCAGGCTGGACCTCTGTGCCCTGAGCATGGCTTTCTTGTTTTTCAGTTTTGGAACTCCCCAAAGAGCTG
TCAGAAATCTTTGATCCCACACGAGGTAGGCTGCTGCATTCCTCCCTGAGGCTAGGGGTAAGGGACAC
AGCTCATTGGGTCCTATGGCTGTTTTCTTGCCCTTTTGAGGACCTTGTTGTGGCGCTTATGGTAACTGGG
GCAAAGGGTGAAGTTCCTGATGGGCAGGTGGGGTTCCCTTTCCTGGGCTTTGGTGGGTGGAGAGGTGG
GAGCTGGAATGTTAGTAACTGAGCTCCCTCCATTCCCAGAGTGCATGAGCTCGGAGCTGCTGGAGGAG
TTGATGTCCTCAGAAGGTGGGTGGCCCTGGAAGGTGGGAGTGGGTGTGGGCAGGGGTTGGGCTGCTGC
TAGGGGAGCCCTGGCCCAGGGCCTGAGACTAGTGCTCTCTGCAGTGTTTGCCCCTCTGCTTCGTCTTAG
TCCTCCTCCGGGCGACCACGACTACATCTACAACCTGGACGAGAGCGAGGGCGTGTGCGACCTGTTTG
ATGTGCCCGTGCTGAACCTG

SEQ ID NO: 16 - иллюстративное 5'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *E2F4*
GTCAGAAATCTTTGATCCCACACGAGGTAGGCTGCTGCATTCCTCCCTGAGGCTAGGGGTAAGGGACA
CAGCTCATTGGGTCCTATGGCTGTTTTCTTGCCCTTTTGAGGACCTTGTTGTGGCGCTTATGGTAACTGG
GGCAAAGGGTGAAGTTCCTGATGGGCAGGTGGGGTTCCCTTTCCTGGGCTTTGGTGGGTGGAGAGGTG
GGAGCTGGAATGTTAGTAACTGAGCTCCCTCCATTCCCAGAGTGCATGAGCTCGGAGCTGCTGGAGGA
GTTGATGTCCTCAGAAGGTGGGTGGCCCTGGAAGGTGGGAGTGGGTGTGGGCAGGGGTTGGGCTGCT
GCTAGGGGAGCCCTGGCCCAGGGCCTGAGACTAGTGCTCTCTGCAGTGTTTGCCCCTCTGCTTCGTCTT
TCTCCACCCCCGGGAGACCACGATTATATCTACAACCTGGACGAGAGTGAAGGTGTCTGTGACCTCTT
CGACGTGCCCGTGCTCAACCTC

SEQ ID NO: 17 - иллюстративное 3'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *E2F4*
CCACCCCCGGGAGACCACGATTATATCTACAACCTGGACGAGAGTGAAGGTGTCTGTGACCTCTTTGA
TGTGCCTGTTCTCAACCTCTGACTGACAGGGACATGCCCTGTGTGGCTGGGACCCAGACTGTCTGACCT
GGGGGTTGCCTGGGGACCTCTCCCACCCGACCCCTACAGAGCTTGAGAGCCACAGACGCCTGGCTTCT
CCGGCCTCCCCTCACCGCACAGTTCTGGCCACAGCTCCCGCTCCTGTGCTGGCACTTCTGTGCTCGCAG
AGCAGGGGAACAGGACTCAGCCCCCATCACCGTGGAGCCAAAGTGTTTGCTTCTCCCTTTCTGCGGCC
TTCGCCAGCCCAGGCTCGGCTGCCACCCAGTGGCACAGAACCGAGGAGCTGCCATTACCCCCCATAGG
GGGCAGTGTCTTGTTCCTGCCAGCCTCAGTGTCTTGCTTCTGCCAGCTCCTTCCCCTAGGAGGGAAGGG
TGGGGTGGAACTGGGCACATG

SEQ ID NO: 18 - иллюстративное 3'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *E2F4*

ATTATATCTACAACCTGGACGAGAGTGAAGGTGTCTGTGACCTCTTTGATGTGCCTGTTCTCAACCTCT
GACTGACAGGGACATGCCCTGTGTGGCTGGGACCCAGACTGTCTGACCTGGGGGTTGCCTGGGGACCT
CTCCCACCCGACCCCTACAGAGCTTGAGAGCCACAGACGCCTGGCTTCTCCGGCCTCCCCTCACCGCA
CAGTTCTGGCCACAGCTCCCGCTCCTGTGCTGGCACTTCTGTGCTCGCAGAGCAGGGGAACAGGACTC
AGCCCCCATCACCGTGGAGCCAAAGTGTTTGCTTCTCCCTTTCTGCGGCCTTCGCCAGCCCAGGCTCGG
CTGCCACCCAGTGGCACAGAACCGAGGAGCTGCCATTACCCCCCATAGGGGGCAGTGTCTTGTTCCTG
CCAGCCTCAGTGTCTTGCTTCTGCCAGCTCCTTCCCCTAGGAGGGAAGGGTGGGGTGGAACTGGGCAC
ATGCCAGCACCACTTCTAGCTT

SEQ ID NO: 19 - иллюстративное 3'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *E2F4*

TGACTGACAGGGACATGCCCTGTGTGGCTGGGACCCAGACTGTCTGACCTGGGGGTTGCCTGGGGACC
TCTCCCACCCGACCCCTACAGAGCTTGAGAGCCACAGACGCCTGGCTTCTCCGGCCTCCCCTCACCGC
ACAGTTCTGGCCACAGCTCCCGCTCCTGTGCTGGCACTTCTGTGCTCGCAGAGCAGGGGAACAGGACT
CAGCCCCCATCACCGTGGAGCCAAAGTGTTTGCTTCTCCCTTTCTGCGGCCTTCGCCAGCCCAGGCTCG
GCTGCCACCCAGTGGCACAGAACCGAGGAGCTGCCATTACCCCCCATAGGGGGCAGTGTCTTGTTCCT
GCCAGCCTCAGTGTCTTGCTTCTGCCAGCTCCTTCCCCTAGGAGGGAAGGGTGGGGTGGAACTGGGCA
CATGCCAGCACCACTTCTAGCTTCCTTCGCTATCCCCCACCCCCTGACCCTCCAGCTCCTCCTGGCCCTC
TCACGTGCCCACTTCTGCTGG

[0594] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'- и/или 3'-плечи гомологии, гомологичные области локуса *KIF11*. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее последовательность или состоящее из последовательности под SEQ ID NO: 20, 21 или 22. В некоторых вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 20, 21 или 22. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 3'-плечо гомологии, содержащее последовательность или состоящее из последовательности под SEQ ID NO: 23, 24 или 25. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 23, 24 или 25.

[0595] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 20, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 21, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит 5'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 22, и 3'-плечо гомологии, содержащее SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 20 - иллюстративное 5'-НА для вставки нокин-кассеты в локус *KIF11*

AGAGCAGGGTTTCTTGACAGCAGTGCTATTGGCATTTTAAACTGGATAATTCTTTGTTGTGATGGGCTT
TCCTGTGGACTGTACTATGTTGGTACACAAGAAAAACAGTGTACTATGTGAATACTCACTCAAAGCCA
GTAGCACTCCCTGATTGTAACACCAAAAAAGTCTCTCAGCATTGCCAAATGTCCCCTGTGGCAGCAGA
ATCACTCCCTGATGAGAACCACTACCCTGGAGTAAAATCTATAACTATGTCTTAGAAAATAACACAGA
AAATTAATATTTCTTTCACTCTACTCCTTCCATTAGTGATCAAATAAAGAAGGCATTTGGCGCTACTTG

CCAAATTGTTGGCTCAAACTTGTGCTGAACCTTTTTTGGTTTTCTACACTTAAGTTTTTTTGCCTATAAC
CCAGAGAACTTTGAAAATAGAGTGTAGTTAATGTGTATCTAATGTTACTTTGTATTGACTTAATTTACC
GGCCTTTAATCCACAGCATAAGAAGTCCCACGGCAAGGACAAAGAGAACCGGGGCATCAACACACTG
GAACGGTCCAAGGTCGAGGAAACAACCGAGCACCTGGTCACCAAGAGCAGACTGCCTCTGAGAGCCC
AGATCAACCTG

SEQ ID NO: 21 - иллюстративное 5'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *KIF11*
TTCCTGTGGACTGTACTATGTTGGTACACAAGAAAAACAGTGTACTATGTGAATACTCACTCAAAGCC
AGTAGCACTCCCTGATTGTAACACCAAAAAAGTCTCTCAGCATTGCCAAATGTCCCCTGTGGCAGCAG
AATCACTCCCTGATGAGAACCACTACCCTGGAGTAAAATCTATAACTATGTCTTAGAAAATAACACAG
AAAATTAATATTTCTTTCACTCTACTCCTTCCATTAGTGATCAAATAAAGAAGGCATTTGGCGCTACTT
GCCAAATTGTTGGCTCAAACTTGTGCTGAACCTTTTTTGGTTTTCTACACTTAAGTTTTTTTGCCTATAA
CCCAGAGAACTTTGAAAATAGAGTGTAGTTAATGTGTATCTAATGTTACTTTGTATTGACTTAATTTTC
CCGCCTTAAATCCACAGCATAAAAAATCACATGGAAAAGACAAAGAAAACAGAGGCATTAACACACT
GGAGAGGTCTAAAGTGGAAGAAACAACCGAGCACCTGGTCACCAAGAGCAGACTGCCTCTGAGAGCC
CAGATCAACCTG

SEQ ID NO: 22 - иллюстративное 5'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *KIF11*
TTAAACTGGATAATTCTTTGTTGTGATGGGCTTTCCTGTGGACTGTACTATGTTGGTACACAAGAAAAA
CAGTGTACTATGTGAATACTCACTCAAAGCCAGTAGCACTCCCTGATTGTAACACCAAAAAAGTCTCT
CAGCATTGCCAAATGTCCCCTGTGGCAGCAGAATCACTCCCTGATGAGAACCACTACCCTGGAGTAAA
ATCTATAACTATGTCTTAGAAAATAACACAGAAAATTAATATTTCTTTCACTCTACTCCTTCCATTAGT
GATCAAATAAAGAAGGCATTTGGCGCTACTTGCCAAATTGTTGGCTCAAACTTGTGCTGAACCTTTTTT
GGTTTTCTACACTTAAGTTTTTTTGCCTATAACCCAGAGAACTTTGAAAATAGAGTGTAGTTAATGTGT
ATCTAATGTTACTTTGTATTGACTTAATTTTCCCGCCTTAAATCCACAGCATAAAAAATCACATGGAAA
AGACAAAGAAAACAGAGGCATCAACACACTGGAACGGTCCAAGGTCGAGGAAACAACCGAGCACCT
GGTCACCAAGAGCAGACTGCCTCTGAGAGCCCAGATCAACCTG

SEQ ID NO: 23 - иллюстративное 3'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *KIF11*
AAAAAATCACATGGAAAAGACAAAGAAAACAGAGGCATTAACACACTGGAGAGGTCTAAAGTGGAA
GAAACTACAGAGCACTTGGTTACAAAGAGCAGATTACCTCTGCGAGCCCAGATCAACCTTTAATTCAC
TTGGGGGTTGGCAATTTTATTTTTAAAGAAAACTTAAAAATAAAACCTGAAACCCCAGAACTTGAGCC
TTGTGTATAGATTTTAAAAGAATATATATATCAGCCGGGCGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCA
CTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATTGCTTGAGCCCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGCA
AAACCTCGTCTCTGTTAAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCACACTCCTGTAATCCCAGCTACTGGGGAG
GCTGAGGCACGAGAATCACTTGAACCCAGGAAGCGGGGTTGCAGTGAGCCAAAGGTACACCACTACA
CTCCAGCCTGGGCAACAGAGCAAGACT

SEQ ID NO: 24 - иллюстративное 3'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *KIF11*
AACTACAGAGCACTTGGCTACATAGAGCAGATTACCTCTGCGAGCCCAGATCAACCTTTAATTCACTT
GGGGGTTGGCAATTTTATTTTTAAAGAAAACTTAAAAATAAAACCTGAAACCCCAGAACTTGAGCCTT

GTGTATAGATTTTAAAAGAATATATATATCAGCCGGGCGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACT
TTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATTGCTTGAGCCCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGCAA
AACCTCGTCTCTGTTAAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCACACTCCTGTAATCCCAGCTACTGGGGAGG
CTGAGGCACGAGAATCACTTGAACCCAGGAAGCGGGGTTGCAGTGAGCCAAAGGTACACCACTACAC
TCCAGCCTGGGCAACAGAGCAAGACTCGGTCTCAAAAACAAAATTTAAAAAAGATATAAGGCAGTAC
TGTAAATTCAGTTGAATTTTGATATCT

SEQ ID NO: 25 - иллюстративное 3'-HA для вставки нокин-кассеты в локус *KIF11*
ATTAACACACTGGAGAGTTCTGAAGTGGAAGAAACTACAGAGCACTTGGTTACAAAGAGCAGATTAC
CTCTGCGAGCCCAGATCAACCTTTAATTCACTTGGGGGTTGGCAATTTTATTTTTAAAGAAAACTTAAA
AATAAAACCTGAAACCCCAGAACTTGAGCCTTGTGTATAGATTTTAAAAGAATATATATATCAGCCGG
GCGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATTGCTTGAGCCCAG
GAGTTTGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGCAAAACCTCGTCTCTGTTAAAAATTAGCCGGGCGTGGTGG
CACACTCCTGTAATCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCACGAGAATCACTTGAACCCAGGAAGCGGG
GTTGCAGTGAGCCAAAGGTACACCACTACACTCCAGCCTGGGCAACAGAGCAAGACTCGGTCTCAAA
AACAAAATTTAAAAAAGATATAAGGC

Инвертированные концевые повторы (ITR)

[0596] В определенных вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность, полученную из AAV. В определенных вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательности, полученные из AAV, типичные для конструкции AAV, такие как цис-действующие 5'- и 3'-инвертированные концевые повторы (ITR) (см., например, B. J. Carter, в "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Как правило, ITR способны образовывать шпильку. Способность образовывать шпильку может содействовать способности ITR к самопраймированию, обеспечивая возможность синтеза второй нити ДНК, независимого от праймазы. ITR также играют роль в интеграции конструкции AAV (например, кодирующей последовательности) в геном клетки-мишени. ITR также могут способствовать эффективному инкапсулированию конструкции AAV в частице AAV.

[0597] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица, описанная в данном документе, включена в частицу rAAV (например, частицу AAV6). В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой приблизительно 145 нуклеиновых кислот или содержит их. В некоторых вариантах осуществления используется вся или практически вся последовательность, кодирующая ITR. В некоторых вариантах осуществления последовательность ITR AAV может быть получена из любого известного AAV, включая идентифицированные в настоящее время типы AAV млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой ITR AAV6.

[0598] Пример конструкции AAV, используемой в настоящем изобретении, представляет собой "цис-действующую" конструкцию, содержащую последовательность груза (например, донорную матрицу, описанную в данном документе), в которой донорная матрица фланкирована 5'- или "левой" и 3'- или "правой" последовательностями ITR AAV. Обозначения 5' и "левая" относятся к положению последовательности ITR относительно всей конструкции при прочтении слева направо в смысловом направлении. Например, в некоторых вариантах осуществления 5'- или левый ITR представляет собой ITR,

наиболее близкий к промотору локусов-мишеней (в отличие от последовательности полиаденилирования) для данной конструкции, если конструкция изображена линейно в смысловой ориентации. Вместе с тем обозначения 3' и "правая" относятся к положению последовательности ITR относительно всей конструкции при прочтении слева направо в смысловом направлении. Например, в некоторых вариантах осуществления 3'- или правый ITR представляет собой ITR, наиболее близкий к последовательности полиаденилирования в локусах-мишенях (в отличие от промоторной последовательности) для данной конструкции, если конструкция изображена линейно в смысловой ориентации. ITR, предусмотренные в данном документе, изображены в порядке 5'-3' в соответствии со смысловой нитью. Соответственно, специалисту в данной области будет понятно, что ITR в 5'- или "левой" ориентации также может быть изображен как 3'- или "правый" ITR при преобразовании из смыслового в антисмысловое направление. Кроме того, вполне в компетенции специалиста в данной области находится преобразование данной смысловой последовательности ITR (например, 5'-/левой последовательности ITR AAV) в антисмысловую последовательность (например, 3'-/правую последовательность ITR). Среднему специалисту в данной области будет понятно, как модифицировать данную последовательность ITR для использования в качестве 5'-/левого или 3'-/правого ITR либо их антисмысловой версии.

[0599] Например, в некоторых вариантах осуществления ITR (например, 5'-ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 158. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 3'-ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 159. В некоторых вариантах осуществления ITR содержит одну или несколько модификаций, например, усечения, делеции, замены или вставки, как известно из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления ITR содержит менее 145 нуклеотидов, например, 127, 130, 134 или 141 нуклеотид. Например, в некоторых вариантах осуществления ITR содержит 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144 или 145 нуклеотидов.

[0600] Неограничивающий пример последовательностей 5'-ITR AAV включает SEQ ID NO: 158. Неограничивающий пример последовательностей 3'-ITR AAV включает SEQ ID NO: 159. В некоторых вариантах осуществления 5'- и 3'-ITR AAV (например, под SEQ ID NO: 158 и 159) фланкируют донорную матрицу, описанную в данном документе (например, донорную матрицу, содержащую 5'-HA, нокин-кассету и 3'-HA). Способность модифицировать последовательности ITR находится в пределах компетенции специалистов в данной области. (См., например, такие учебники, как Sambrook et al. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al., J Virol., 70:520 532 (1996), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления последовательность 5'-ITR на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности 5'-ITR, представленной под SEQ ID NO: 158. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-ITR на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности 3'-ITR, представленной под SEQ ID NO: 159.

SEQ ID NO: 158 - иллюстративная последовательность 5'-ITR для вставки нокин-кассеты

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG
GGTTCCT

SEQ ID NO: 159 - иллюстративная последовательность 3'-ITR для вставки нокин-кассеты

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA
CCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCC
TGCAGG

Фланкирующие нетранслируемые области 5'-UTR и 3'-UTR

[0601] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета, описанная в данном документе, содержит всю нетранслируемую область (UTR), такую как 5'-UTR и/или 3'-UTR, или ее часть. UTR гена транскрибируются, но не транслируются. 5'-UTR начинается с сайта начала транскрипции и продолжается до стартового кодона, но не содержит стартовый кодон. 3'-UTR начинается сразу после стоп-кодона и продолжается до сигнала терминации транскрипции. Регуляторные и/или контрольные признаки UTR могут быть включены в состав любой из нокин-кассет, описанных в данном документе, для усиления или модулирования иным образом экспрессии локусов существенных генов-мишеней и/или последовательности груза.

[0602] Природные 5'-UTR содержат последовательность, которая играет роль в инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR содержит последовательности, такие как последовательности Козак, которые, как общеизвестно, участвуют в процессе, посредством которого рибосома инициирует трансляцию многих генов. Последовательности Козак имеют консенсусную последовательность CCR(A/G)CCAUGG, где R представляет собой пурин (A или G) на три основания выше стартового кодона (AUG), а за стартовым кодоном следует еще один "G". Также известно, что 5'-UTR образуют вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации. Неограничивающие примеры 5'-UTR включают 5'-UTR из следующих генов: альбумина, сывороточного амилоида A, аполипопротеина A/B/E, трансферрина, альфа-фетопротеина, эритропоэтина и фактора VIII.

[0603] В некоторых вариантах осуществления UTR может содержать неэндогенную регуляторную область. В некоторых вариантах осуществления UTR, который содержит неэндогенную регуляторную область, представляет собой 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления UTR, который содержит неэндогенную регуляторную область, представляет собой 5'-UTR. В некоторых вариантах осуществления неэндогенная регуляторная область может представлять собой мишень для по меньшей мере одной ингибирующей нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию и/или активность гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой малую интерферирующую РНК (siRNA), малую шпилечную РНК (shRNA), микроРНК (miRNA), антисмысловой олигонуклеотид, направляющую РНК (gRNA) или рибозим. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой эндогенную молекулу. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой неэндогенную молекулу. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота демонстрирует тканеспецифический паттерн экспрессии. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота демонстрирует клеточноспецифический паттерн экспрессии.

[0604] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета может содержать более одной неэндогенной регуляторной области, например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять регуляторных областей. В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета может содержать четыре неэндогенные регуляторные области. В некоторых вариантах осуществления конструкция может

содержать более одной неэндогенной регуляторной области, где по меньшей мере одна из более чем одной неэндогенной регуляторной области не является такой же, как по меньшей мере одна из других неэндогенных регуляторных областей.

[0605] В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR находится непосредственно с 3'-стороны от стоп-кодона представляющего интерес гена. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR из мРНК, которая транскрибируется в клетке-мишени, может быть включена в любую нокин-кассету, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR происходит из эндогенного локуса-мишени и может содержать всю эндогенную последовательность или ее часть. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-UTR на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 98% идентична последовательности под SEQ ID NO: 26.

SEQ ID NO: 26 - иллюстративная последовательность 3'-UTR для вставки нокин-кассеты
GCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA

Последовательности полиаденилирования

[0606] В некоторых вариантах осуществления конструкция нокин-кассеты, предусмотренная в данном документе, может содержать последовательность сигнала полиаденилирования (поли(A)). Большинство растущих эукариотических мРНК имеют поли(A)-хвост на своем 3'-конце, который добавляется во время сложного процесса, включающего расщепление первичного транскрипта и сопряженную реакцию полиаденилирования, направляемую последовательностью поли(A)-сигнала (см., например, Proudfoot et al., Cell 108:501-512, 2002, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Поли(A)-хвост придает мРНК стабильность и возможность переноса (Molecular Biology of the Cell, Third Edition by B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A)-сигнала расположена с 3'-стороны от кодирующей последовательности.

[0607] Используемый в данном документе термин "полиаденилирование" относится к ковалентной связи полиаденилильного фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. В эукариотических организмах большинство молекул матричной РНК (мРНК) полиаденилированы на 3'-конце. 3'-поли(A)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (например, 50, 60, 70, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000), добавляемую к пре-мРНК под действием фермента полиаденилатполимеразы. В некоторых вариантах осуществления поли(A)-хвост добавляется к транскриптам, которые содержат специфическую последовательность, например, сигнал полиаденилирования (или поли(A)). Поли(A)-хвост и ассоциированные с ним белки способствуют защите мРНК от разрушения под действием экзонуклеаз. Полиаденилирование также играет роль в терминации транскрипции, экспорте мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование обычно происходит в ядре сразу после транскрипции ДНК в РНК, но также может происходить позже в цитоплазме. После терминации транскрипции цепь мРНК расщепляется под действием эндонуклеазного комплекса, ассоциированного с РНК-полимеразой. Сайт расщепления обычно характеризуется наличием последовательности оснований AAUAAA рядом с сайтом расщепления. После расщепления мРНК остатки аденозина добавляются к свободному 3'-концу в сайте расщепления.

[0608] Используемый в данном документе термин "последовательность поли(A)-сигнала" или "последовательность сигнала полиаденилирования" представляет собой последовательность, которая

запускает эндонуклеазное расщепление мРНК и добавление ряда остатков аденозина к 3'-концу расщепленной мРНК.

[0609] Существует несколько последовательностей поли(A)-сигналов, которые можно использовать, в том числе полученные из бычьего гормона роста (bGH) (Woychik et al., Proc. Natl. Acad Sci. US.A. 81(13):3944-3948, 1984; патент США № 5122458, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), мышиного β-глобина, мышиного α-глобина (Orkin et al., EMBO J 4(2):453-456, 1985; Thein et al., Blood71(2):313-319, 1988, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), коллагена человека, вируса полиомы (Batt et al., Mol. Cell Biol. 15(9):4783-4790, 1995, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (TK HSV), сигнала полиаденилирования гена тяжелой цепи IgG (US 2006/0040354, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), гормона роста человека (hGH) (Szymanski et al., Mol. Therapy 15(7):1340-1347, 2007, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), группы, содержащей поли(A)-сайт SV40, такой как поздний и ранний поли(A)-сайт SV40 (Schek et al., Mol. Cell Biol. 12(12):5386- 5393, 1992, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0610] Последовательность поли(A)-сигнала может представлять собой AATAAA. Последовательность AATAAA может быть заменена другими гексануклеотидными последовательностями, гомологичными AATAAA и способными действовать в качестве сигнала полиаденилирования, включая ATTAAA, AGTAAA, CATAAA, TATAAA, GATAAA, ACTAAA, AATATA, AAGAAA, AATAAT, AAAAAA, AATGAA, AATCAA, AACAAA, AATCAA, AATAAC, AATAGA, AATTAA или AATAAG (см., например, WO 06/12414, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0611] В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A)-сигнала может представлять собой синтетический сайт полиаденилирования (см., например, экспрессионную конструкцию pCl-neo от Promega согласно Levitt et al., Genes Dev. 3(7):1019-1025, 1989, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A)-сигнала представляет собой сигнал полиаденилирования растворимого нейропилина-1 (sNRP) (AAATAAAATACGAAATG) (см., например, WO 05/073384, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A)-сигнала содержит поли(A)-сайт SV40 или состоит из него. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A)-сигнала содержит или состоит из SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A)-сигнала содержит bGHpA или состоит из него. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A)-сигнала содержит или состоит из SEQ ID NO: 28. Дополнительные примеры последовательностей поли(A)-сигналов известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A) на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 27 или 28.

SEQ ID NO: 27 - иллюстративная последовательность поли(A)-сигнала SV40

AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGC
ATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA

SEQ ID NO: 28 - иллюстративная последовательность поли(A)-сигнала bGH

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC
CACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT
TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG
GGATGCGGTGGGCTCTATGG

Элементы IRES и 2A

[0612] В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, например, элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

~~[0613]~~ В некоторых вариантах осуществления нокин-кассета может содержать несколько представляющих интерес продуктов генов (например, по меньшей мере два представляющих интерес продукта генов). В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес продукты генов могут быть разделены регуляторным элементом, который обеспечивает экспрессию по меньшей мере двух представляющих интерес продуктов генов в виде более чем одного продукта гена, например, элементом IRES или 2A, расположенным между по меньшей мере двумя кодирующими последовательностями, что содействует получению по меньшей мере двух пептидных продуктов.

[0614] Элементы, являющиеся участками внутренней посадки рибосомы (IRES), представляют собой один из типов регуляторных элементов, которые обычно используются для этой цели. Как хорошо известно из уровня техники, элементы IRES обеспечивают возможность инициации трансляции из внутренней области мРНК и, следовательно, экспрессии двух отдельных белков из одного и того же мРНК-транскрипта. Первоначально IRES был выявлен в РНК полиовируса, где он способствует трансляции вирусного генома в эукариотических клетках. С тех пор было обнаружено множество последовательностей IRES — многие из вирусов, но также некоторые из клеточных мРНК, например, см. Mokrejs et al., Nucleic Acids Res. 2006; 34(Database issue):D125-D130.

[0615] Элементы 2A представляют собой другой тип регуляторных элементов, которые обычно используются для этой цели. Эти элементы 2A кодируют так называемые "саморасщепляющиеся" 2A-пептиды, которые представляют собой короткие пептиды (длиной приблизительно 20 аминокислот), впервые обнаруженные у пикорнавирусов. Термин "саморасщепляющийся" не совсем точен, поскольку считается, что эти пептиды функционируют, заставляя рибосому пропускать синтез пептидной связи на C-конце элемента 2A, что приводит к разделению конца последовательности 2A и следующего нижерасположенного пептида. "Расщепление" происходит между остатками глицина (G) и пролина (P), находящимися на C-конце, что означает, что к концу вышерасположенного цистрона, т. е. белка, кодируемого существенным геном, будет добавлено несколько дополнительных остатков из 2A-пептида, тогда как нижерасположенный цистрон, т. е. представляющий интерес продукт гена, будет начинаться с пролина (P).

[0616] В таблице 2 ниже представлены четыре обычно используемых 2A-пептида (необязательная последовательность GSG иногда добавляется к N-концу пептида для повышения эффективности расщепления). Существует множество потенциальных 2A-пептидов, которые могут подходить для

описанных в данном документе способов и композиций (см., например, Luke et al., Occurrence, function and evolutionary origins of '2A-like' sequences in virus genomes. *J Gen Virol.* 2008). Специалистам в данной области известно, что выбор конкретного 2A-пептида для конкретной нокин-кассеты в конечном счете будет зависеть от ряда факторов, таких как тип клеток или условия эксперимента. Специалистам в данной области будет понятно, что нуклеотидные последовательности, кодирующие конкретные 2A-пептиды, могут варьироваться, но при этом все равно кодировать пептид, подходящий для индукции желаемого события расщепления.

Таблица 2. Иллюстративные последовательности 2A-пептидов

SEQ ID NO:	**2A-пептид**	**Последовательность**
29	T2A	EGRGSLLTCGDVEENPGP
30	P2A	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
31	E2A	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
32	F2A	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
33	T2A	GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGA GAATCCTGGCCCG
34	P2A	GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGA GACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT
35	E2A	CAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTG AGAGCAACCCTGGACCT
36	F2A	GTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGA GACGTGGAGTCCAACCCTGGACCT
37	IRES	CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGC TTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCA CCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTG GCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCT CGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGC AGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGC GACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTG CCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAA GGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGT GGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGG GCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGA TCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGG TTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTT TTCCTTTGAAAAACACGATGATAA

Существенные гены

[0617] Существенный ген может представлять собой любой ген, который существенно важен для выживания и/или пролиферации клетки. В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", который существенно важен для выживания всех типов

клеток, например, ген, представленный в таблице 3. См. также другие гены "домашнего хозяйства", обсуждаемые в Eisenberg, Trends in Gen. 2014; 30(3):119-20 и Moein et al., Adv. Biomed Res. 2017; 6:15. Дополнительные гены, существенно важные для различных типов клеток, в том числе iPSC/ESC, представлены в таблице 4 (см. также существенные гены, обсуждаемые в Yilmaz et al., Nat. Cell Biol. 2018; 20:610-619, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки).

[0618] В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой *GAPDH*, и ДНК-нуклеаза вызывает разрыв в экзоне 9, например, двухнитевой разрыв. В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой *TBP*, и ДНК-нуклеаза вызывает разрыв в экзоне 7 или экзоне 8, например, двухнитевой разрыв. В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой *E2F4*, и ДНК-нуклеаза вызывает разрыв в экзоне 10, например, двухнитевой разрыв. В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой *G6PD*, и ДНК-нуклеаза вызывает разрыв в экзоне 13, например, двухнитевой разрыв. В некоторых вариантах осуществления существенный ген представляет собой *KIF11*, и ДНК-нуклеаза вызывает разрыв в экзоне 22, например, двухнитевой разрыв.

Таблица 3. Иллюстративные гены "домашнего хозяйства"

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000075624	ACTB	ENSG00000231500	RPS18
ENSG00000116459	ATP5F1	ENSG00000112592	TBP
ENSG00000166710	B2M	ENSG00000072274	TFRC
ENSG00000111640	GAPDH	ENSG00000164924	YWHAZ
ENSG00000169919	GUSB	ENSG00000089157	RPLP0
ENSG00000165704	HPRT1	ENSG00000142541	RPL13A
ENSG00000102144	PGK1	ENSG00000147604	RPL7
ENSG00000196262	PPIA	ENSG00000205250	E2F4
ENSG00000138160	KIF11	ENSG00000160211	G6PD

Таблица 4. Дополнительные иллюстративные существенные гены

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000111704	NANOG	ENSG00000181449	SOX2
ENSG00000179059	ZFP42	ENSG00000136997	MYC
ENSG00000136826	KLF4	ENSG00000175166	PSMD2
ENSG00000118655	DCLRE1B	ENSG00000070614	NDST1
ENSG00000172409	CLP1	ENSG00000115484	CCT4
ENSG00000082898	XPO1	ENSG00000100890	KIAA0391
ENSG00000114867	EIF4G1	ENSG00000149474	CSRP2BP
ENSG00000115866	DARS	ENSG00000102738	MRPS31
ENSG00000204628	GNB2L1	ENSG00000136104	RNASEH2B
ENSG00000198242	RPL23A	ENSG00000106246	PTCD1
ENSG00000158526	TSR2	ENSG00000248919	ATP5J2-PTCD1

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000125450	NUP85	ENSG00000138663	COPS4
ENSG00000134371	CDC73	ENSG00000115368	WDR75
ENSG00000164941	INTS8	ENSG00000128564	VGF
ENSG00000055483	USP36	ENSG00000128191	DGCR8
ENSG00000258366	RTEL1	ENSG00000008294	SPAG9
ENSG00000188846	RPL14	ENSG00000131475	VPS25
ENSG00000247626	MARS2	ENSG00000105523	FAM83E
ENSG00000095787	WAC	ENSG00000172269	DPAGT1
ENSG00000108094	CUL2	ENSG00000170312	CDK1
ENSG00000185946	RNPC3	ENSG00000104131	EIF3J
ENSG00000154473	BUB3	ENSG00000150753	CCT5
ENSG00000204394	VARS	ENSG00000140443	IGF1R
ENSG00000103051	COG4	ENSG00000010292	NCAPD2
ENSG00000104738	MCM4	ENSG00000171763	SPATA5L1
ENSG00000117222	RBBP5	ENSG00000180098	TRNAU1AP
ENSG00000082516	GEMIN5	ENSG00000168374	ARF4
ENSG00000100162	CENPM	ENSG00000173812	EIF1
ENSG00000141456	PELP1	ENSG00000100554	ATP6V1D
ENSG00000137807	KIF23	ENSG00000072756	TRNT1
ENSG00000112685	EXOC2	ENSG00000135372	NAT10
ENSG00000125995	ROMO1	ENSG00000178394	HTR1A
ENSG00000136891	TEX10	ENSG00000128272	ATF4
ENSG00000173113	TRMT112	ENSG00000204070	SYS1
ENSG00000075914	EXOSC7	ENSG00000137815	RTF1
ENSG00000119523	ALG2	ENSG00000198026	ZNF335
ENSG00000244038	DDOST	ENSG00000117410	ATP6V0B
ENSG00000108175	ZMIZ1	ENSG00000112739	PRPF4B
ENSG00000129691	ASH2L	ENSG00000129347	KRI1
ENSG00000183207	RUVBL2	ENSG00000221818	EBF2
ENSG00000055044	NOP58	ENSG00000198431	TXNRD1
ENSG00000204315	FKBPL	ENSG00000104979	C19orf53
ENSG00000187522	HSPA14	ENSG00000136709	WDR33
ENSG00000169375	SIN3A	ENSG00000149100	EIF3M
ENSG00000143748	NVL	ENSG00000125835	SNRPB
ENSG00000021776	AQR	ENSG00000116698	SMG7
ENSG00000132467	UTP3	ENSG00000087586	AURKA
ENSG00000087470	DNM1L	ENSG00000169230	PRELID1

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000130811	EIF3G	ENSG00000143799	PARP1
ENSG00000180198	RCC1	ENSG00000146731	CCT6A
ENSG00000101407	TTI1	ENSG00000163877	SNIP1
ENSG00000116455	WDR77	ENSG00000215421	ZNF407
ENSG00000135763	URB2	ENSG00000197724	PHF2
ENSG00000133316	WDR74	ENSG00000172590	MRPL52
ENSG00000189091	SF3B3	ENSG00000175203	DCTN2
ENSG00000109917	ZNF259	ENSG00000149273	RPS3
ENSG00000130640	TUBGCP2	ENSG00000204822	MRPL53
ENSG00000011376	LARS2	ENSG00000109775	UFSP2
ENSG00000135249	RINT1	ENSG00000165733	BMS1
ENSG00000126883	NUP214	ENSG00000104671	DCTN6
ENSG00000163510	CWC22	ENSG00000175224	ATG13
ENSG00000101138	CSTF1	ENSG00000142541	RPL13A
ENSG00000104221	BRF2	ENSG00000173805	HAP1
ENSG00000125630	POLR1B	ENSG00000115750	TAF1B
ENSG00000083896	YTHDC1	ENSG00000165688	PMPCA
ENSG00000105726	ATP13A1	ENSG00000159720	ATP6V0D1
ENSG00000105618	PRPF31	ENSG00000074201	CLNS1A
ENSG00000117748	RPA2	ENSG00000158417	EIF5B
ENSG00000143294	PRCC	ENSG00000196588	MKL1
ENSG00000156239	N6AMT1	ENSG00000138614	VWA9
ENSG00000143384	MCL1	ENSG00000124571	XPO5
ENSG00000113407	TARS	ENSG00000198000	NOL8
ENSG00000086589	RBM22	ENSG00000181991	MRPS11
ENSG00000133119	RFC3	ENSG00000149823	VPS51
ENSG00000052749	RRP12	ENSG00000151348	EXT2
ENSG00000103047	TANGO6	ENSG00000162396	PARS2
ENSG00000142751	GPN2	ENSG00000204843	DCTN1
ENSG00000101057	MYBL2	ENSG00000177302	TOP3A
ENSG00000176915	ANKLE2	ENSG00000142684	ZNF593
ENSG00000071127	WDR1	ENSG00000074800	ENO1
ENSG00000106344	RBM28	ENSG00000167513	CDT1
ENSG00000100316	RPL3	ENSG00000141101	NOB1
ENSG00000139131	YARS2	ENSG00000047315	POLR2B
ENSG00000182831	C16orf72	ENSG00000131966	ACTR10
ENSG00000167325	RRM1	ENSG00000115875	SRSF7

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000172262	ZNF131	ENSG00000186141	POLR3C
ENSG00000007168	PAFAH1B1	ENSG00000108424	KPNB1
ENSG00000117174	ZNHIT6	ENSG00000111845	PAK1IP1
ENSG00000196497	IPO4	ENSG00000148832	PAOX
ENSG00000188566	NDOR1	ENSG00000156017	C9orf41
ENSG00000183091	NEB	ENSG00000198901	PRC1
ENSG00000011304	PTBP1	ENSG00000134001	EIF2S1
ENSG00000109805	NCAPG	ENSG00000146918	NCAPG2
ENSG00000123154	WDR83	ENSG00000144713	RPL32
ENSG00000147416	ATP6V1B2	ENSG00000185122	HSF1
ENSG00000163961	RNF168	ENSG00000167658	EEF2
ENSG00000163811	WDR43	ENSG00000164190	NIPBL
ENSG00000143624	INTS3	ENSG00000163902	RPN1
ENSG00000101161	PRPF6	ENSG00000244045	TMEM199
ENSG00000130726	TRIM28	ENSG00000143476	DTL
ENSG00000165494	PCF11	ENSG00000149503	INCENP
ENSG00000053900	ANAPC4	ENSG00000071243	ING3
ENSG00000168255	POLR2J3	ENSG00000186073	C15orf41
ENSG00000129534	MIS18BP1	ENSG00000088836	SLC4A11
ENSG00000164754	RAD21	ENSG00000136273	HUS1
ENSG00000120158	RCL1	ENSG00000005007	UPF1
ENSG00000161016	RPL8	ENSG00000070010	UFD1L
ENSG00000030066	NUP160	ENSG00000106263	EIF3B
ENSG00000099624	ATP5D	ENSG00000213024	NUP62
ENSG00000116120	FARSB	ENSG00000067191	CACNB1
ENSG00000115233	PSMD14	ENSG00000179091	CYC1
ENSG00000086504	MRPL28	ENSG00000113312	TTC1
ENSG00000160752	FDPS	ENSG00000085831	TTC39A
ENSG00000049541	RFC2	ENSG00000118197	DDX59
ENSG00000148688	RPP30	ENSG00000134871	COL4A2
ENSG00000114573	ATP6V1A	ENSG00000088986	DYNLL1
ENSG00000086200	IPO11	ENSG00000138778	CENPE
ENSG00000119720	NRDE2	ENSG00000106244	PDAP1
ENSG00000058262	SEC61A1	ENSG00000177600	RPLP2
ENSG00000073111	MCM2	ENSG00000112081	SRSF3
ENSG00000138160	KIF11	ENSG00000100413	POLR3H
ENSG00000215193	PEX26	ENSG00000172508	CARNS1

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000161057	PSMC2	ENSG00000147123	NDUFB11
ENSG00000187514	PTMA	ENSG00000119953	SMNDC1
ENSG00000135829	DHX9	ENSG00000111640	GAPDH
ENSG00000058729	RIOK2	ENSG00000117899	MESDC2
ENSG00000110330	BIRC2	ENSG00000075624	ACTB
ENSG00000141759	TXNL4A	ENSG00000163166	IWS1
ENSG00000166986	MARS	ENSG00000114503	NCBP2
ENSG00000153774	CFDP1	ENSG00000198522	GPN1
ENSG00000130177	CDC16	ENSG00000099899	TRMT2A
ENSG00000241553	ARPC4	ENSG00000181544	FANCB
ENSG00000132604	TERF2	ENSG00000136982	DSCC1
ENSG00000114982	KANSL3	ENSG00000068366	ACSL4
ENSG00000213780	GTF2H4	ENSG00000062716	VMP1
ENSG00000139343	SNRPF	ENSG00000111802	TDP2
ENSG00000101189	MRGBP	ENSG00000185627	PSMD13
ENSG00000079246	XRCC5	ENSG00000020426	MNAT1
ENSG00000196943	NOP9	ENSG00000113734	BNIP1
ENSG00000122965	RBM19	ENSG00000102241	HTATSF1
ENSG00000132383	RPA1	ENSG00000160789	LMNA
ENSG00000094880	CDC23	ENSG00000062822	POLD1
ENSG00000213639	PPP1CB	ENSG00000168944	CEP120
ENSG00000109911	ELP4	ENSG00000139718	SETD1B
ENSG00000180957	PITPNB	ENSG00000132792	CTNNBL1
ENSG00000122257	RBBP6	ENSG00000173540	GMPPB
ENSG00000173145	NOC3L	ENSG00000128789	PSMG2
ENSG00000179115	FARSA	ENSG00000196365	LONP1
ENSG00000105171	POP4	ENSG00000160214	RRP1
ENSG00000148303	RPL7A	ENSG00000179041	RRS1
ENSG00000167508	MVD	ENSG00000143106	PSMA5
ENSG00000115541	HSPE1	ENSG00000168411	RFWD3
ENSG00000170445	HARS	ENSG00000073584	SMARCE1
ENSG00000168496	FEN1	ENSG00000175334	BANF1
ENSG00000141367	CLTC	ENSG00000077152	UBE2T
ENSG00000087191	PSMC5	ENSG00000173611	SCAI
ENSG00000163159	VPS72	ENSG00000171720	HDAC3
ENSG00000130741	EIF2S3	ENSG00000182197	EXT1
ENSG00000168495	POLR3D	ENSG00000114346	ECT2

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000071894	CPSF1	ENSG00000124214	STAU1
ENSG00000058600	POLR3E	ENSG00000126254	RBM42
ENSG00000100726	TELO2	ENSG00000127184	COX7C
ENSG00000165501	LRR1	ENSG00000174276	ZNHIT2
ENSG00000113575	PPP2CA	ENSG00000177971	IMP3
ENSG00000116922	C1orf109	ENSG00000104872	PIH1D1
ENSG00000073712	FERMT2	ENSG00000132155	RAF1
ENSG00000174437	ATP2A2	ENSG00000163872	YEATS2
ENSG00000176407	KCMF1	ENSG00000119906	FAM178A
ENSG00000140525	FANCI	ENSG00000217930	PAM16
ENSG00000101182	PSMA7	ENSG00000197498	RPF2
ENSG00000130204	TOMM40	ENSG00000130348	QRSL1
ENSG00000239306	RBM14	ENSG00000147536	GINS4
ENSG00000248643	RBM14-RBM4	ENSG00000174748	RPL15
ENSG00000172113	NME6	ENSG00000159147	DONSON
ENSG00000136448	NMT1	ENSG00000157593	SLC35B2
ENSG00000186166	CCDC84	ENSG00000181938	GINS3
ENSG00000166233	ARIH1	ENSG00000187446	CHP1
ENSG00000111877	MCM9	ENSG00000070371	CLTCL1
ENSG00000204316	MRPL38	ENSG00000096063	SRPK1
ENSG00000101868	POLA1	ENSG00000141564	RPTOR
ENSG00000107951	MTPAP	ENSG00000108474	PIGL
ENSG00000039650	PNKP	ENSG00000187741	FANCA
ENSG00000123064	DDX54	ENSG00000213465	ARL2
ENSG00000183955	SETD8	ENSG00000117593	DARS2
ENSG00000138107	ACTR1A	ENSG00000171863	RPS7
ENSG00000244005	NFS1	ENSG00000117395	EBNA1BP2
ENSG00000188986	NELFB	ENSG00000111142	METAP2
ENSG00000018699	TTC27	ENSG00000113272	THG1L
ENSG00000167112	TRUB2	ENSG00000117360	PRPF3
ENSG00000100393	EP300	ENSG00000221978	CCNL2
ENSG00000101639	CEP192	ENSG00000163832	ELP6
ENSG00000126461	SCAF1	ENSG00000108852	MPP2
ENSG00000172171	TEFM	ENSG00000175832	ETV4
ENSG00000135913	USP37	ENSG00000185359	HGS
ENSG00000135624	CCT7	ENSG00000120705	ETF1
ENSG00000100804	PSMB5	ENSG00000108384	RAD51C

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000175792	RUVBL1	ENSG00000036257	CUL3
ENSG00000183431	SF3A3	ENSG00000152382	TADA1
ENSG00000108773	KAT2A	ENSG00000114742	WDR48
ENSG00000100949	RABGGTA	ENSG00000214026	MRPL23
ENSG00000151503	NCAPD3	ENSG00000105671	DDX49
ENSG00000111880	RNGTT	ENSG00000104731	KLHDC4
ENSG00000168883	USP39	ENSG00000010256	UQCRC1
ENSG00000151461	UPF2	ENSG00000154743	TSEN2
ENSG00000105486	LIG1	ENSG00000178896	EXOSC4
ENSG00000111300	NAA25	ENSG00000168393	DTYMK
ENSG00000144559	TAMM41	ENSG00000035928	RFC1
ENSG00000137574	TGS1	ENSG00000048707	VPS13D
ENSG00000172273	HINFP	ENSG00000154832	CXXC1
ENSG00000133112	TPT1	ENSG00000130985	UBA1
ENSG00000167986	DDB1	ENSG00000065150	IPO5
ENSG00000125319	C17orf53	ENSG00000161800	RACGAP1
ENSG00000113161	HMGCR	ENSG00000142534	RPS11
ENSG00000100941	PNN	ENSG00000136003	ISCU
ENSG00000139697	SBNO1	ENSG00000065000	AP3D1
ENSG00000135336	ORC3	ENSG00000100401	RANGAP1
ENSG00000101115	SALL4	ENSG00000196230	TUBB
ENSG00000100902	PSMA6	ENSG00000181555	SETD2
ENSG00000141141	DDX52	ENSG00000055950	MRPL43
ENSG00000254093	PINX1	ENSG00000188389	PDCD1
ENSG00000184445	KNTC1	ENSG00000165684	SNAPC4
ENSG00000089053	ANAPC5	ENSG00000147533	GOLGA7
ENSG00000111602	TIMELESS	ENSG00000064313	TAF2
ENSG00000145592	RPL37	ENSG00000137154	RPS6
ENSG00000106615	RHEB	ENSG00000104886	PLEKHJ1
ENSG00000180817	PPA1	ENSG00000122882	ECD
ENSG00000110172	CHORDC1	ENSG00000184967	NOC4L
ENSG00000137876	RSL24D1	ENSG00000088325	TPX2
ENSG00000104408	EIF3E	ENSG00000183520	UTP11L
ENSG00000143436	MRPL9	ENSG00000179051	RCC2
ENSG00000108883	EFTUD2	ENSG00000157510	AFAP1L1
ENSG00000140740	UQCRC2	ENSG00000066379	ZNRD1
ENSG00000211456	SACM1L	ENSG00000172115	CYCS

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000131051	RBM39	ENSG00000086827	ZW10
ENSG00000136758	YME1L1	ENSG00000109534	GAR1
ENSG00000112578	BYSL	ENSG00000175387	SMAD2
ENSG00000163781	TOPBP1	ENSG00000115947	ORC4
ENSG00000106628	POLD2	ENSG00000010072	SPRTN
ENSG00000132952	USPL1	ENSG00000185163	DDX51
ENSG00000168538	TRAPPC11	ENSG00000177370	TIMM22
ENSG00000168488	ATXN2L	ENSG00000076924	XAB2
ENSG00000022277	RTFDC1	ENSG00000124562	SNRPC
ENSG00000179988	PSTK	ENSG00000127586	CHTF18
ENSG00000092199	HNRNPC	ENSG00000066117	SMARCD1
ENSG00000156831	NSMCE2	ENSG00000177494	ZBED2
ENSG00000125691	RPL23	ENSG00000133401	PDZD2
ENSG00000083520	DIS3	ENSG00000127554	GFER
ENSG00000115761	NOL10	ENSG00000117697	NSL1
ENSG00000173894	CBX2	ENSG00000184659	FOXD4L4
ENSG00000243147	MRPL33	ENSG00000204828	FOXD4L2
ENSG00000139618	BRCA2	ENSG00000110200	ANAPC15
ENSG00000109519	GRPEL1	ENSG00000169291	SHE
ENSG00000203760	CENPW	ENSG00000132313	MRPL35
ENSG00000166851	PLK1	ENSG00000115816	CEBPZ
ENSG00000121579	NAA50	ENSG00000243667	WDR92
ENSG00000163608	C3orf17	ENSG00000107959	PITRM1
ENSG00000005075	POLR2J	ENSG00000103035	PSMD7
ENSG00000148606	POLR3A	ENSG00000163946	FAM208A
ENSG00000160949	TONSL	ENSG00000178057	NDUFAF3
ENSG00000128159	TUBGCP6	ENSG00000170540	ARL6IP1
ENSG00000125449	ARMC7	ENSG00000091009	RBM27
ENSG00000122406	RPL5	ENSG00000205609	EIF3CL
ENSG00000126226	PCID2	ENSG00000165526	RPUSD4
ENSG00000159377	PSMB4	ENSG00000120314	WDR55
ENSG00000167967	E4F1	ENSG00000013275	PSMC4
ENSG00000141076	CIRH1A	ENSG00000131931	THAP1
ENSG00000069248	NUP133	ENSG00000155660	PDIA4
ENSG00000242372	EIF6	ENSG00000162607	USP1
ENSG00000087269	NOP14	ENSG00000109606	DHX15
ENSG00000163468	CCT3	ENSG00000261949	LOC100507003

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000140326	CDAN1	ENSG00000130589	HELZ2
ENSG00000146834	MEPCE	ENSG00000145734	BDP1
ENSG00000143222	UFC1	ENSG00000103194	USP10
ENSG00000110871	COQ5	ENSG00000076201	PTPN23
ENSG00000119285	HEATR1	ENSG00000140854	KATNB1
ENSG00000145386	CCNA2	ENSG00000164053	ATRIP
ENSG00000164109	MAD2L1	ENSG00000167088	SNRPD1
ENSG00000185347	C14orf80	ENSG00000154781	CCDC174
ENSG00000134748	PRPF38A	ENSG00000115446	UNC50
ENSG00000070061	IKBKAP	ENSG00000177700	POLR2L
ENSG00000099995	SF3A1	ENSG00000162063	CCNF
ENSG00000100029	PES1	ENSG00000152904	GGPS1
ENSG00000130255	RPL36	ENSG00000151657	KIN
ENSG00000085231	AK6	ENSG00000182810	DDX28
ENSG00000187145	MRPS21	ENSG00000006744	ELAC2
ENSG00000062650	WAPAL	ENSG00000116898	MRPS15
ENSG00000122484	RPAP2	ENSG00000255072	PIGY
ENSG00000090861	AARS	ENSG00000130332	LSM7
ENSG00000161888	SPC24	ENSG00000051180	RAD51
ENSG00000087087	SRRT	ENSG00000178171	AMER3
ENSG00000134910	STT3A	ENSG00000254901	MEF2BNB
ENSG00000161526	SAP30BP	ENSG00000149925	ALDOA
ENSG00000068654	POLR1A	ENSG00000100604	CHGA
ENSG00000140983	RHOT2	ENSG00000172602	RND1
ENSG00000184708	EIF4ENIF1	ENSG00000138592	USP8
ENSG00000100479	POLE2	ENSG00000172613	RAD9A
ENSG00000134440	NARS	ENSG00000132196	HSD17B7
ENSG00000014164	ZC3H3	ENSG00000151849	CENPJ
ENSG00000113812	ACTR8	ENSG00000105221	AKT2
ENSG00000145331	TRMT10A	ENSG00000185504	C17orf70
ENSG00000110104	CCDC86	ENSG00000025796	SEC63
ENSG00000164163	ABCE1	ENSG00000168438	CDC40
ENSG00000167863	ATP5H	ENSG00000163918	RFC4
ENSG00000176946	THAP4	ENSG00000152147	GEMIN6
ENSG00000169251	NMD3	ENSG00000166887	VPS39
ENSG00000166226	CCT2	ENSG00000018625	ATP1A2
ENSG00000131747	TOP2A	ENSG00000163346	PBXIP1

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000267673	FDX1L	ENSG00000135966	TGFBRAP1
ENSG00000108559	NUP88	ENSG00000099901	RANBP1
ENSG00000104957	CCDC130	ENSG00000010327	STAB1
ENSG00000167522	ANKRD11	ENSG00000163344	PMVK
ENSG00000130706	ADRM1	ENSG00000102921	N4BP1
ENSG00000048162	NOP16	ENSG00000177150	FAM210A
ENSG00000159210	SNF8	ENSG00000158042	MRPL17
ENSG00000113360	DROSHA	ENSG00000124659	TBCC
ENSG00000108296	CWC25	ENSG00000113593	PPWD1
ENSG00000161395	PGAP3	ENSG00000188306	LRRIQ4
ENSG00000089195	TRMT6	ENSG00000074966	TXK
ENSG00000185838	GNB1L	ENSG00000228049	POLR2J2
ENSG00000101146	RAE1	ENSG00000133226	SRRM1
ENSG00000092853	CLSPN	ENSG00000121577	POPDC2
ENSG00000107949	BCCIP	ENSG00000130876	SLC7A10
ENSG00000159079	C21orf59	ENSG00000130810	PPAN
ENSG00000137947	GTF2B	ENSG00000243207	PPAN-P2RY11
ENSG00000160948	VPS28	ENSG00000081248	CACNA1S
ENSG00000065427	KARS	ENSG00000153201	RANBP2
ENSG00000102978	POLR2C	ENSG00000126698	DNAJC8
ENSG00000182154	MRPL41	ENSG00000103018	CYB5B
ENSG00000139168	ZCRB1	ENSG00000130816	DNMT1
ENSG00000175110	MRPS22	ENSG00000102103	PQBP1
ENSG00000177084	POLE	ENSG00000120253	NUP43
ENSG00000197681	TBC1D3	ENSG00000164327	RICTOR
ENSG00000053501	USE1	ENSG00000139719	VPS33A
ENSG00000121879	PIK3CA	ENSG00000168566	SNRNP48
ENSG00000108278	ZNHIT3	ENSG00000063244	U2AF2
ENSG00000161547	SRSF2	ENSG00000108423	TUBD1
ENSG00000129083	COPB1	ENSG00000164880	INTS1
ENSG00000012048	BRCA1	ENSG00000148297	MED22
ENSG00000171314	PGAM1	ENSG00000185825	BCAP31
ENSG00000112159	MDN1	ENSG00000084623	EIF3I
ENSG00000174243	DDX23	ENSG00000066422	ZBTB11
ENSG00000096401	CDC5L	ENSG00000119041	GTF3C3
ENSG00000128513	POT1	ENSG00000083093	PALB2
ENSG00000071859	FAM50A	ENSG00000120699	EXOSC8

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000100084	HIRA	ENSG00000166135	HIF1AN
ENSG00000100813	ACIN1	ENSG00000188976	NOC2L
ENSG00000005100	DHX33	ENSG00000102974	CTCF
ENSG00000101158	NELFCD	ENSG00000148229	POLE3
ENSG00000115946	PNO1	ENSG00000167118	URM1
ENSG00000188647	PTAR1	ENSG00000176386	CDC26
ENSG00000146007	ZMAT2	ENSG00000110063	DCPS
ENSG00000241837	ATP5O	ENSG00000089737	DDX24
ENSG00000113643	RARS	ENSG00000119383	PPP2R4
ENSG00000162521	RBBP4	ENSG00000143319	ISG20L2
ENSG00000116830	TTF2	ENSG00000141552	ANAPC11
ENSG00000187555	USP7	ENSG00000155506	LARP1
ENSG00000137216	TMEM63B	ENSG00000144867	SRPRB
ENSG00000161904	LEMD2	ENSG00000093000	NUP50
ENSG00000241945	PWP2	ENSG00000107937	GTPBP4
ENSG00000134982	APC	ENSG00000083635	NUFIP1
ENSG00000156983	BRPF1	ENSG00000174527	MYO1H
ENSG00000164346	NSA2	ENSG00000124641	MED20
ENSG00000223496	EXOSC6	ENSG00000240694	PNMA2
ENSG00000113569	NUP155	ENSG00000122012	SV2C
ENSG00000080986	NDC80	ENSG00000017260	ATP2C1
ENSG00000143374	TARS2	ENSG00000179965	ZNF771
ENSG00000104835	SARS2	ENSG00000126216	TUBGCP3
ENSG00000152253	SPC25	ENSG00000126814	TRMT5
ENSG00000088356	PDRG1	ENSG00000101945	SUV39H1
ENSG00000044574	HSPA5	ENSG00000182185	RAD51B
ENSG00000116874	WARS2	ENSG00000163681	SLMAP
ENSG00000204531	POU5F1	ENSG00000179295	PTPN11
ENSG00000004779	NDUFAB1	ENSG00000004487	KDM1A
ENSG00000161981	SNRNP25	ENSG00000136100	VPS36
ENSG00000126457	PRMT1	ENSG00000168066	SF1
ENSG00000142507	PSMB6	ENSG00000197181	PIWIL2
ENSG00000164808	SPIDR	ENSG00000128908	INO80
ENSG00000234972	TBC1D3C	ENSG00000102144	PGK1
ENSG00000144554	FANCD2	ENSG00000007923	DNAJC11
ENSG00000147383	NSDHL	ENSG00000143514	TP53BP2
ENSG00000165732	DDX21	ENSG00000076650	GPATCH1

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000155975	VPS37A	ENSG00000130749	ZC3H4
ENSG00000002822	MAD1L1	ENSG00000062582	MRPS24
ENSG00000179271	GADD45GIP1	ENSG00000087085	ACHE
ENSG00000101452	DHX35	ENSG00000197976	AKAP17A
ENSG00000074071	MRPS34	ENSG00000100028	SNRPD3
ENSG00000169045	HNRNPH1	ENSG00000128731	HERC2
ENSG00000087510	TFAP2C	ENSG00000134014	ELP3
ENSG00000105819	PMPCB	ENSG00000181163	NPM1
ENSG00000204351	SKIV2L	ENSG00000148444	COMMD3
ENSG00000160783	PMF1	ENSG00000095319	NUP188
ENSG00000152234	ATP5A1	ENSG00000169564	PCBP1
ENSG00000127463	EMC1	ENSG00000182208	MOB2
ENSG00000124228	DDX27	ENSG00000055070	SZRD1
ENSG00000100319	ZMAT5	ENSG00000182473	EXOC7
ENSG00000065183	WDR3	ENSG00000136930	PSMB7
ENSG00000058272	PPP1R12A	ENSG00000107863	ARHGAP21
ENSG00000136628	EPRS	ENSG00000197223	C1D
ENSG00000163017	ACTG2	ENSG00000184270	HIST2H2AB
ENSG00000104884	ERCC2	ENSG00000161036	LRWD1
ENSG00000166483	WEE1	ENSG00000144736	SHQ1
ENSG00000135837	CEP350	ENSG00000137100	DCTN3
ENSG00000104897	SF3A2	ENSG00000131149	GSE1
ENSG00000140598	EFTUD1	ENSG00000214753	HNRNPUL2
ENSG00000143774	GUK1	ENSG00000111358	GTF2H3
ENSG00000085721	RRN3	ENSG00000147677	EIF3H
ENSG00000172053	QARS	ENSG00000125676	THOC2
ENSG00000165934	CPSF2	ENSG00000149554	CHEK1
ENSG00000052802	MSMO1	ENSG00000176476	CCDC101
ENSG00000135476	ESPL1	ENSG00000147596	PRDM14
ENSG00000174177	CTU2	ENSG00000092094	OSGEP
ENSG00000120438	TCP1	ENSG00000155393	HEATR3
ENSG00000170892	TSEN34	ENSG00000083845	RPS5
ENSG00000204574	ABCF1	ENSG00000148296	SURF6
ENSG00000175376	EIF1AD	ENSG00000162613	FUBP1
ENSG00000146263	MMS22L	ENSG00000182220	ATP6AP2
ENSG00000121022	COPS5	ENSG00000115163	CENPA
ENSG00000168090	COPS6	ENSG00000176225	RTTN

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000167491	GATAD2A	ENSG00000176208	ATAD5
ENSG00000084072	PPIE	ENSG00000254827	SLC22A18AS
ENSG00000115268	RPS15	ENSG00000128708	HAT1
ENSG00000163938	GNL3	ENSG00000106400	ZNHIT1
ENSG00000151665	PIGF	ENSG00000123219	CENPK
ENSG00000148843	PDCD11	ENSG00000264424	MYH4
ENSG00000141736	ERBB2	ENSG00000066468	FGFR2
ENSG00000103168	TAF1C	ENSG00000095059	DHPS
ENSG00000105401	CDC37	ENSG00000110921	MVK
ENSG00000163933	RFT1	ENSG00000141556	TBCD
ENSG00000122085	MTERFD2	ENSG00000196305	IARS
ENSG00000164032	H2AFZ	ENSG00000131055	COX4I2
ENSG00000140943	MBTPS1	ENSG00000153789	FAM92B
ENSG00000198952	SMG5	ENSG00000088930	XRN2
ENSG00000169021	UQCRFS1	ENSG00000145220	LYAR
ENSG00000013810	TACC3	ENSG00000172809	RPL38
ENSG00000105258	POLR2I	ENSG00000108788	MLX
ENSG00000167978	SRRM2	ENSG00000197170	PSMD12
ENSG00000095564	BTAF1	ENSG00000225899	FRG2B
ENSG00000138095	LRPPRC	ENSG00000174886	NDUFA11
ENSG00000063978	RNF4	ENSG00000172058	SERF1A
ENSG00000162368	CMPK1	ENSG00000205572	SERF1B
ENSG00000140829	DHX38	ENSG00000242485	MRPL20
ENSG00000158169	FANCC	ENSG00000089225	TBX5
ENSG00000161960	EIF4A1	ENSG00000149428	HYOU1
ENSG00000181222	POLR2A	ENSG00000166595	FAM96B
ENSG00000165916	PSMC3	ENSG00000131462	TUBG1
ENSG00000198060	MARCH5	ENSG00000185990	F8A3
ENSG00000149923	PPP4C	ENSG00000197932	F8A1
ENSG00000111667	USP5	ENSG00000198444	F8A2
ENSG00000198755	RPL10A	ENSG00000031823	RANBP3
ENSG00000141499	WRAP53	ENSG00000100353	EIF3D
ENSG00000093009	CDC45	ENSG00000163605	PPP4R2
ENSG00000105732	ZNF574	ENSG00000164162	ANAPC10
ENSG00000104064	GABPB1	ENSG00000132153	DHX30
ENSG00000108294	PSMB3	ENSG00000154723	ATP5J
ENSG00000130856	ZNF236	ENSG00000182256	GABRG3

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000133980	VRTN	ENSG00000119487	MAPKAP1
ENSG00000149308	NPAT	ENSG00000132394	EEFSEC
ENSG00000120071	KANSL1	ENSG00000122952	ZWINT
ENSG00000129084	PSMA1	ENSG00000131042	LILRB2
ENSG00000117877	CD3EAP	ENSG00000222004	C7orf71
ENSG00000127616	SMARCA4	ENSG00000168802	CHTF8
ENSG00000163882	POLR2H	ENSG00000069849	ATP1B3
ENSG00000183718	TRIM52	ENSG00000074582	BCS1L
ENSG00000106803	SEC61B	ENSG00000103126	AXIN1
ENSG00000114942	EEF1B2	ENSG00000187144	SPATA21
ENSG00000067704	IARS2	ENSG00000221914	PPP2R2A
ENSG00000114686	MRPL3	ENSG00000163386	NBPF10
ENSG00000172315	TP53RK	ENSG00000134987	WDR36
ENSG00000173120	KDM2A	ENSG00000132300	PTCD3
ENSG00000138442	WDR12	ENSG00000156931	VPS8
ENSG00000145982	FARS2	ENSG00000165632	TAF3
ENSG00000117481	NSUN4	ENSG00000044115	CTNNA1
ENSG00000142676	RPL11	ENSG00000035403	VCL
ENSG00000164615	CAMLG	ENSG00000088256	GNA11
ENSG00000138073	PREB	ENSG00000164334	FAM170A
ENSG00000136888	ATP6V1G1	ENSG00000166225	FRS2
ENSG00000221829	FANCG	ENSG00000241186	TDGF1
ENSG00000198887	SMC5	ENSG00000196374	HIST1H2BM
ENSG00000102900	NUP93	ENSG00000117614	SYF2
ENSG00000108344	PSMD3	ENSG00000154222	CC2D1B
ENSG00000023191	RNH1	ENSG00000101367	MAPRE1
ENSG00000143621	ILF2	ENSG00000188186	LAMTOR4
ENSG00000112855	HARS2	ENSG00000166924	NYAP1
ENSG00000110536	PTPMT1	ENSG00000079805	DNM2
ENSG00000165629	ATP5C1	ENSG00000011260	UTP18
ENSG00000166847	DCTN5	ENSG00000089685	BIRC5
ENSG00000104852	SNRNP70	ENSG00000123908	AGO2
ENSG00000203814	HIST2H2BF	ENSG00000057935	MTA3
ENSG00000009413	REV3L	ENSG00000100811	YY1
ENSG00000130772	MED18	ENSG00000064102	ASUN
ENSG00000079313	REXO1	ENSG00000006025	OSBPL7
ENSG00000012061	ERCC1	ENSG00000107372	ZFAND5

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000111642	CHD4	ENSG00000172922	RNASEH2C
ENSG00000100462	PRMT5	ENSG00000075089	ACTR6
ENSG00000174100	MRPL45	ENSG00000165119	HNRNPK
ENSG00000101421	CHMP4B	ENSG00000182518	FAM104B
ENSG00000144028	SNRNP200	ENSG00000041802	LSG1
ENSG00000108592	FTSJ3	ENSG00000206557	TRIM71
ENSG00000110048	OSBP	ENSG00000124140	SLC12A5
ENSG00000147403	RPL10	ENSG00000063046	EIF4B
ENSG00000198783	ZNF830	ENSG00000126581	BECN1
ENSG00000179409	GEMIN4	ENSG00000171530	TBCA
ENSG00000147604	RPL7	ENSG00000206127	GOLGA8O
ENSG00000136824	SMC2	ENSG00000167842	MIS12
ENSG00000104889	RNASEH2A	ENSG00000033011	ALG1
ENSG00000146282	RARS2	ENSG00000146670	CDCA5
ENSG00000068784	SRBD1	ENSG00000198856	OSTC
ENSG00000137822	TUBGCP4	ENSG00000111605	CPSF6
ENSG00000059691	PET112	ENSG00000087365	SF3B2
ENSG00000066827	ZFAT	ENSG00000135845	PIGC
ENSG00000148308	GTF3C5	ENSG00000100220	RTCB
ENSG00000170185	USP38	ENSG00000131876	SNRPA1
ENSG00000160201	U2AF1	ENSG00000115392	FANCL
ENSG00000141258	SGSM2	ENSG00000078618	NRD1
ENSG00000172660	TAF15	ENSG00000025770	NCAPH2
ENSG00000145833	DDX46	ENSG00000117682	DHDDS
ENSG00000104980	TIMM44	ENSG00000198844	ARHGEF15
ENSG00000097046	CDC7	ENSG00000132603	NIP7
ENSG00000131368	MRPS25	ENSG00000162377	SELRC1
ENSG00000204209	DAXX	ENSG00000137411	VARS2
ENSG00000129696	TTI2	ENSG00000064886	CHI3L2
ENSG00000108848	LUC7L3	ENSG00000137806	NDUFAF1
ENSG00000013573	DDX11	ENSG00000133030	MPRIP
ENSG00000105248	CCDC94	ENSG00000136935	GOLGA1
ENSG00000183598	HIST2H3D	ENSG00000243927	MRPS6
ENSG00000224226	TBC1D3B	ENSG00000046647	GEMIN8
ENSG00000090470	PDCD7	ENSG00000133124	IRS4
ENSG00000031698	SARS	ENSG00000255346	NOX5
ENSG00000108270	AATF	ENSG00000103275	UBE2I

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000159111	MRPL10	ENSG00000165502	RPL36AL
ENSG00000149806	FAU	ENSG00000100056	DGCR14
ENSG00000188739	RBM34	ENSG00000167972	ABCA3
ENSG00000152684	PELO	ENSG00000053372	MRTO4
ENSG00000174374	WBSCR16	ENSG00000169813	HNRNPF
ENSG00000107036	KIAA1432	ENSG00000198258	UBL5
ENSG00000204619	PPP1R11	ENSG00000103245	NARFL
ENSG00000091651	ORC6	ENSG00000183513	COA5
ENSG00000134480	CCNH	ENSG00000174547	MRPL11
ENSG00000164151	KIAA0947	ENSG00000173457	PPP1R14B
ENSG00000164611	PTTG1	ENSG00000088038	CNOT3
ENSG00000111445	RFC5	ENSG00000115539	PDCL3
ENSG00000127481	UBR4	ENSG00000118181	RPS25
ENSG00000159352	PSMD4	ENSG00000160075	SSU72
ENSG00000137814	HAUS2	ENSG00000257949	TEN1
ENSG00000105220	GPI	ENSG00000168028	RPSA
ENSG00000140521	POLG	ENSG00000213066	FGFR1OP
ENSG00000075856	SART3	ENSG00000143228	NUF2
ENSG00000143742	SRP9	ENSG00000137413	TAF8
ENSG00000163029	SMC6	ENSG00000124207	CSE1L
ENSG00000162227	TAF6L	ENSG00000080815	PSEN1
ENSG00000100129	EIF3L	ENSG00000132773	TOE1
ENSG00000170348	TMED10	ENSG00000129460	NGDN
ENSG00000182217	HIST2H4B	ENSG00000188613	NANOS1
ENSG00000183941	HIST2H4A	ENSG00000163636	PSMD6
ENSG00000116221	MRPL37	ENSG00000146232	NFKBIE
ENSG00000196235	SUPT5H	ENSG00000135902	CHRND
ENSG00000161920	MED11	ENSG00000143641	GALNT2
ENSG00000134690	CDCA8	ENSG00000073969	NSF
ENSG00000131153	GINS2	ENSG00000041982	TNC
ENSG00000138018	EPT1	ENSG00000108256	NUFIP2
ENSG00000173141	MRP63	ENSG00000198911	SREBF2
ENSG00000154727	GABPA	ENSG00000141385	AFG3L2
ENSG00000120800	UTP20	ENSG00000176108	CHMP6
ENSG00000114767	RRP9	ENSG00000257365	FNTB
ENSG00000174231	PRPF8	ENSG00000186487	MYT1L
ENSG00000137547	MRPL15	ENSG00000127423	AUNIP

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000146576	C7orf26	ENSG00000112110	MRPL18
ENSG00000065268	WDR18	ENSG00000114650	SCAP
ENSG00000147162	OGT	ENSG00000178104	PDE4DIP
ENSG00000198917	C9orf114	ENSG00000105656	ELL
ENSG00000180822	PSMG4	ENSG00000186393	KRT26
ENSG00000125977	EIF2S2	ENSG00000124541	RRP36
ENSG00000173418	NAA20	ENSG00000182108	DEXI
ENSG00000155561	NUP205	ENSG00000139133	ALG10
ENSG00000173545	ZNF622	ENSG00000082068	WDR70
ENSG00000127993	RBM48	ENSG00000151388	ADAMTS12
ENSG00000197102	DYNC1H1	ENSG00000172172	MRPL13
ENSG00000119392	GLE1	ENSG00000184979	USP18
ENSG00000174444	RPL4	ENSG00000239857	GET4
ENSG00000149716	ORAOV1	ENSG00000069345	DNAJA2
ENSG00000155876	RRAGA	ENSG00000073050	XRCC1
ENSG00000198841	KTI12	ENSG00000070985	TRPM5
ENSG00000056097	ZFR	ENSG00000158715	SLC45A3
ENSG00000227057	WDR46	ENSG00000172062	SMN1
ENSG00000167670	CHAF1A	ENSG00000205571	SMN2
ENSG00000127191	TRAF2	ENSG00000113141	IK
ENSG00000072506	HSD17B10	ENSG00000186105	LRRC70
ENSG00000215021	PHB2	ENSG00000157895	C12orf43
ENSG00000175467	SART1	ENSG00000166441	RPL27A
ENSG00000121073	SLC35B1	ENSG00000106346	USP42
ENSG00000079459	FDFT1	ENSG00000185379	RAD51D
ENSG00000143493	INTS7	ENSG00000116667	C1orf21
ENSG00000141543	EIF4A3	ENSG00000176444	CLK2
ENSG00000174197	MGA	ENSG00000105472	CLEC11A
ENSG00000131269	ABCB7	ENSG00000065613	SLK
ENSG00000089009	RPL6	ENSG00000005156	LIG3
ENSG00000197780	TAF13	ENSG00000125459	MSTO1
ENSG00000036549	ZZZ3	ENSG00000139146	FAM60A
ENSG00000066135	KDM4A	ENSG00000060069	CTDP1
ENSG00000176473	WDR25	ENSG00000130935	NOL11
ENSG00000124614	RPS10	ENSG00000115677	HDLBP
ENSG00000107581	EIF3A	ENSG00000105254	TBCB
ENSG00000084463	WBP11	ENSG00000075539	FRYL

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000137656	BUD13	ENSG00000196747	HIST1H2AI
ENSG00000183751	TBL3	ENSG00000181513	ACBD4
ENSG00000119537	KDSR	ENSG00000153107	ANAPC1
ENSG00000204220	PFDN6	ENSG00000160211	G6PD
ENSG00000170291	ELP5	ENSG00000111481	COPZ1
ENSG00000198563	DDX39B	ENSG00000070761	C16orf80
ENSG00000077549	CAPZB	ENSG00000168924	LETM1
ENSG00000255529	POLR2M	ENSG00000105058	FAM32A
ENSG00000100034	PPM1F	ENSG00000204569	PPP1R10
ENSG00000196367	TRRAP	ENSG00000153914	SREK1
ENSG00000167258	CDK12	ENSG00000161509	GRIN2C
ENSG00000039123	SKIV2L2	ENSG00000162702	ZNF281
ENSG00000076043	REXO2	ENSG00000004939	SLC4A1
ENSG00000213676	ATF6B	ENSG00000139620	KANSL2
ENSG00000058453	CROCC	ENSG00000025293	PHF20
ENSG00000153575	TUBGCP5	ENSG00000158545	ZC3H18
ENSG00000110700	RPS13	ENSG00000142546	NOSIP
ENSG00000101181	MTG2	ENSG00000143398	PIP5K1A
ENSG00000071539	TRIP13	ENSG00000197958	RPL12
ENSG00000075702	WDR62	ENSG00000067225	PKM
ENSG00000171453	POLR1C	ENSG00000172534	HCFC1
ENSG00000090989	EXOC1	ENSG00000155438	MKI67IP
ENSG00000037897	METTL1	ENSG00000166582	CENPV
ENSG00000095139	ARCN1	ENSG00000145912	NHP2
ENSG00000078142	PIK3C3	ENSG00000180992	MRPL14
ENSG00000141030	COPS3	ENSG00000118705	RPN2
ENSG00000126249	PDCD2L	ENSG00000163161	ERCC3
ENSG00000117408	IPO13	ENSG00000136819	C9orf78
ENSG00000130725	UBE2M	ENSG00000124787	RPP40
ENSG00000175054	ATR	ENSG00000179104	TMTC2
ENSG00000149016	TUT1	ENSG00000140694	PARN
ENSG00000165060	FXN	ENSG00000143751	SDE2
ENSG00000117597	DIEXF	ENSG00000136997	MYC
ENSG00000185085	INTS5	ENSG00000147274	RBMX
ENSG00000113595	TRIM23	ENSG00000084693	AGBL5
ENSG00000040633	PHF23	ENSG00000165271	NOL6
ENSG00000178952	TUFM	ENSG00000221838	AP4M1

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000120539	MASTL	ENSG00000171444	MCC
ENSG00000103549	RNF40	ENSG00000101882	NKAP
ENSG00000119723	COQ6	ENSG00000186847	KRT14
ENSG00000171311	EXOSC1	ENSG00000014824	SLC30A9
ENSG00000106245	BUD31	ENSG00000166685	COG1
ENSG00000118046	STK11	ENSG00000108349	CASC3
ENSG00000125484	GTF3C4	ENSG00000175216	CKAP5
ENSG00000089094	KDM2B	ENSG00000259494	MRPL46
ENSG00000121621	KIF18A	ENSG00000028310	BRD9
ENSG00000129911	KLF16	ENSG00000136450	SRSF1
ENSG00000102302	FGD1	ENSG00000204859	ZBTB48
ENSG00000135679	MDM2	ENSG00000165209	STRBP
ENSG00000185115	NDNL2	ENSG00000163466	ARPC2
ENSG00000140553	UNC45A	ENSG00000125485	DDX31
ENSG00000129562	DAD1	ENSG00000070778	PTPN21
ENSG00000100138	NHP2L1	ENSG00000126001	CEP250
ENSG00000111641	NOP2	ENSG00000169249	ZRSR2
ENSG00000173660	UQCRH	ENSG00000111011	RSRC2
ENSG00000198677	TTC37	ENSG00000139496	NUPL1
ENSG00000135503	ACVR1B	ENSG00000131746	TNS4
ENSG00000180998	GPR137C	ENSG00000061936	SFSWAP
ENSG00000153187	HNRNPU	ENSG00000196584	XRCC2
ENSG00000106459	NRF1	ENSG00000168286	THAP11
ENSG00000156261	CCT8	ENSG00000119787	ATL2
ENSG00000118363	SPCS2	ENSG00000182446	NPLOC4
ENSG00000164134	NAA15	ENSG00000071462	WBSCR22
ENSG00000060642	PIGV	ENSG00000213397	HAUS7
ENSG00000090889	KIF4A	ENSG00000178028	DMAP1
ENSG00000101361	NOP56	ENSG00000067596	DHX8
ENSG00000167792	NDUFV1	ENSG00000198015	MRPL42
ENSG00000184162	NR2C2AP	ENSG00000133706	LARS
ENSG00000128524	ATP6V1F	ENSG00000149635	OCSTAMP
ENSG00000100387	RBX1	ENSG00000117505	DR1
ENSG00000110906	KCTD10	ENSG00000155868	MED7
ENSG00000147457	CHMP7	ENSG00000129197	RPAIN
ENSG00000124570	SERPINB6	ENSG00000065978	YBX1
ENSG00000186468	RPS23	ENSG00000260238	PMF1-BGLAP

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000136122	BORA	ENSG00000178988	MRFAP1L1
ENSG00000047249	ATP6V1H	ENSG00000168005	C11orf84
ENSG00000127804	METTL16	ENSG00000162408	NOL9
ENSG00000104412	EMC2	ENSG00000140350	ANP32A
ENSG00000173726	TOMM20	ENSG00000261796	ISY1-RAB43
ENSG00000138777	PPA2	ENSG00000174405	LIG4
ENSG00000170043	TRAPPC1	ENSG00000197414	GOLGA6L1
ENSG00000124486	USP9X	ENSG00000116062	MSH6
ENSG00000105705	SUGP1	ENSG00000116906	GNPAT
ENSG00000223501	VPS52	ENSG00000134597	RBMX2
ENSG00000107815	C10orf2	ENSG00000071994	PDCD2
ENSG00000100109	TFIP11	ENSG00000112742	TTK
ENSG00000136271	DDX56	ENSG00000106636	YKT6
ENSG00000146830	GIGYF1	ENSG00000101773	RBBP8
ENSG00000198382	UVRAG	ENSG00000103061	SLC7A6OS
ENSG00000160285	LSS	ENSG00000140259	MFAP1
ENSG00000137770	CTDSPL2	ENSG00000197077	KIAA1671
ENSG00000116670	MAD2L2	ENSG00000204435	CSNK2B
ENSG00000165280	VCP	ENSG00000055130	CUL1
ENSG00000183963	SMTN	ENSG00000100209	HSCB
ENSG00000164961	KIAA0196	ENSG00000113048	MRPS27
ENSG00000157216	SSBP3	ENSG00000189403	HMGB1
ENSG00000129932	DOHH	ENSG00000173011	TADA2B
ENSG00000167721	TSR1	ENSG00000169836	TACR3
ENSG00000188352	FOCAD	ENSG00000133816	MICAL2
ENSG00000104853	CLPTM1	ENSG00000141452	C18orf8
ENSG00000185883	ATP6V0C	ENSG00000006715	VPS41
ENSG00000100519	PSMC6	ENSG00000136518	ACTL6A
ENSG00000110107	PRPF19	ENSG00000100297	MCM5
ENSG00000184203	PPP1R2	ENSG00000165898	ISCA2
ENSG00000148824	MTG1	ENSG00000156384	SFR1
ENSG00000113810	SMC4	ENSG00000145414	NAF1
ENSG00000121152	NCAPH	ENSG00000101972	STAG2
ENSG00000241127	YAE1D1	ENSG00000112658	SRF
ENSG00000139197	PEX5	ENSG00000162736	NCSTN
ENSG00000101464	PIGU	ENSG00000103266	STUB1
ENSG00000132676	DAP3	ENSG00000008018	PSMB1

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000135972	MRPS9	ENSG00000149506	ZP1
ENSG00000089157	RPLP0	ENSG00000111530	CAND1
ENSG00000138035	PNPT1	ENSG00000027001	MIPEP
ENSG00000171824	EXOSC10	ENSG00000152266	PTH
ENSG00000153179	RASSF3	ENSG00000154174	TOMM70A
ENSG00000110713	NUP98	ENSG00000164045	CDC25A
ENSG00000100865	CINP	ENSG00000164758	MED30
ENSG00000136045	PWP1	ENSG00000160401	C9orf117
ENSG00000167526	RPL13	ENSG00000155959	VBP1
ENSG00000088766	CRLS1	ENSG00000105409	ATP1A3
ENSG00000103510	KAT8	ENSG00000175106	TVP23C
ENSG00000143368	SF3B4	ENSG00000185950	IRS2
ENSG00000156697	UTP14A	ENSG00000149256	TENM4
ENSG00000176248	ANAPC2	ENSG00000116957	TBCE
ENSG00000188786	MTF1	ENSG00000154719	MRPL39
ENSG00000175756	AURKAIP1	ENSG00000105364	MRPL4
ENSG00000140395	WDR61	ENSG00000198218	QRICH1
ENSG00000113368	LMNB1	ENSG00000013503	POLR3B
ENSG00000060339	CCAR1	ENSG00000126756	UXT
ENSG00000162385	MAGOH	ENSG00000184988	TMEM106A
ENSG00000105372	RPS19	ENSG00000186432	KPNA4
ENSG00000083312	TNPO1	ENSG00000156304	SCAF4
ENSG00000100142	POLR2F	ENSG00000090565	RAB11FIP3
ENSG00000204560	DHX16	ENSG00000163508	EOMES
ENSG00000197771	MCMBP	ENSG00000147003	TMEM27
ENSG00000099817	POLR2E	ENSG00000198730	CTR9
ENSG00000161980	POLR3K	ENSG00000105321	CCDC9
ENSG00000117133	RPF1	ENSG00000120333	MRPS14
ENSG00000125901	MRPS26	ENSG00000121680	PEX16
ENSG00000168827	GFM1	ENSG00000088205	DDX18
ENSG00000161513	FDXR	ENSG00000132432	SEC61G
ENSG00000137818	RPLP1	ENSG00000186329	TMEM212
ENSG00000150990	DHX37	ENSG00000094804	CDC6
ENSG00000061794	MRPS35	ENSG00000169084	DHRSX
ENSG00000143155	TIPRL	ENSG00000107618	RBP3
ENSG00000253626	EIF5AL1	ENSG00000146426	TIAM2
ENSG00000231500	RPS18	ENSG00000198925	ATG9A

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000188076	SCGB1C1	ENSG00000168242	HIST1H2BI
ENSG00000174442	ZWILCH	ENSG00000254772	EEF1G
ENSG00000242028	HYPK	ENSG00000090971	NAT14
ENSG00000124217	MOCS3	ENSG00000144381	HSPD1
ENSG00000134186	PRPF38B	ENSG00000127774	EMC6
ENSG00000105849	TWISTNB	ENSG00000126259	KIRREL2
ENSG00000137337	MDC1	ENSG00000111364	DDX55
ENSG00000132207	SLX1A	ENSG00000100749	VRK1
ENSG00000181625	SLX1B	ENSG00000159063	ALG8
ENSG00000110717	NDUFS8	ENSG00000163795	ZNF513
ENSG00000132341	RAN	ENSG00000068394	GPKOW
ENSG00000014123	UFL1	ENSG00000112659	CUL9
ENSG00000101191	DIDO1	ENSG00000187257	RSBN1L
ENSG00000125952	MAX	ENSG00000172167	MTBP
ENSG00000163714	U2SURP	ENSG00000176177	ENTHD1
ENSG00000253710	ALG11	ENSG00000166783	KIAA0430
ENSG00000104356	POP1	ENSG00000165006	UBAP1
ENSG00000130826	DKC1	ENSG00000188958	UTS2B
ENSG00000198780	FAM169A	ENSG00000136247	ZDHHC4
ENSG00000116688	MFN2	ENSG00000196363	WDR5
ENSG00000166166	TRMT61A	ENSG00000116661	FBXO2
ENSG00000214517	PPME1	ENSG00000113013	HSPA9
ENSG00000077235	GTF3C1	ENSG00000090061	CCNK
ENSG00000152240	HAUS1	ENSG00000051596	THOC3
ENSG00000063177	RPL18	ENSG00000140534	TICRR
ENSG00000087157	PGS1	ENSG00000100216	TOMM22
ENSG00000100567	PSMA3	ENSG00000104613	INTS10
ENSG00000169371	SNUPN	ENSG00000183474	GTF2H2C
ENSG00000197651	CCER1	ENSG00000159128	IFNGR2
ENSG00000198900	TOP1	ENSG00000243725	TTC4
ENSG00000213551	DNAJC9	ENSG00000102898	NUTF2
ENSG00000152464	RPP38	ENSG00000170515	PA2G4
ENSG00000131467	PSME3	ENSG00000117036	ETV3
ENSG00000223510	CDRT15	ENSG00000196262	PPIA
ENSG00000115053	NCL	ENSG00000153037	SRP19
ENSG00000163041	H3F3A	ENSG00000135801	TAF5L
ENSG00000154813	DPH3	ENSG00000119414	PPP6C

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000181873	IBA57	ENSG00000141013	GAS8
ENSG00000185591	SP1	ENSG00000113845	TIMMDC1
ENSG00000115355	CCDC88A	ENSG00000175826	CTDNEP1
ENSG00000139350	NEDD1	ENSG00000117543	DPH5
ENSG00000108518	PFN1	ENSG00000204779	FOXD4L5
ENSG00000108264	TADA2A	ENSG00000112249	ASCC3
ENSG00000134809	TIMM10	ENSG00000152256	PDK1
ENSG00000124383	MPHOSPH10	ENSG00000169217	CD2BP2
ENSG00000126067	PSMB2	ENSG00000166246	C16orf71
ENSG00000060688	SNRNP40	ENSG00000184164	CRELD2
ENSG00000042429	MED17	ENSG00000107960	OBFC1
ENSG00000196655	TRAPPC4	ENSG00000102384	CENPI
ENSG00000107185	RGP1	ENSG00000079785	DDX1
ENSG00000124608	AARS2	ENSG00000133858	ZFC3H1
ENSG00000092098	RNF31	ENSG00000184110	EIF3C
ENSG00000143569	UBAP2L	ENSG00000146700	SRCRB4D
ENSG00000233822	HIST1H2BN	ENSG00000163380	LMOD3
ENSG00000171848	RRM2	ENSG00000116273	PHF13
ENSG00000183161	FANCF	ENSG00000178229	ZNF543
ENSG00000166197	NOLC1	ENSG00000109475	RPL34
ENSG00000064703	DDX20	ENSG00000156469	MTERFD1
ENSG00000176102	CSTF3	ENSG00000155827	RNF20
ENSG00000106028	SSBP1	ENSG00000213741	RPS29
ENSG00000143315	PIGM	ENSG00000165792	METTL17
ENSG00000136152	COG3	ENSG00000110844	PRPF40B
ENSG00000134697	GNL2	ENSG00000100842	EFS
ENSG00000159217	IGF2BP1	ENSG00000087495	PHACTR3
ENSG00000080608	KIAA0020	ENSG00000126261	UBA2
ENSG00000267368	UPK3BL	ENSG00000136718	IMP4
ENSG00000130119	GNL3L	ENSG00000091640	SPAG7
ENSG00000178950	GAK	ENSG00000184886	PIGW
ENSG00000205659	LIN52	ENSG00000184313	MROH7
ENSG00000123297	TSFM	ENSG00000163481	RNF25
ENSG00000241370	RPP21	ENSG00000137054	POLR1E
ENSG00000129351	ILF3	ENSG00000213085	CCDC19
ENSG00000174446	SNAPC5	ENSG00000171858	RPS21
ENSG00000132382	MYBBP1A	ENSG00000130822	PNCK

ID в Ensembl	Символ гена	ID в Ensembl	Символ гена
ENSG00000100664	EIF5	ENSG00000145216	FIP1L1
ENSG00000131469	RPL27	ENSG00000147130	ZMYM3
ENSG00000185128	TBC1D3F	ENSG00000008086	CDKL5
ENSG00000111231	GPN3	ENSG00000165282	PIGO
ENSG00000182774	RPS17L	ENSG00000038358	EDC4
ENSG00000184779	RPS17	ENSG00000134684	YARS
ENSG00000186871	ERCC6L	ENSG00000153832	FBXO36
ENSG00000204568	MRPS18B	ENSG00000140006	WDR89
ENSG00000108312	UBTF	ENSG00000104643	MTMR9
ENSG00000167965	MLST8	ENSG00000151779	NBAS
ENSG00000115241	PPM1G	ENSG00000077348	EXOSC5
ENSG00000171103	TRMT61B	ENSG00000131043	AAR2
ENSG00000116586	LAMTOR2	ENSG00000160193	WDR4
ENSG00000105793	GTPBP10	ENSG00000140691	ARMC5
ENSG00000100348	TXN2	ENSG00000141959	PFKL
ENSG00000172757	CFL1	ENSG00000112053	SLC26A8
ENSG00000163634	THOC7	ENSG00000197111	PCBP2
ENSG00000008324	SS18L2	ENSG00000145191	EIF2B5
ENSG00000152404	CWF19L2	ENSG00000140988	RPS2
ENSG00000020129	NCDN	ENSG00000181472	ZBTB2

[0619] Используемые в данном документе символы генов (в том числе в таблицах 3 и 4) приведены на основе тех, которые встречаются в ресурсе Комитета по номенклатуре генов человека (HGNC), в котором можно осуществлять поиск во Всемирной паутине по адресу www.genenames.org. ID в Ensembl предусмотрены для каждого символа гена, и по ним можно осуществлять поиск во Всемирной паутине по адресу www.ensembl.org.

[0620] Гены, представленные в таблицах 3 и 4, являются неограничивающими примерами существенных генов. Хотя специалисту в данной области будут очевидны дополнительные существенные гены, исходя из знаний в данной области техники, пригодность конкретного гена для применения в соответствии с настоящим изобретением можно определить, например, как обсуждается в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления конкретный существенный ген может быть отобран путем анализа потенциальных нецелевых сайтов в других местах генома. В некоторых вариантах осуществления для способов, описанных в данном документе, отбирают только существенные гены с одним или несколькими сайтами-мишенями для gRNA, которые являются уникальными в геноме человека. В некоторых вариантах осуществления для способов, описанных в данном документе, отбирают только существенные гены с одним или несколькими сайтами-мишенями для gRNA, которые обнаруживаются только в одном другом локусе в геноме человека. В некоторых вариантах осуществления для способов,

описанных в данном документе, отбирают только существенные гены с одним или несколькими сайтами-мишенями для gRNA, которые обнаруживаются только в двух других локусах в геноме человека.

Представляющий интерес продукт гена

[0621] Способы, системы и клетки по настоящему изобретению обеспечивают интеграцию представляющего интерес гена в существенный ген клетки. Представляющий интерес ген может кодировать любой представляющий интерес продукт гена. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена включает в себя антитело, антиген, фермент, фактор роста, рецептор (например, клеточной поверхности, цитоплазматический или ядерный), гормон, лимфокин, цитокин, хемокин, репортер, функциональный фрагмент любого из вышеперечисленных или комбинацию любых вышеперечисленных.

[0622] В некоторых вариантах осуществления последовательность представляющего интерес продукта гена может включать в себя без ограничения прокариотические последовательности, кДНК из эукариотической мРНК, последовательности геномной ДНК из эукариотической ДНК (например, ДНК млекопитающих) и синтетические последовательности ДНК. Например, представляющий интерес ген может кодировать miRNA, shRNA, нативный полипептид (т. е. полипептид, обнаруживаемый в природе) или его фрагмент; вариант полипептида (т. е. мутантную форму нативного полипептида, характеризующуюся менее чем 100% идентичностью последовательности с нативным полипептидом) или его фрагмент; сконструированный полипептид или пептидный фрагмент, терапевтический пептид или полипептид, визуализационный маркер, селектируемый маркер, сигнал разрушения и т. п.

[0623] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой без ограничения, например, терапевтический белок или продукт гена, который придает желаемый признак модифицированной клетке. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует репортерный белок, такой как флуоресцентный белок (например, описанный в данном документе) и фермент (например, люциферазу и lacZ). В некоторых вариантах осуществления репортерный ген может способствовать отслеживанию терапевтических клеток после их введения субъекту.

[0624] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой без ограничения терапевтические белки, такие как белок, дефицит которого наблюдается у пациента. В некоторых вариантах осуществления, например, терапевтические белки включают без ограничения те, дефицит которых наблюдается при лизосомных болезнях накопления, такие как альфа-L-идуронидаза, арилсульфатаза A, бета-глюкоцереброзидаза, кислая сфингомиелиназа и альфа- и бета-галактозидаза; и те, дефицит которых наблюдается при гемофилии, такие как фактор VIII и фактор IX. Другие примеры терапевтических белков включают без ограничения антитела или фрагменты антител (например, scFv), такие как те, которые нацелены на патогенные белки (например, тау-белок, альфа-синуклеин и бета-амилоидный белок), и те, которые нацелены на раковые клетки (например, химерные антигенные рецепторы (CAR), описанные в данном документе).

[0625] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой белок, участвующий в иммунной регуляции, или иммуномодулирующий белок. В некоторых вариантах осуществления, например, такие белки представляют собой PD-L1, CTLA-4, M-CSF, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, TGF-β1 и их различные изоформы. В качестве примера, в некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой изоформу HLA-G (например, HLA-G1, -G2, -G3, -G4, -G5, -G6 или -G7) или HLA-E; аллогенные клетки, экспрессирующие

такую неклассическую молекулу MHC класса I, могут быть менее иммуногенными и лучше переносимыми при трансплантации пациенту-человеку, который не является источником клеток, что делает возможной "универсальную" клеточную терапию.

[0626] В некоторых вариантах осуществления иллюстративный представляющий интерес продукт гена представляет собой такой продукт, который придает клетке терапевтическую ценность, например, новую терапевтическую активность. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные представляющие интерес продукты генов представляют собой полипептиды, такие как химерный антигенный рецептор (CAR) или его антигенсвязывающий фрагмент, Т-клеточный рецептор или его антигенсвязывающий фрагмент, не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любая комбинация двух или более из них. Следует понимать, что способы и клетки по настоящему изобретению не ограничиваются каким-либо конкретным представляющим интерес продуктом гена, и что выбор представляющего интерес продукта гена будет зависеть от типа клетки и конечного применения клеток.

[0627] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления экспрессия цитокина из модифицированной клетки, полученной посредством способа, описанного в данном документе, позволяет локально вводить дозу цитокина *in vivo* (например, в организме нуждающегося в этом субъекта) и/или устраняет необходимость системного введения высокой дозы цитокина нуждающемуся в этом субъекту (например, может быть введена более низкая доза цитокина). В некоторых вариантах осуществления снижается риск ограничивающей дозу токсичности, ассоциированной с введением цитокина, при сохранении опосредованных цитокином функций клеток. В некоторых вариантах осуществления для содействия функции клеток без необходимости дополнительного введения высоких доз растворимых цитокинов частичный или полный пептид одного или нескольких из IL2, IL4, IL6, IL7, IL9, IL10, IL11, IL12, IL15, IL18, IL21, IFN-α, IFN-β и/или их соответствующих рецепторов вводят в клетку для обеспечения передачи сигналов, опосредованной цитокином, с экспрессией самого цитокина или без нее, за счет чего обеспечивается поддержание или улучшение роста, пролиферации, размножения и/или эффекторной функции клеток при сниженном риске развития форм токсичности цитокинов. В некоторых вариантах осуществления введенный цитокин и/или его соответствующий нативный или модифицированный рецептор для передачи сигналов, опосредованной цитокином, экспрессируются на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления передача сигналов, опосредованная цитокином, активируется конститутивно. В некоторых вариантах осуществления активация передачи сигналов, опосредованной цитокином, является индуцируемой. В некоторых вариантах осуществления активация передачи сигналов, опосредованной цитокином, является транзиентной и/или временной. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой IL2, IL3, IL4, IL6, IL7, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL21, GM-CSF, IFN-a, IFN-b, IFN-g, эритропоэтин и/или соответствующий рецептор цитокина. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой CCL3, TNFα, CCL23, IL2RB, IL12RB2 или IRF7.

[0628] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой хемокин и/или соответствующий рецептор хемокина. В некоторых вариантах осуществления рецептор хемокина может представлять собой без ограничения CCR2, CCR5, CCR8, CX3C1, CX3CR1, CXCR1, CXCR2, CXCR3A, CXCR3B или CXCR2. В некоторых вариантах осуществления хемокин может представлять собой без ограничения CCL7, CCL19 или CXL14.

[0629] Используемый в данном документе термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" относится к рецепторному белку, который был модифицирован для придания клеткам, экспрессирующим CAR, новой способности нацеливаться на конкретный белок. В контексте настоящего изобретения клетка, модифицированная таким образом, чтобы она содержала CAR или антигенсвязывающий фрагмент, может применяться в иммунотерапии для нацеливания на клетки, ассоциированные с заболеванием или нарушением, например, раковые клетки, и их уничтожения. В некоторых вариантах осуществления CAR может связываться с любым представляющим интерес антигеном.

[0630] Представляющие интерес CAR может включать без ограничения CAR, нацеленный на мезотелин, EGFR, HER2 и/или MICA/B. На сегодняшний день терапия Т-клетками с CAR, нацеленным на мезотелин, продемонстрировала ранние свидетельства эффективности в клиническом испытании фазы I с участием субъектов, у которых имеется мезотелиома, немелкоклеточный рак легкого и рак молочной железы (NCT02414269). Аналогично, CAR, нацеленные на EGFR, HER2 и MICA/B, продемонстрировали многообещающие результаты в ранних исследованиях (см., например, Li et al. (2018), *Cell Death & Disease*, 9(177); Han et al. (2018) Am. J. Cancer Res., 8(1):106-119 и Demoulin 2017 Future Oncology, 13(8)); полное содержание каждой из которых явным образом включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0631] CAR хорошо известны средним специалистам в данной области и включают CAR, которые описаны, например, в: WO13/063419 (мезотелин), WO15/164594 (EGFR), WO13/063419 (HER2), WO16/154585 (MICA и MICB), полное содержание каждой из которых явным образом включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена представляет собой любой подходящий CAR, CAR, специфичный в отношении NK-клеток (NK-CAR), CAR, специфичный в отношении Т-клеток, или другую связывающую структуру, которая нацеливает клетку, например, NK-клетку, на клетку-мишень, например, клетку, ассоциированную с заболеванием или нарушением, и может экспрессироваться в модифицированных клетках, предусмотренных в данном документе. Иллюстративные CAR и связывающие структуры включают без ограничения биспецифические антигенсвязывающие CAR, переключаемые CAR, димеризуемые CAR, расщепленные CAR, многоцепочечные CAR, индуцируемые CAR, CAR и связывающие структуры, которые связывают BCMA, рецептор андрогена, PSMA, PSCA, Muc1, вирусные пептиды HPV (например, E7), вирусные пептиды EBV, WT1, CEA, EGFR, EGFRvIII, IL13Rα2, GD2, CA125, EpCAM, Muc16, карбоангидразу IX (CAIX), CCR1, CCR4, раково-эмбриональный антиген (CEA), CD3, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD26, CD30, CD33, CD34, CD35, CD38, CD41, CD44, CD44V6, CD49f, CD56, CD70, CD92, CD99, CD123, CD133, CD135, CD148, CD150, CD261, CD362, CLEC12A, MDM2, CYP1B, ливин, циклин 1, NKp30, NKp46, DNAM1, NKp44, CA9, PD1, PDL1, антиген цитомегаловируса (CMV), эпителиальный гликопротеин-40 (EGP-40), GPRC5D, рецепторные тирозинкиназы erb-B2,3,4, EGFIR, ERBB, фолатсвязывающий белок (FBP), фетальный ацетилхолиновый рецептор (AChR), рецептор фолиевой кислоты-a, ганглиозид G3 (GD3), рецептор эпидермального фактора роста 2 человека (HER-2),

обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), ICAM-1, интегрин B7, субъединицу альфа-2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13Ra2), легкую K-цепь, рецептор с доменом, содержащим киназную вставку (KDR), антиген A системы Льюис (CA19.9), антиген Y системы Льюис (Le Y), молекулу клеточной адгезии L1 (LI-CAM), LILRB2, представителя 1 семейства A антигенов меланомы (MAGE-Al), MICA/B, муцин 16 (Muc-16), NKCSI, лиганды NKG2D, c-Met, раково-тестикулярный антиген NYES0-1, онкофетальный антиген (h5T4), PRAME, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), PRAME, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG-72), TIM-3, TRBCI, TRBC2, фактор роста эндотелия сосудов R2 (VEGF-R2), белок опухоли Вильмса (WT-1), антиген патогена или любую их подходящую комбинацию. Дополнительные подходящие CAR и связывающие структуры для применения в модифицированных клетках, предусмотренных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области на основании настоящего раскрытия и общедоступных сведений из уровня техники. Такие дополнительные подходящие CAR включают CAR, описанные на фигуре 3 из Davies and Maher, *Adoptive T-cell Immunotherapy of Cancer Using Chimeric Antigen Receptor-Grafted T Cells*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 58(3):165-78 (2010), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные CAR, подходящие для описанных в данном документе способов, включают: CAR, специфичные в отношении CD171 (Park et al., Mol Ther (2007) l5(4):825-833), CAR, специфичные в отношении EGFRvIII (Morgan et al, Hum Gene Ther (2012) 23(10): 1043-1053), CAR, специфичные в отношении EGF-R (Kobold et al, J Natl Cancer Inst (2014) 107(1):364), CAR, специфичные в отношении карбоангидразы K (Lamers et al., Biochem Soc Trans (2016) 44(3):951-959), CAR, специфичные в отношении FR-a (Kershaw et al., Clin Cancer Res (2006) 12(20):6106-6015), CAR, специфичные в отношении HER2 (Ahmed et al., J Clin Oncol (2015) 33(15)1688-1696; Nakazawa et al., Mol Ther (2011) 19(12):2133-2143; Ahmed et al., Mol Ther (2009) 17(10): 1779-1787; Luo et al., Cell Res (2016) 26(7):850-853; Morgan et al., Mol Ther (2010) l8(4):843-851; Grada et al., Mol Ther Nucleic Acids (2013) 9(2):32), CAR, специфичные в отношении CEA (Katz et al., Clin Cancer Res (2015) 21 (14):3149-3159), CAR, специфичные в отношении IL13Ra2 (Brown et al., Clin Cancer Res (2015) 21(18):4062-4072), CAR, специфичные в отношении GD2 (Louis et al., Blood (2011) 118(23):6050-6056; Caruana et al., Nat Med (2015) 21(5):524-529), CAR, специфичные в отношении ErbB2 (Wilkie et al., J Clin Immunol (2012) 32(5): 1059-1070), CAR, специфичные в отношении VEGF-R (Chinnasamy et al., Cancer Res (2016) 22(2):436-447), CAR, специфичные в отношении FAP (Wang et al., Cancer Immunol Res (2014) 2(2): 154-166), CAR, специфичные в отношении MSLN (Moon et al., Clin Cancer Res (2011) 17(14):4719-30), CAR, специфичные в отношении CD19 (аксикабтаген цилолейсел (Yescarta®) и тисагенлеклейсел (Kymriah®)). См. также Li et al., J Hematol and Oncol (2018) 11(22), где приведен обзор клинических испытаний опухолеспецифических CAR.

[0632] Используемый в данном документе термин "CD16" относится к рецептору (FcγRIII) Fc-части иммуноглобулина G, и он участвует в удалении комплексов антиген-антитело из кровотока, а также в других антителозависимых ответах. В некоторых вариантах осуществления белок CD16 представляет собой вариант hCD16. В некоторых вариантах осуществления вариант hCD16 представляет собой высокоаффинный вариант F158V.

[0633] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена включает в себя высокоаффинный нерасщепляемый CD16 (hnCD16) или его вариант. В некоторых вариантах осуществления высокоаффинный нерасщепляемый CD16 или его вариант содержит по меньшей мере одно из следующего: (a) F176V и S197P в эктодоменном домене CD16 (см., например, Jing et al., Identification of

an ADAM17 Cleavage Region in Human CD16 (FcγRIII) and the Engineering of a Non-Cleavable Version of the Receptor in NK Cells; *PLOS One,* 2015); (b) полный или частичный эктодомен, происходящий из CD64; (c) ненативный (или происходящий не из CD16) трансмембранный домен; (d) ненативный (или происходящий не из CD16) внутриклеточный домен; (e) ненативный (или происходящий не из CD16) сигнальный домен; (f) ненативный стимулирующий домен; и (g) трансмембранные, сигнальные и стимулирующие домены, которые происходят не из CD16, а происходят из одного и того же или разных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления ненативный трансмембранный домен получен из полипептида CD3D, CD3E, CD3G, CD3s, CD4, CD5, CD5a, CD5b, CD27, CD2S, CD40, CDS4, CD166, 4-1BB, OX40, ICOS, ICAM-1, CTLA-4, PD-1, LAG-3, 2B4, BTLA, CD16, IL7, IL12, IL15, KIR2DL4, KIR2DS1, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2C, NKG2D или Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления ненативный стимулирующий домен получен из полипептида CD27, CD2S, 4-1BB, OX40, ICOS, PD-1, LAG-3, 2B4, BTLA, DAP10, DAP12, CTLA-4 или NKG2D. В некоторых других вариантах осуществления ненативный сигнальный домен получен из полипептида CD3s, 2B4, DAP10, DAP12, DNAM1, CD137 (41BB), IL21, IL7, IL12, IL15, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2C или NKG2D. В некоторых конкретных вариантах осуществления варианта hnCD16 ненативный трансмембранный домен получен из NKG2D, ненативный стимулирующий домен получен из 2B4, а ненативный сигнальный домен получен из CD3. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена включает в себя высокоаффинный расщепляемый CD16 (hnCD16) или его вариант. В некоторых вариантах осуществления высокоаффинный расщепляемый CD16 или его вариант содержит по меньшей мере F176V. В некоторых вариантах осуществления высокоаффинный расщепляемый CD16 или его вариант не содержит аминокислотную замену S197P.

[0634] Используемый в данном документе термин "IL-15/IL15RA" или "интерлейкин-15" (IL-15) относится к цитокину со структурным сходством с интерлейкином-2 (IL-2). Подобно IL-2, IL-15 связывается с комплексом, состоящим из IL-2/бета-цепи рецептора IL-15 (CD122) и общей гамма-цепи (гамма-С, CD132), и передает сигнал через него. IL-15 секретируется мононуклеарными фагоцитами (и некоторыми другими клетками) после инфицирования вирусом(вирусами). Этот цитокин индуцирует клеточную пролиферацию естественных клеток-киллеров. Альфа-субъединица рецептора IL-15 (IL15RA) специфично связывает IL-15 с очень высокой аффинностью и способна связывать IL-15 независимо от других субъединиц (см., например, Mishra et al., Molecular pathways: Interleukin-15 signaling in health and in cancer, *Clinical Cancer Research*, 2014). Предполагается, что это свойство позволяет IL-15 продуцироваться одной клеткой, подвергаться эндоцитозу другой клеткой, а затем презентироваться третьей клетке. Сообщается, что IL15RA усиливает пролиферацию клеток и экспрессию ингибитора апоптоза BCL2L1/BCL2-XL и BCL2. Иллюстративные последовательности IL-15 представлены под NG_029605.2, а иллюстративные последовательности IL-15RA представлены под NM_002189.4. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15R представляет собой конститутивно активный вариант IL-15R. В некоторых вариантах осуществления конститутивно активный вариант IL-15R представляет собой продукт слияния IL-15R и агониста IL-15R, например, белка IL-15 или его фрагмента, связывающего IL-15R. В некоторых вариантах осуществления агонист IL-15R представляет собой IL-15 или его вариант, связывающий IL-15R. Иллюстративные подходящие варианты IL-15R включают без ограничения варианты, описанные, например, в Mortier E et al, 2006; The Journal of Biological Chemistry 2006 281: 1612-1619; или в Bessard-A et al., Mol Cancer Ther. 2009 Sep;8(9):2736-45, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления транс-презентация мембраносвязанного IL-15

представляет собой более эффективный путь активации, чем использование растворимого IL-15 (см., например, Imamura et al., Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15, *Blood*, 2014). В некоторых вариантах осуществления экспрессия IL-15R предусматривает: экспрессию IL15 и IL15Ra с использованием саморасщепляющегося пептида; слитый белок на основе IL15 и IL15Ra; слитый белок IL15/IL15Ra с усеченным внутриклеточным доменом IL15Ra; слитый белок на основе IL15 и мембраносвязанного домена Sushi IL15Ra; слитый белок на основе IL15 и IL15Rβ; слитый белок на основе IL-15 и общей γC рецепторов, где общая γC рецепторов является нативной или модифицированной; и/или гомодимер IL15Rβ.

[0635] Используемый в данном документе термин "IL-12" относится к интерлейкину 12 — цитокину, который воздействует на Т-клетки и естественные клетки-киллеры. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированная стволовая клетка и/или клетка-потомок содержат генетическую модификацию, которая приводит к экспрессии одного или нескольких агонистов сигнального пути интерлейкина 12 (IL12), например, IL-12, рецептора интерлейкина 12 (IL-12R) или его варианта (например, конститутивно активного варианта IL-12R, например, IL-12R, слитого с агонистом IL-12R (IL-12RA)).

[0636] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена включает в себя белок или полипептид, экспрессия которого в клетке, например, в клетке, модифицированной так, как описано в данном документе, позволяет клетке подавлять иммунное отторжение или ускользать от него после трансплантации или приживления у субъекта. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена представляет собой HLA-E, HLA-G, CTL4, CD47 или ассоциированный лиганд.

[0637] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающий фрагмент, например, рекомбинантный TCR. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный TCR может связываться с представляющим интерес антигеном, например, антигеном, выбранным из, без ограничения, CD279, CD2, CD95, CD152, CD223, CD272, TIM3, KIR, A2aR, SIRPA, CD200, CD200R, CD300, LPA5, NY-ESO, PD1, PDL1 или MAGE-A3/A6. В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с вирусным антигеном, например, антигеном вируса гепатита A, гепатита B, гепатита C (HCV), вируса папилломы человека (HPV) (например, HPV-16 (таким как E6 HPV-16 или E7 HPV-16), HPV-18, HPV-31, HPV-33 или HPV-35), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса герпеса человека 8 типа (HHV-8), вируса Т-клеточного лейкоза человека 1 типа (HTLV-1), вируса Т-клеточного лейкоза человека 2 типа (HTLV-2) или цитомегаловируса (CMV).

[0638] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент, который может связываться с CD47, PD1, CTLA4, CD28, OX40, 4-1BB и их лигандами.

[0639] Используемый в данном документе термин "HLA-G" относится к неклассическим паралогам тяжелой цепи HLA класса I. Эта молекула класса I представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи и легкой цепи (бета-2-микроглобулина). Тяжелая цепь заякорена в мембране. HLA-G экспрессируется на фетальных клетках плаценты. HLA-G является лигандом для ингибирующего рецептора KIR2DL4 NK-клеток, и поэтому экспрессия этого HLA трофобластом защищает его от гибели, опосредованной NK-клетками. См., например, Favier et al., Tolerogenic Function of Dimeric Forms of HLA-G

Recombinant Proteins: A Comparative Study In Vivo PLOS One 2011, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Иллюстративная последовательность HLA-G представлена под NG_029039.1.

[0640] Используемый в данном документе термин "HLA-E" относится к альфа-цепи E антигена гистосовместимости HLA класса I, также иногда называемой антигеном E MHC класса I. Белок HLA-E у людей кодируется геном HLA-E. HLA-E человека представляет собой неклассическую молекулу MHC класса I, которая характеризуется ограниченным полиморфизмом и более низкой экспрессией на клеточной поверхности, чем его классические паралоги. Эта молекула класса I представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи и легкой цепи (бета-2-микроглобулина). Тяжелая цепь заякорена в мембране. HLA-E связывает ограниченную подгруппу пептидов, происходящих из лидерных пептидов других молекул класса I. Клетки, экспрессирующие HLA-E, избегают аллогенных ответов и лизиса NK-клетками. См., например, Geornalusse-G et al., Nature Biotechnology 2017 35(8), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Иллюстративные последовательности белка HLA-E представлены под NM_005516.6.

[0641] Используемый в данном документе термин "CD47", также иногда называемый "интегрин-ассоциированным белком" (IAP), относится к трансмембранному белку, который у человека кодируется геном CD47. CD47 принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, является партнером мембранных интегринов, а также связывает лиганды тромбоспондин-1 (TSP-1) и сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPα). CD47 выступает в качестве сигнала для макрофагов, который позволяет клеткам, экспрессирующим CD47, избегать атаки макрофагов. См., например, Deuse-T, et al., Nature Biotechnology 2019 37: 252–258, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0642] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена включает в себя химерный переключающий рецептор (см., например, WO2018094244A1 - TGFBeta Signal Converter; Ankri et al., Human T cells Engineered to express a programmed death 1/28 costimulatory retargeting molecule display enhanced antitumor activity, *The Journal of Immunology,* October 15, 2013, 191; Roth et al., Pooled knockin targeting for genome engineering of cellular immunotherapies, *Cell.* 2020 Apr 30;181(3):728-744.e21; и Boyerinas et al., A Novel TGF-β2/Interleukin Receptor Signal Conversion Platform That Protects CAR/TCR T Cells from TGF-β2-Mediated Immune Suppression and Induces T Cell Supportive Signaling Networks, *Blood,* 2017). В некоторых вариантах осуществления химерные переключающие рецепторы представляют собой сконструированные рецепторы клеточной поверхности, содержащие внеклеточный домен эндогенного рецептора клеточной поверхности и гетерологичный внутриклеточный сигнальный домен, так что распознавание лиганда внеклеточным доменом приводит к активации сигнального каскада, отличного от каскада, активируемого формой дикого типа рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления химерный переключающий рецептор содержит внеклеточный домен ингибирующего рецептора клеточной поверхности, слитый с внутриклеточным доменом, что приводит к передаче активирующего сигнала, а не ингибирующего сигнала, обычно передаваемого ингибирующим рецептором клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления внеклеточные домены, полученные из рецепторов клеточной поверхности, о которых известно, что они ингибируют активацию иммунных эффекторных клеток, могут быть слиты с активирующими внутриклеточными доменами. В таком варианте осуществления взаимодействие с соответствующим лигандом может затем приводить к активации сигнальных каскадов, которые усиливают, а не ингибируют активацию иммунной эффекторной клетки.

Например, в некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена представляет собой переключающий рецептор PD1-CD28, в котором внеклеточный домен PD1 слит с внутриклеточным сигнальным доменом CD28 (см., например, Liu et al., Cancer Res 76:6 (2016), 1578-1590 и Moon et al., Molecular Therapy 22 (2014), S201). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт кодирующего гена представляет собой или содержит внеклеточный домен CD200R и внутриклеточный сигнальный домен CD28 (см. Oda et al., Blood 130:22 (2017), 2410-2419).

[0643] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена представляет собой репортерный ген (например, GFP, mCherry и т. д.). В некоторых вариантах осуществления репортерный ген используется для подтверждения пригодности экспрессионной способности нокин-кассеты. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой красящий или флуоресцентный белок, такой как синие/UV-белки, например, TagBFP, mTagBFP2, Azurite, EBFP2, mKalamal, Sirius, Sapphire, T-Sapphire; голубые белки, например, ECFP, Cerulean, SCFP3A, mTurquoise, mTurquoise2, мономерный Midoriishi-Cyan, TagCFP, mTFP1; зеленые белки, например, EGFP, Emerald, суперсворачивающийся GFP, мономерный Azami Green, TagGFP2, mUKG, mWasabi, Clover, mNeonGreen; желтые белки, например, EYFP, Citrine, Venus, SYFP2, TagYFP; оранжевые белки, например, мономерный Kusabira-Orange, mKOK, mK02, mOrange, mOrange2; красные белки, например, mRaspberry, mStrawberry, mTangerine, tdTomato, TagRFP, TagRFP-T, mApple, mRuby, mRuby2; дальнекрасные белки, например, mPlum, HcRed-Tandem, mKate2, mNeptune, NirFP; белки ближней области IR-спектра, например, TagRFP657, IFP1.4, iRFP; белки с большим стоксовым сдвигом, например, mKeima Red, LSS-mKatel, LSS-mKate2, mBeRFP; фотоактивируемые белки, например, PA-GFP, PAmCherryl, PATagRFP; фотоконвертируемые белки, например, Kaede (зеленый), Kaede (красный), KikGR1 (зеленый), KikGR1 (красный), PS-CFP2, PS-CFP2, mEos2 (зеленый), mEos2 (красный), mEos3.2 (зеленый), mEos3.2 (красный), PSmOrange, PSmOrange, фотопереключаемые белки, например, Dronpa, и их комбинации.

[0644] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген, предусмотренный в данном документе, может необязательно содержать последовательность, кодирующую дестабилизирующий домен ("дестабилизирующую последовательность"), для временного и/или пространственного контроля экспрессии белка. Неограничивающие примеры дестабилизирующих последовательностей включают последовательности, кодирующие последовательность FK506, последовательность дигидрофолатредуктазы (DHFR) или другие иллюстративные дестабилизирующие последовательности.

[0645] В отсутствие стабилизирующего лиганда последовательность белка, функционально связанная с дестабилизирующей последовательностью, разрушается путем убиквитинирования. В отличие от этого, в присутствии стабилизирующего лиганда разрушение белка ингибируется, за счет чего обеспечивается активная экспрессия последовательности белка, функционально связанной с дестабилизирующей последовательностью. В качестве положительного контроля стабилизации экспрессии белка экспрессию белка можно выявить посредством традиционных способов, включая ферментативные, рентгенографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы; анализы методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS); иммунологические анализы (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и иммуногистохимический анализ).

[0646] Дополнительные примеры дестабилизирующих последовательностей известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующая последовательность представляет

собой последовательность белка, связывающего FK506 и рапамицин (FKBP12), и стабилизирующий лиганд представляет собой Shield-1 (Shld1) (Banaszynski et al. (2012) Cell 126(5): 995-1004, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующая последовательность представляет собой последовательность DHFR, а стабилизирующий лиганд представляет собой триметоприм (TMP) (Iwamoto et al. (2010) Chem Biol 17:981-988, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующий домен представляет собой систему остановки продуцирования белков с помощью малых молекул (SMASh), где объединены конститутивный дегрон с протеазой и соответствующим ей сайтом расщепления, полученными из вируса гепатита С. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующий домен содержит систему HaloTag, систему dTag и/или нанотело (см., например, Luh et al., Prey for the proteasome: targeted protein degradation - a medicinal chemist's perspective; *Angewandte Chemie,* 2020).

[0647] В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующая последовательность может использоваться для временного контроля клетки, модифицированной так, как описано в данном документе.

[0648] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой "суицидальный" ген (см., например, Zarogoulidis et al., Suicide Gene Therapy for Cancer - Current Strategies; *J Genet Syndr Gene Ther.* 2013). В некоторых вариантах осуществления для "суицидального" гена может использоваться подход ген-направленной ферментной пролекарственной терапии (GDEPT), подход, индуцирующий димеризацию, и/или подход, опосредованный терапевтическими моноклональными антителами. В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген является биологически инертным, имеет надлежащий профиль биодоступности, надлежащий профиль биораспределения и может характеризоваться внутренне присущей приемлемой токсичностью и/или ее отсутствием. В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген кодирует белок, способный на клеточном уровне превращать нетоксичное пролекарство в токсичный продукт. В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген может улучшать профиль безопасности клетки, описанной в данном документе (см., например, Greco et al., Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene; *Front Pharmacology.* 2015; Jones et al., Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer; *Frontiers Pharmacology,* 2014). В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген представляет собой ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK). В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген представляет собой ген цитозиндезаминазы (CD). В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген представляет собой апоптозный ген (например, ген каспазы). В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген индуцирует димеризацию, например, содержит систему индуцируемого FAS (iFAS) или индуцируемой каспазы 9 (iCasp9)/AP1903. В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген представляет собой ген антигена CD20, и клетки, экспрессирующие такой антиген, могут быть устранены путем введения антитела к CD20 клинической степени чистоты. В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген представляет собой ген усеченного полипептида EGFR человека (huEGFRt), который придает чувствительность к моноклональному антителу к EGFR фармацевтической степени чистоты, например, цетуксимабу. В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген представляет собой ген метки c-Myc, которая придает чувствительность к антителам к c-Myc фармацевтической степени чистоты.

[0649] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена может представлять собой сигнал переключателя безопасности. В клеточной терапии переключатель безопасности можно использовать для остановки пролиферации генетически модифицированных клеток, если их присутствие у пациента нежелательно, например, если клетки не функционируют должным образом, если запланированные терапевтические вмешательства меняются или если терапевтическая цель была достигнута. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности может, например, представлять собой так называемый "суицидальный" ген или "суицидальный" переключатель, который после введения пациенту фармацевтического соединения будет активирован или инактивирован, так что клетки вступят в апоптоз. "Суицидальные" гены, иногда называемые "суицидальными" переключателями или переключателями безопасности, могут быть запущены или активированы клеточным событием, событием окружающей среды или химическим средством, что приводит к клеточному ответу клеток, в геном которых включен "суицидальный" ген. В некоторых вариантах осуществления активация переключателя безопасности индуцирует клеточный апоптоз. В некоторых вариантах осуществления активация переключателя безопасности подавляет рост клеток, в которые включен переключатель безопасности. В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" переключатель может кодировать фермент, не обнаруживаемый у людей (например, бактериальный или вирусный фермент), который превращает безвредное вещество в токсичный метаболит в клетке человека. Примеры "суицидального" переключателя включают без ограничения гены тимидинкиназ, цитозиндезаминаз, внутриклеточных антител, теломераз, токсинов, каспаз (например, iCaspase9) и HSV-TK, а также ДНКаз. В некоторых вариантах осуществления "суицидальный" ген может представлять собой ген тимидинкиназы (TK) вируса простого герпеса (HSV), и "суицидальный" ген TK становится токсичным для клетки при введении пациенту ганцикловира, валганцикловира, фамцикловира или т. п.

[0650] В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности может представлять собой индуцируемый рапамицином клеточный "суицидальный" переключатель на основе каспазы 9 человека (RapaCasp9), в котором ген усеченной каспазы 9 с удаленным доменом CARD связан после домена FRB (домена, связывающего комплекс FKBP12-рапамицин) mTOR либо после FKBP12 (FK506-связывающего белка 12). Добавление лекарственного средства рапамицина обеспечивает гетеродимеризацию FRB и FKBP12, что впоследствии вызывает гомодимеризацию усеченной каспазы 9 и индукцию апоптоза. В некоторых вариантах осуществления при использовании подхода с двумя конструкциями и/или биаллельного подхода, описанного в данном документе, FRB и FKBP12 разделяют по разным аллелям путем включения двух донорных конструкций: одной с одним или несколькими трансгенами и FRB, другой с одним или несколькими трансгенами и FKBP12. При упоминании в настоящей заявке переключателя безопасности этот термин следует интерпретировать как включающий все компоненты, необходимые для функционирования переключателя безопасности (например, все из домена FRB и домена FKBP12, а также гена усеченной каспазы 9 являются компонентами переключателя безопасности и образуют его).

SEQ ID NO: 160 - иллюстративная дестабилизирующая аминокислотная последовательность DHFR

MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPSTDDR
VTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHD
ADAQNSHSYCFEILERR

SEQ ID NO: 161 - иллюстративная дестабилизирующая нуклеотидная последовательность DHFR

GGTACCATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGGAAAACGCCATGCCGTG
GAACCTGCCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCCGTGATTATGGGCCGCC
ATACCTGGGAATCAATCGGTCGTCCGTTGCCAGGACGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGT
ACGGACGATCGCGTAACGTGGGTGAAGTCGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAG
AAATCATGGTGATTGGCGGCGGTCGCGTTATTGAACAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAACTGTATCTG
ACGCATATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAGCCGGATGACTGGGAAT
CGGTATTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCTATTGCTTTGAGATTCTGGAG
CGGCGATAA

SEQ ID NO: 162 - иллюстративный дестабилизирующий домен

ATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGGAAAACGCCATGCCGTGGAACCT
GCCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCCGTGATTATGGGCCGCCATACCT
GGGAATCAATCGGTCGTCCGTTGCCAGGACGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGTACGGAC
GATCGCGTAACGTGGGTGAAGTCGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCA
TGGTGATTGGCGGCGGTCGCGTTATTGAACAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAACTGTATCTGACGCAT
ATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAGCCGGATGACTGGGAATCGGTAT
TCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCTATTGCTTTGAGATTCTGGAGCGGCGA

SEQ ID NO: 163 - иллюстративная аминокислотная последовательность дестабилизирующего пептида FKBP12

MGVEKQVIRPGNGPKPAPGQTVTVHCTGFGKDGDLSQKFWSTKDEGQKPFSFQIGKGAVIKGWDEGVIG
MQIGEVARLRCSSDYAYGAGGFPAWGIQPNSVLDFEIEVLSVQ

[0651] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность для одного представляющего интерес продукта гена может быть включена в нокин-кассету. В некоторых вариантах осуществления кодирующие последовательности для двух представляющих интерес продуктов генов могут быть включены в одну нокин-кассету; в некоторых вариантах осуществления это может называться бицистронной или полицистронной конструкцией. В некоторых вариантах осуществления кодирующие последовательности для более чем двух представляющих интерес продуктов генов могут быть включены в одну нокин-кассету; в некоторых вариантах осуществления это может называться полицистронной конструкцией. В некоторых вариантах осуществления, если более чем одна кодирующая последовательность для более чем одного представляющего интерес продукта гена включена в нокин-кассету, эти последовательности могут иметь соединяющую их линкерную последовательность. Линкерные последовательности широко известны из уровня техники, иллюстративная линкерная последовательность идентифицирована под SEQ ID NO: 164. В некоторых вариантах осуществления, если более чем одна кодирующая последовательность для более чем одного представляющего интерес продукта гена включена в нокин-кассету, эти последовательности могут быть соединены линкерной последовательностью, элементом IRES и/или 2A.

[0652] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, кодирующий представляющий интерес продукт гена, содержит последовательность или состоит из последовательности под любым из SEQ ID NO: 161, 162 или 164-182. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена

содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 161, 162 или 164-182.

SEQ ID NO: 164 - иллюстративная линкерная последовательность

TCTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCGGCGGTGGTAGTGGCGGAG
GTTCTCTGCAA

SEQ ID NO: 165 - иллюстративная последовательность нокин-кассеты CD16

ATGTGGCAACTGCTGCTGCCTACAGCTCTGCTGCTTCTGGTGTCTGCCGGCATGAGAACCGAGGATCT
GCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGAACCTCAGTGGTACAGAGTGCTGGAAAAGGACAGCGTGACCCTG
AAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCGAGGACAATAGCACCCAGTGGTTCCACAACGAGAGCCTGATCAG
CAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATCGATGCCGCCACCGTGGACGACAGCGGCGAGTACAGATGCCAG
ACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACCCTGTGCAGCTGGAAGTGCACATTGGATGGTTGCTGCTGCAAGC
CCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAGGACCCCATCCACCTGAGATGCCACTCTTGGAAGAACACAGCCC
TGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAACGGCAAGGGCAGAAAGTACTTCCACCACAACAGCGACTTCTA
CATCCCCAAGGCCACACTGAAGGACTCCGGCTCCTACTTCTGCAGAGGCCTGGTCGGCAGCAAGAACG
TGTCCAGCGAGACAGTGAACATCACCATCACACAGGGCCTCGCCGTGTCTACCATCAGCAGCTTTTTC
CCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTGCCTGGTCATGGTGCTGCTGTTCGCCGTGGATACCGGCCTGTAC
TTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTCCAGCACCAGAGACTGGAAGGACCACAAGTTCAAGTGGCGGA
AGGACCCTCAGGACAAGTAA

SEQ ID NO: 166 - иллюстративная последовательность нокин-кассеты CD16

ATGTGGCAGCTGTTGCTGCCGACAGCCCTCCTGTTGCTGGTCTCCGCTGGCATGAGAACCGAGGATCT
GCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGAACCTCAGTGGTACAGAGTGCTGGAAAAGGACAGCGTGACCCTG
AAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCGAGGACAATAGCACCCAGTGGTTCCACAACGAGAGCCTGATCAG
CAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATCGATGCCGCCACCGTGGACGACAGCGGCGAGTACAGATGCCAG
ACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACCCTGTGCAGCTGGAAGTGCACATTGGATGGTTGCTGCTGCAAGC
CCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAGGACCCCATCCACCTGAGATGCCACTCTTGGAAGAACACAGCCC
TGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAACGGCAAGGGCAGAAAGTACTTCCACCACAACAGCGACTTCTA
CATCCCCAAGGCCACACTGAAGGACTCCGGCTCCTACTTCTGCAGAGGCCTGGTCGGCAGCAAGAACG
TGTCCAGCGAGACAGTGAACATCACCATCACACAGGGCCTCGCCGTGTCTACCATCAGCAGCTTTTTC
CCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTGCCTGGTCATGGTGCTGCTGTTCGCCGTGGATACCGGCCTGTAC
TTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTCCAGCACCAGAGACTGGAAGGACCACAAGTTCAAGTGGCGGA
AGGACCCTCAGGACAAG

SEQ ID NO: 167 - иллюстративная последовательность нокин-кассеты CD47

ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAAT
AAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATG
GAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTG
ATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTA
CTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTG
TGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGT

TTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTT
TGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTG
GACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA
ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAG
TACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCCTCGC
TGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTT
GAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGAC
TATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATG
AATGATGAATGA

SEQ ID NO: 168 - иллюстративная последовательность нокин-кассеты IL15
AATTGGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACG
CCACACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTG
GAACTGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAACCTGATCA
TCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGA
ACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACA
CCAGC

SEQ ID NO: 169 - иллюстративная последовательность нокин-кассеты IgE-IL15
ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAATTGGGTCAACGT
GATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACACTGTACACC
GAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACTGCAAGTGAT
CAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAACCTGATCATCCTGGCCAACAAC
AGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAG
AACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACCAGC

SEQ ID NO: 170 - иллюстративная последовательность пропептидного груза IgE-IL15
ATGGACTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTCGCGGCTGCAACGCGAGTCCATAGCGGTATCCATGTTTTT
ATTCTTGGGTGTTTTTCTGCTGGGCTGCCTAAGACCGAGGCCAACTGGGTAAATGTCATCAGTGACCTC
AAGAAAATAGAAGACCTTATACAAAGCATGCACATTGATGCTACTCTCTACACTGAGTCAGATGTACA
TCCCTCATGCAAAGTGACGGCCATGAAATGTTTCCTCCTCGAACTTCAAGTCATATCTCTGGAAAGTGG
CGACGCGTCCATCCACGACACGGTCGAAAACCTGATAATACTCGCTAATAATAGTCTCTCTTCAAATG
GTAACGTAACCGAGTCAGGTTGCAAAGAGTGCGAAGAGTTGGAAGAAAAAAACATAAAGGAGTTCCT
GCAAAGTTTCGTGCACATTGTGCAGATGTTCATTAATACCTCT

SEQ ID NO: 171 - иллюстративная последовательность груза IL15Rα
ATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCCTGTACAG
CAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGGCCGGCACAAGCAGCCTGACCGAGTGT
GTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACCTAGCCTGAAGTGCATCAGAGATCCCG
CTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCTGGCGTGACCCCTCAGCCTGAG
TCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCCAGCTCTAACAATACTGCTGCCACCACA

GCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAGCCCTAGCACCGGCACAACAGAGATCAG
CTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGAGCTGACAGCCTCTG
CCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCACCAGC
ACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGCCTGCTACCTGAAGTCTAGACAGACACCT
CCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGCCTGTCACATGGGGCACCAGCAGCAGAG
ATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTG

SEQ ID NO: 172 - иллюстративная последовательность груза mbIL-15
ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAATTGGGTCAACGT
GATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACACTGTACACC
GAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACTGCAAGTGAT
CAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAACCTGATCATCCTGGCCAACAAC
AGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAG
AACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACCAGCTCTGGCGG
AGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCGGCGGTGGTAGTGGCGGAGGTTCTCTG
CAAATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCCTGTA
CAGCAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGGCCGGCACAAGCAGCCTGACCGAG
TGTGTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACCTAGCCTGAAGTGCATCAGAGATCC
CGCTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCTGGCGTGACCCCTCAGCCTG
AGTCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCCAGCTCTAACAATACTGCTGCCACCA
CAGCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAGCCCTAGCACCGGCACAACAGAGATC
AGCTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGAGCTGACAGCCT
CTGCCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCACC
AGCACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGCCTGCTACCTGAAGTCTAGACAGACA
CCTCCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGCCTGTCACATGGGGCACCAGCAGCAG
AGATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTG

SEQ ID NO: 173 - иллюстративная последовательность груза mbIL-15
ATGGACTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTCGCGGCTGCAACGCGAGTCCATAGCGGTATCCATGTTTTT
ATTCTTGGGTGTTTTTCTGCTGGGCTGCCTAAGACCGAGGCCAACTGGGTAAATGTCATCAGTGACCTC
AAGAAAATAGAAGACCTTATACAAAGCATGCACATTGATGCTACTCTCTACACTGAGTCAGATGTACA
TCCCTCATGCAAAGTGACGGCCATGAAATGTTTCCTCCTCGAACTTCAAGTCATATCTCTGGAAAGTGG
CGACGCGTCCATCCACGACACGGTCGAAAACCTGATAATACTCGCTAATAATAGTCTCTCTTCAAATG
GTAACGTAACCGAGTCAGGTTGCAAAGAGTGCGAAGAGTTGGAAGAAAAAAACATAAAGGAGTTCCT
GCAAAGTTTCGTGCACATTGTGCAGATGTTCATTAATACCTCTAGCGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTG
GAAGCGGAGGTGGAGGCTCCGGTGGAGGAGGTAGTGGCGGAGGTTCTCTTCAAATAACTTGTCCTCCA
CCGATGTCCGTAGAACATGCGGATATTTGGGTAAAATCCTATAGCTTGTACAGCCGAGAGCGGTATAT
CTGCAACAGCGGCTTCAAGCGGAAGGCCGGCACAAGCAGCCTGACCGAGTGCGTGCTGAACAAGGCC
ACCAACGTGGCCCACTGGACCACCCCTAGCCTGAAGTGCATCAGAGATCCCGCCCTGGTGCATCAGCG
GCCTGCCCCTCCAAGCACAGTGACAACAGCTGGCGTGACCCCCCAGCCTGAGAGCCTGAGCCCTTCTG
GAAAAGAGCCTGCCGCCAGCAGCCCCAGCAGCAACAATACTGCCGCCACCACAGCCGCCATCGTGCC

TGGATCTCAGCTGATGCCCAGCAAGAGCCCTAGCACCGGCACCACCGAGATCAGCAGCCACGAGTCT
AGCCACGGCACCCCATCTCAGACCACCGCCAAGAACTGGGAGCTGACAGCCAGCGCCTCTCACCAGC
CTCCAGGCGTGTACCCTCAGGGCCACAGCGATACCACAGTGGCCATCAGCACCTCCACCGTGCTGCTG
TGTGGACTGAGCGCCGTGTCACTGCTGGCCTGCTACCTGAAGTCCAGACAGACCCCTCCACTGGCCAG
CGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCACTGCCCGTGACCTGGGGCACCAGCTCCAGAGATGAGGATCTG
GAAAACTGCTCCCACCACCTG

SEQ ID NO: 174 - иллюстративная последовательность полицистронной конструкции с грузом CD16, mbIL-15

ATGTGGCAGCTGTTGCTGCCGACAGCCCTCCTGTTGCTGGTCTCCGCTGGCATGAGAACCGAGGATCT
GCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGAACCTCAGTGGTACAGAGTGCTGGAAAAGGACAGCGTGACCCTG
AAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCGAGGACAATAGCACCCAGTGGTTCCACAACGAGAGCCTGATCAG
CAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATCGATGCCGCCACCGTGGACGACAGCGGCGAGTACAGATGCCAG
ACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACCCTGTGCAGCTGGAAGTGCACATTGGATGGTTGCTGCTGCAAGC
CCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAGGACCCCATCCACCTGAGATGCCACTCTTGGAAGAACACAGCCC
TGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAACGGCAAGGGCAGAAAGTACTTCCACCACAACAGCGACTTCTA
CATCCCCAAGGCCACACTGAAGGACTCCGGCTCCTACTTCTGCAGAGGCCTGGTCGGCAGCAAGAACG
TGTCCAGCGAGACAGTGAACATCACCATCACACAGGGCCTCGCCGTGTCTACCATCAGCAGCTTTTTC
CCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTGCCTGGTCATGGTGCTGCTGTTCGCCGTGGATACCGGCCTGTAC
TTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTCCAGCACCAGAGACTGGAAGGACCACAAGTTCAAGTGGCGGA
AGGACCCTCAGGACAAGGGAAGCGGAGCCACAAACTTCTCTCTGCTGAAGCAGGCAGGAGATGTTGA
AGAAAACCCTGGACCTATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACA
GCAATTGGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGA
CGCCACACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGC
TGGAACTGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAACCTGAT
CATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAG
GAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAA
CACCAGCTCTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCGGCGGTGGTAGT
GGCGGAGGTTCTCTGCAAATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATCTGGGTCAA
GAGCTACAGCCTGTACAGCAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGGCCGGCACA
AGCAGCCTGACCGAGTGTGTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACCTAGCCTGA
AGTGCATCAGAGATCCCGCTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCTGGC
GTGACCCCTCAGCCTGAGTCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCCAGCTCTAAC
AATACTGCTGCCACCACAGCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAGCCCTAGCAC
CGGCACAACAGAGATCAGCTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAAT
TGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTCTGATACAAC
AGTGGCCATCAGCACCAGCACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGCCTGCTACCT
GAAGTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGCCTGTCACAT
GGGGCACCAGCAGCAGAGATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTG

SEQ ID NO: 175 - иллюстративная последовательность груза CAR для CD19

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCAGAC
ATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAG
GGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCC
TGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACA
GATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAAT
ACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGCTCCACCTCTGGATCCGGCAA
GCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTG
GCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAG
CTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACA
TACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTT
AAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTG
GTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAATTGAA
GTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAA
ACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGGGG
AGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAG
CAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACC
AGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC
GCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGT
ACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT
GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG
GACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

SEQ ID NO: 176 - иллюстративная последовательность груза CAR для EGFR

ATGGCACTCCCCGTCACCGCCCTTCTCTTGCCCCTCGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGGCCCATGGAC
GAAGTGCAGCTCGTGGAGTCCGGTGGAGGACTCGTCCAACCGGGCGGATCCCTTCGCTTGTCCTGCGC
CGCATCAGGCTTCAGCTTCACCAACTATGGCGTCCACTGGGTCAGACAGGCCCCCGGAAAGGGACTGG
AATGGGTGTCCGTGATCTGGAGCGGCGGGAACACCGACTACAACACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACT
ATTAGCCGCGACAACTCCAAGAACACTCTGTACCTCCAAATGAACTCCCTGAGGGCCGAAGATACTGC
TGTGTACTATTGCGCGAGAGCCCTGACCTACTACGACTACGAGTTCGCGTACTGGGGCCAGGGGACTC
TCGTGACCGTGTCCAGCGGTGGTGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGGGGATCAGAAAT
CGTGCTGACTCAGTCCCCTGCGACCTTGTCCCTGAGCCCTGGAGAACGGGCCACCCTGAGCTGTAGAG
CCAGCCAGAGCATCGGGACAAATATTCACTGGTACCAGCAGAAACCCGGACAAGCACCACGGCTGCT
GATCTACTACGCCTCCGAGTCGATTTCCGGAATCCCGGCTCGCTTTTCGGGGTCTGGATCGGGAACGG
ACTTCACTCTGACCATCTCGTCGCTGGAACCCGAGGATTTCGCCGTGTACTACTGCCAACAGAACAAC
AATTGGCCGACCACGTTCGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATTAAGGGATCACTGGAAGCGGCCGCAA
CCACAACACCTGCTCCAAGGCCCCCCACACCCGCTCCAACTATAGCCAGCCAACCATTGAGCCTCAGA
CCTGAAGCTTGCAGGCCCGCAGCAGGAGGCGCCGTCCATACGCGAGGCCTGGACTTCGCGTGTGATAT
TTATATTTGGGCCCCTTTGGCCGGAACATGTGGGGTGTTGCTTCTCTCCCTTGTGATCACTCTGTATTGT
AAGCGCGGGAGAAAGAAGCTCCTGTACATCTTCAAGCAGCCTTTTATGCGACCTGTGCAAACCACTCA
GGAAGAAGATGGGTGTTCATGCCGCTTCCCCGAGGAGGAAGAAGGAGGGTGTGAACTGAGGGTGAAA

TTTTCTAGAAGCGCCGATGCTCCCGCATATCAGCAGGGTCAGAATCAGCTCTACAATGAATTGAATCT
CGGCAGGCGAGAAGAGTACGATGTTCTGGACAAGAGACGGGGCAGGGATCCCGAGATGGGGGGAAA
GCCCCGGAGAAAAAATCCTCAGGAGGGGTTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCTGAAGCC
TATAGCGAGATCGGAATGAAAGGCGAAAGACGCAGAGGCAAGGGGCATGACGGTCTGTACCAGGGTC
TCTCTACAGCCACCAAGGACACTTATGATGCGTTGCATATGCAAGCCTTGCCACCCCGCTAA

SEQ ID NO: 177 - иллюстративная последовательность груза GFP
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACG
TAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCT
GAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACG
GCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC
GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGG
TGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG
CAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAG
CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCG
CCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTG
AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGT
GACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA

SEQ ID NO: 178 - иллюстративная последовательность груза CXCR1
ATGTCAAATATTACAGATCCACAGATGTGGGATTTTGATGATCTAAATTTCACTGGCATGCCACCTGCA
GATGAAGATTACAGCCCCTGTATGCTAGAAACTGAGACACTCAACAAGTATGTTGTGATCATCGCCTA
TGCCCTAGTGTTCCTGCTGAGCCTGCTGGGAAACTCCCTGGTGATGCTGGTCATCTTATACAGCAGGGT
CGGCCGCTCCGTCACTGATGTCTACCTGCTGAACCTGGCCTTGGCCGACCTACTCTTTGCCCTGACCTT
GCCCATCTGGGCCGCCTCCAAGGTGAATGGCTGGATTTTTGGCACATTCCTGTGCAAGGTGGTCTCACT
CCTGAAGGAAGTCAACTTCTACAGTGGCATCCTGCTGTTGGCCTGCATCAGTGTGGACCGTTACCTGG
CCATTGTCCATGCCACACGCACACTGACCCAGAAGCGTCACTTGGTCAAGTTTGTTTGTCTTGGCTGCT
GGGGACTGTCTATGAATCTGTCCCTGCCCTTCTTCCTTTTCCGCCAGGCTTACCATCCAAACAATTCCA
GTCCAGTTTGCTATGAGGTCCTGGGAAATGACACAGCAAAATGGCGGATGGTGTTGCGGATCCTGCCT
CACACCTTTGGCTTCATCGTGCCGCTGTTTGTCATGCTGTTCTGCTATGGATTCACCCTGCGTACACTGT
TTAAGGCCCACATGGGGCAGAAGCACCGAGCCATGAGGGTCATCTTTGCTGTCGTCCTCATCTTCCTG
CTTTGCTGGCTGCCCTACAACCTGGTCCTGCTGGCAGACACCCTCATGAGGACCCAGGTGATCCAGGA
GAGCTGTGAGCGCCGCAACAACATCGGCCGGGCCCTGGATGCCACTGAGATTCTGGGATTTCTCCATA
GCTGCCTCAACCCCATCATCTACGCCTTCATCGGCCAAAATTTTCGCCATGGATTCCTCAAGATCCTGG
CTATGCATGGCCTGGTCAGCAAGGAGTTCTTGGCACGTCATCGTGTTACCTCCTACACTTCTTCGTCTG
TCAATGTCTCTTCCAACCTCTGA

SEQ ID NO: 179 - иллюстративная последовательность груза CXCR3B
ATGGAGTTGAGGAAGTACGGCCCTGGAAGACTGGCGGGGACAGTTATAGGAGGAGCTGCTCAGAGTA
AATCACAGACTAAATCAGACTCAATCACAAAAGAGTTCCTGCCAGGCCTTTACACAGCCCCTTCCTCC
CCGTTCCCGCCCTCACAGGTGAGTGACCACCAAGTGCTAAATGACGCCGAGGTTGCCGCCCTCCTGGA

GAACTTCAGCTCTTCCTATGACTATGGAGAAAACGAGAGTGACTCGTGCTGTACCTCCCCGCCCTGCC
CACAGGACTTCAGCCTGAACTTCGACCGGGCCTTCCTGCCAGCCCTCTACAGCCTCCTCTTTCTGCTGG
GGCTGCTGGGCAACGGCGCGGTGGCAGCCGTGCTGCTGAGCCGGCGGACAGCCCTGAGCAGCACCGA
CACCTTCCTGCTCCACCTAGCTGTAGCAGACACGCTGCTGGTGCTGACACTGCCGCTCTGGGCAGTGG
ACGCTGCCGTCCAGTGGGTCTTTGGCTCTGGCCTCTGCAAAGTGGCAGGTGCCCTCTTCAACATCAACT
TCTACGCAGGAGCCCTCCTGCTGGCCTGCATCAGCTTTGACCGCTACCTGAACATAGTTCATGCCACCC
AGCTCTACCGCCGGGGGCCCCCGGCCCGCGTGACCCTCACCTGCCTGGCTGTCTGGGGGCTCTGCCTG
CTTTTCGCCCTCCCAGACTTCATCTTCCTGTCGGCCCACCACGACGAGCGCCTCAACGCCACCCACTGC
CAATACAACTTCCCACAGGTGGGCCGCACGGCTCTGCGGGTGCTGCAGCTGGTGGCTGGCTTTCTGCT
GCCCCTGCTGGTCATGGCCTACTGCTATGCCCACATCCTGGCCGTGCTGCTGGTTTCCAGGGGCCAGCG
GCGCCTGCGGGCCATGCGGCTGGTGGTGGTGGTCGTGGTGGCCTTTGCCCTCTGCTGGACCCCCTATCA
CCTGGTGGTGCTGGTGGACATCCTCATGGACCTGGGCGCTTTGGCCCGCAACTGTGGCCGAGAAAGCA
GGGTAGACGTGGCCAAGTCGGTCACCTCAGGCCTGGGCTACATGCACTGCTGCCTCAACCCGCTGCTC
TATGCCTTTGTAGGGGTCAAGTTCCGGGAGCGGATGTGGATGCTGCTCTTGCGCCTGGGCTGCCCCAA
CCAGAGAGGGCTCCAGAGGCAGCCATCGTCTTCCCGCCGGGATTCATCCTGGTCTGAGACCTCAGAGG
CCTCCTACTCGGGCTTGTGA

SEQ ID NO: 180 - иллюстративная последовательность груза CXCR3A

ATGGTCCTTGAGGTGAGTGACCACCAAGTGCTAAATGACGCCGAGGTTGCCGCCCTCCTGGAGAACTT
CAGCTCTTCCTATGACTATGGAGAAAACGAGAGTGACTCGTGCTGTACCTCCCCGCCCTGCCCACAGG
ACTTCAGCCTGAACTTCGACCGGGCCTTCCTGCCAGCCCTCTACAGCCTCCTCTTTCTGCTGGGGCTGC
TGGGCAACGGCGCGGTGGCAGCCGTGCTGCTGAGCCGGCGGACAGCCCTGAGCAGCACCGACACCTT
CCTGCTCCACCTAGCTGTAGCAGACACGCTGCTGGTGCTGACACTGCCGCTCTGGGCAGTGGACGCTG
CCGTCCAGTGGGTCTTTGGCTCTGGCCTCTGCAAAGTGGCAGGTGCCCTCTTCAACATCAACTTCTACG
CAGGAGCCCTCCTGCTGGCCTGCATCAGCTTTGACCGCTACCTGAACATAGTTCATGCCACCCAGCTCT
ACCGCCGGGGGCCCCCGGCCCGCGTGACCCTCACCTGCCTGGCTGTCTGGGGGCTCTGCCTGCTTTTCG
CCCTCCCAGACTTCATCTTCCTGTCGGCCCACCACGACGAGCGCCTCAACGCCACCCACTGCCAATAC
AACTTCCCACAGGTGGGCCGCACGGCTCTGCGGGTGCTGCAGCTGGTGGCTGGCTTTCTGCTGCCCCT
GCTGGTCATGGCCTACTGCTATGCCCACATCCTGGCCGTGCTGCTGGTTTCCAGGGGCCAGCGGCGCCT
GCGGGCCATGCGGCTGGTGGTGGTGGTCGTGGTGGCCTTTGCCCTCTGCTGGACCCCCTATCACCTGGT
GGTGCTGGTGGACATCCTCATGGACCTGGGCGCTTTGGCCCGCAACTGTGGCCGAGAAAGCAGGGTAG
ACGTGGCCAAGTCGGTCACCTCAGGCCTGGGCTACATGCACTGCTGCCTCAACCCGCTGCTCTATGCCT
TTGTAGGGGTCAAGTTCCGGGAGCGGATGTGGATGCTGCTCTTGCGCCTGGGCTGCCCCAACCAGAGA
GGGCTCCAGAGGCAGCCATCGTCTTCCCGCCGGGATTCATCCTGGTCTGAGACCTCAGAGGCCTCCTA
CTCGGGCTTGTGA

SEQ ID NO: 181 - иллюстративная последовательность груза CCR5

ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTATACATCGGAGCCCTGCCAAAAAAT
CAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCTCCGCTCTACTCACTGGTGTTCATCTTTGGTTTTGT
GGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACC
TGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCCTTCTTACTGTCCCCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGC

CCAGTGGGACTTTGGAAATACAATGTGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGCTTCTTCTCTGG
AATCTTCTTCATCATCCTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAA
AGCCAGGACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGCGTCTCT
CCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTTCCATA
CAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCCTGCCGC
TGCTTGTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTCGAAATGAGAAGAAG
AGGCACAGGGCTGTGAGGCTTATCTTCACCATCATGATTGTTTATTTTCTCTTCTGGGCTCCCTACAAC
ATTGTCCTTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAGCTCTAACAGGTTG
GACCAAGCTATGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACCCCATCATCTATGC
CTTTGTCGGGGAGAAGTTCAGAAACTACCTCTTAGTCTTCTTCCAAAAGCACATTGCCAAACGCTTCTG
CAAATGCTGTTCTATTTTCCAGCAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACACCCGATCCACTG
GGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTTGTGA

SEQ ID NO: 182 - иллюстративная последовательность груза CCR2
ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAGCGGTGAAGAAGTCACCACCTT
TTTTGATTATGATTACGGTGCTCCCTGTCATAAATTTGACGTGAAGCAAATTGGGGCCCAACTCCTGCC
TCCGCTCTACTCGCTGGTGTTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCGTCCTCATCTTAATAAAC
TGCAAAAAGCTGAAGTGCTTGACTGACATTTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGATCTGCTTTTTCTT
ATTACTCTCCCATTGTGGGCTCACTCTGCTGCAAATGAGTGGGTCTTTGGGAATGCAATGTGCAAATTA
TTCACAGGGCTGTATCACATCGGTTATTTTGGCGGAATCTTCTTCATCATCCTCCTGACAATCGATAGA
TACCTGGCTATTGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGT
GTGATCACCTGGTTGGTGGCTGTGTTTGCTTCTGTCCCAGGAATCATCTTTACTAAATGCCAGAAAGAA
GATTCTGTTTATGTCTGTGGCCCTTATTTTCCACGAGGATGGAATAATTTCCACACAATAATGAGGAAC
ATTTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTCATCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTGAAAACCCTGCTT
CGGTGTCGAAACGAGAAGAAGAGGCATAGGGCAGTGAGAGTCATCTTCACCATCATGATTGTTTACTT
TCTCTTCTGGACTCCCTATAATATTGTCATTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTCGGCCTGAGTAAC
TGTGAAAGCACCAGTCAACTGGACCAAGCCACGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGACTCACTGCT
GCATCAATCCCATCATCTATGCCTTCGTTGGGGAGAAGTTCAGAAGCCTTTTTCACATAGCTCTTGGCT
GTAGGATTGCCCCACTCCAAAAACCAGTGTGTGGAGGTCCAGGAGTGAGACCAGGAAAGAATGTGAA
AGTGACTACACAAGGACTCCTCGATGGTCGTGGAAAAGGAAAGTCAATTGGCAGAGCCCCTGAAGCC
AGTCTTCAGGACAAAGAAGGAGCCTAG

[0653] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 161, 164 или 183-200. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес продукт гена содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 161, 164 или 183-200.

SEQ ID NO: 183 - иллюстративная линкерная аминокислотная последовательность
SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ

SEQ ID NO: 184 - иллюстративная аминокислотная последовательность CD16
MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQ
ASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVT
YLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCL
VMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

SEQ ID NO: 185 - иллюстративная аминокислотная последовательность CD47
MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDG
ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNEN
ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTG
ILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVAS
NQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE

SEQ ID NO: 186 - иллюстративная аминокислотная последовательность IL15
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNS
LSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

SEQ ID NO: 187 - иллюстративная аминокислотная последовательность IgE-IL15
MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLE
SGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

SEQ ID NO: 188 - иллюстративная аминокислотная последовательность пропептида IgE-IL15
MDWTWILFLVAAATRVHSGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC
KVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTS

SEQ ID NO: 189 - иллюстративная аминокислотная последовательность IL15Rα
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQ
RPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPS
QTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEAL
PVTWGTSSRDEDLENCSHHL

SEQ ID NO: 190 - иллюстративная аминокислотная последовательность mbIL-15
MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLE
SGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWT
TPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTG
TTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQTP
PLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL

SEQ ID NO: 191 - иллюстративная аминокислотная последовательность mbIL-15

MDWTWILFLVAAATRVHSGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC
KVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAA
TTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVL
LCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL

SEQ ID NO: 192 - иллюстративная аминокислотная последовательность полицистронной конструкции CD16, mbIL-15

MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQ
ASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVT
YLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCL
VMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDKGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTW
ILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI
RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH
ESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASVE
MEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL

SEQ ID NO: 193 - иллюстративная аминокислотная последовательность CAR для CD19

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHT
SRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTK
GEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIK
DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT
RKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 194 - иллюстративная аминокислотная последовательность CAR для EGFR

MALPVTALLLPLALLLHAARPMDEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFTNYGVHWVRQAPGKGLE
WVSVIWSGGNTDYNTSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLV
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLLIYYASE
SISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQNNNWPTTFGQGTKLEIKGSLEAAATTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM
RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 195 - иллюстративная аминокислотная последовательность GFP

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQC
FSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKL

EYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDP
NEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

SEQ ID NO: 196 - иллюстративная аминокислотная последовательность CXCR1
MSNITDPQMWDFDDLNFTGMPPADEDYSPCMLETETLNKYVVIIAYALVFLLSLLGNSLVMLVILYSRVGR
SVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLLACISVDRYLAIVHAT
RTLTQKRHLVKFVCLGCWGLSMNLSLPFFLFRQAYHPNNSSPVCYEVLGNDTAKWRMVLRILPHTFGFIVP
LFVMLFCYGFTLRTLFKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQESCERRNNIGR
ALDATEILGFLHSCLNPIIYAFIGQNFRHGFLKILAMHGLVSKEFLARHRVTSYTSSSVNVSSNL

SEQ ID NO: 197 - иллюстративная аминокислотная последовательность CXCR3B
MELRKYGPGRLAGTVIGGAAQSKSQTKSDSITKEFLPGLYTAPSSPFPPSQVSDHQVLNDAEVAALLENFSS
SYDYGENESDSCCTSPPCPQDFSLNFDRAFLPALYSLLFLLGLLGNGAVAAVLLSRRTALSSTDTFLLHLAV
ADTLLVLTLPLWAVDAAVQWVFGSGLCKVAGALFNINFYAGALLLACISFDRYLNIVHATQLYRRGPPAR
VTLTCLAVWGLCLLFALPDFIFLSAHHDERLNATHCQYNFPQVGRTALRVLQLVAGFLLPLLVMAYCYAH
ILAVLLVSRGQRRLRAMRLVVVVVVAFALCWTPYHLVVLVDILMDLGALARNCGRESRVDVAKSVTSGL
GYMHCCLNPLLYAFVGVKFRERMWMLLLRLGCPNQRGLQRQPSSSRRDSSWSETSEASYSGL

SEQ ID NO: 198 - иллюстративная аминокислотная последовательность CXCR3A
MVLEVSDHQVLNDAEVAALLENFSSSYDYGENESDSCCTSPPCPQDFSLNFDRAFLPALYSLLFLLGLLGN
GAVAAVLLSRRTALSSTDTFLLHLAVADTLLVLTLPLWAVDAAVQWVFGSGLCKVAGALFNINFYAGALL
LACISFDRYLNIVHATQLYRRGPPARVTLTCLAVWGLCLLFALPDFIFLSAHHDERLNATHCQYNFPQVGR
TALRVLQLVAGFLLPLLVMAYCYAHILAVLLVSRGQRRLRAMRLVVVVVVAFALCWTPYHLVVLVDILM
DLGALARNCGRESRVDVAKSVTSGLGYMHCCLNPLLYAFVGVKFRERMWMLLLRLGCPNQRGLQRQPSS
SRRDSSWSETSEASYSGL

SEQ ID NO: 199 - иллюстративная аминокислотная последовательность CCR5
MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVILILINCKRLKSMTDIYLLNLAI
SDLFFLLTVPFWAHYAAAQWDFGNTMCQLLTGLYFIGFFSGIFFIILLTIDRYLAVVHAVFALKARTVTFGV
VTSVITWVVAVFASLPGIIFTRSQKEGLHYTCSSHFPYSQYQFWKNFQTLKIVILGLVLPLLVMVICYSGILK
TLLRCRNEKKRHRAVRLIFTIMIVYFLFWAPYNIVLLLNTFQEFFGLNNCSSSNRLDQAMQVTETLGMTHC
CINPIIYAFVGEKFRNYLLVFFQKHIAKRFCKCCSIFQQEAPERASSVYTRSTGEQEISVGL

SEQ ID NO: 200 - иллюстративная последовательность груза CCR2
MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLILINCKKL
KCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVF
ALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGWNNFHTIMRNILGLVLPLLIMV
ICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTETL
GMTHCCINPIIYAFVGEKFRSLFHIALGCRIAPLQKPVCGGPGVRPGKNVKVTTQGLLDGRGKGKSIGRAPE
ASLQDKEGA

Капсиды AAV

[0654] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены одна или несколько полинуклеотидных конструкций (например, нокин-кассет), упакованные в капсид AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAV серотипа AAV2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или одного или нескольких их гибридов или получен из них. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV получен из предкового серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой капсид предкового (Anc) AAV. Капсид Anc получен из последовательности конструкции, сконструированной с использованием эволюционных вероятностей и эволюционного моделирования для определения вероятной предковой последовательности. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV был модифицирован так, как известно из уровня техники (см., например, Büning and Srivastava, Capsid modifications for targeting and improving the efficacy of AAV vectors, *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019).

[0655] В некоторых вариантах осуществления, как предусмотрено в данном документе, любая комбинация капсидов AAV и конструкций AAV (например, содержащих ITR AAV) может быть использована в рекомбинантных частицах AAV (rAAV) по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления ITR AAV представляет собой ITR AAV из AAV2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или получен из них. Например, это ITR AA6 дикого типа или варианта AA6 и капсид AAV6, ITR AAV2 дикого типа или варианта AAV2 и капсид AAV6 и т. д. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV полностью состоит из компонентов AAV6 (например, капсид и ITR относятся к серотипу AAV6). В некоторых вариантах осуществления частица AAV представляет собой частицу AAV6/2, AAV6/8 или AAV6/9 (например, капсид AAV2, AAV8 или AAV9 с конструкцией AAV, содержащей ITR AAV6).

Иллюстративные конструкции AAV

[0656] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица включена в конструкцию AAV. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции AAV содержит последовательность или состоит из последовательности под любым из SEQ ID NO: 201-204. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция AAV представлена под SEQ ID NO: 201. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция AAV представлена под SEQ ID NO: 202. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция AAV представлена под SEQ ID NO: 203. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция AAV представлена под SEQ ID NO: 204. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция AAV на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 201-204.

SEQ ID NO: 201 - иллюстративная конструкция AAV для вставки донорной матрицы в локус *GAPDH*

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG
GGTTCCTGTCGACGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTC
CAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGG
GAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCT
AGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAG
GGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCAC
CTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGG

GGCCAGAGACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGC
CCTGACAACTCTTTACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTG
ATGGCTCATATGGCTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAG
ACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGTGGCAACTGCTGCTGCCTACAGCTCTGCTGCTTCTGGTGTCT
GCCGGCATGAGAACCGAGGATCTGCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGAACCTCAGTGGTACAGAGTGCT
GGAAAAGGACAGCGTGACCCTGAAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCGAGGACAATAGCACCCAGTGG
TTCCACAACGAGAGCCTGATCAGCAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATCGATGCCGCCACCGTGGACGA
CAGCGGCGAGTACAGATGCCAGACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACCCTGTGCAGCTGGAAGTGCAC
ATTGGATGGTTGCTGCTGCAAGCCCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAGGACCCCATCCACCTGAGATG
CCACTCTTGGAAGAACACAGCCCTGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAACGGCAAGGGCAGAAAGTAC
TTCCACCACAACAGCGACTTCTACATCCCCAAGGCCACACTGAAGGACTCCGGCTCCTACTTCTGCAG
AGGCCTGGTCGGCAGCAAGAACGTGTCCAGCGAGACAGTGAACATCACCATCACACAGGGCCTCGCC
GTGTCTACCATCAGCAGCTTTTTCCCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTGCCTGGTCATGGTGCTGCTGT
TCGCCGTGGATACCGGCCTGTACTTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTCCAGCACCAGAGACTGGAAG
GACCACAAGTTCAAGTGGCGGAAGGACCCTCAGGACAAGTAAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCC
CGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCC
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG
GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGG
TGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCAC
AAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAAT
CTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTC
ATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCA
GAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTC
CTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGAC
GTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAG
TAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC
GGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GCTGCCTGCAGG

SEQ ID NO: 202 - иллюстративная конструкция AAV для вставки донорной матрицы в локус *GAPDH*

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG
GGTTCCTGTCGACGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTC
CAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGG
GAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCT
AGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAG
GGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCAC
CTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGG
GGCCAGAGACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGC
CCTGACAACTCTTTACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTG

ATGGCTCATATGGCTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAG
ACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCAT
CCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT
GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAC
CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACG
ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGC
AACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAA
CGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATC
GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGC
TGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA
TCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGT
GAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTT
GCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCC
TTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG
TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCT
CTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACC
CCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTG
CCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGG
GGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACT
TGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATT
CTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGC
TTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGA
GAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGTAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC
TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCG
GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

SEQ ID NO: 203 - иллюстративная конструкция AAV для вставки донорной матрицы в локус *GAPDH*

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG
GGTTCCTGTCGACGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTC
CAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGG
GAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCT
AGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAG
GGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCAC
CTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGG
GGCCAGAGACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGC
CCTGACAACTCTTTACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTG
ATGGCTCATATGGCTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAG
ACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACAC
CCAGCATTCCTCCTGATCCCAGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGA

GACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAA
ACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGT
TCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCC
ACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAAC
AGGCTCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTG
CAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGT
CTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG
TAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGAC
AACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTG
TGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG
TCTCCTCAGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGA
ACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT
TGGGTGCTGGTGGTGGTTGGGGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATT
TTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCC
CGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAG
TGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG
GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCG
GAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA
AGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG
CCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTT
TCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT
GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC
TATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCC
CTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGC
CACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGG
GAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTT
GTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTC
TTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCT
TCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAG
AACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGTAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT
CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGG
GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

SEQ ID NO: 204 - иллюстративная конструкция AAV для вставки донорной матрицы в локус *GAPDH*
CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG
GGTTCCTGTCGACGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTC
CAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGG
GAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCT

AGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAG
GGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCAC
CTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGG
GGCCAGAGACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGC
CCTGACAACTCTTTACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTG
ATGGCTCATATGGCTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAG
ACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGCACTCCCCGTCACCGCCCTTCTCTTGCCCCTCGCCCTGCTGC
TGCATGCTGCCAGGCCCATGGACGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCCGGTGGAGGACTCGTCCAACCGGG
CGGATCCCTTCGCTTGTCCTGCGCCGCATCAGGCTTCAGCTTCACCAACTATGGCGTCCACTGGGTCAG
ACAGGCCCCCGGAAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTGATCTGGAGCGGCGGGAACACCGACTACAAC
ACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACTATTAGCCGCGACAACTCCAAGAACACTCTGTACCTCCAAATGAA
CTCCCTGAGGGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCGAGAGCCCTGACCTACTACGACTACGAGT
TCGCGTACTGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTCCAGCGGTGGTGGAGGTTCCGGAGGCGGAGG
TTCTGGTGGCGGGGGATCAGAAATCGTGCTGACTCAGTCCCCTGCGACCTTGTCCCTGAGCCCTGGAG
AACGGGCCACCCTGAGCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCGGGACAAATATTCACTGGTACCAGCAGAA
ACCCGGACAAGCACCACGGCTGCTGATCTACTACGCCTCCGAGTCGATTTCCGGAATCCCGGCTCGCT
TTTCGGGGTCTGGATCGGGAACGGACTTCACTCTGACCATCTCGTCGCTGGAACCCGAGGATTTCGCC
GTGTACTACTGCCAACAGAACAACAATTGGCCGACCACGTTCGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATTA
AGGGATCACTGGAAGCGGCCGCAACCACAACACCTGCTCCAAGGCCCCCCACACCCGCTCCAACTATA
GCCAGCCAACCATTGAGCCTCAGACCTGAAGCTTGCAGGCCCGCAGCAGGAGGCGCCGTCCATACGC
GAGGCCTGGACTTCGCGTGTGATATTTATATTTGGGCCCCTTTGGCCGGAACATGTGGGGTGTTGCTTC
TCTCCCTTGTGATCACTCTGTATTGTAAGCGCGGGAGAAAGAAGCTCCTGTACATCTTCAAGCAGCCTT
TTATGCGACCTGTGCAAACCACTCAGGAAGAAGATGGGTGTTCATGCCGCTTCCCCGAGGAGGAAGA
AGGAGGGTGTGAACTGAGGGTGAAATTTTCTAGAAGCGCCGATGCTCCCGCATATCAGCAGGGTCAG
AATCAGCTCTACAATGAATTGAATCTCGGCAGGCGAGAAGAGTACGATGTTCTGGACAAGAGACGGG
GCAGGGATCCCGAGATGGGGGGAAAGCCCCGGAGAAAAAATCCTCAGGAGGGGTTGTACAATGAGCT
GCAGAAGGACAAGATGGCTGAAGCCTATAGCGAGATCGGAATGAAAGGCGAAAGACGCAGAGGCAA
GGGGCATGACGGTCTGTACCAGGGTCTCTCTACAGCCACCAAGGACACTTATGATGCGTTGCATATGC
AAGCCTTGCCACCCCGCTAAAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCC
TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAG
GTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATT
CTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG
CTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGG
CCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTC
ACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATG
TAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCT
GTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTG
TGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTC
CAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTG
GCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGTAGATCTAGGAACCCCTAGTGAT

GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAC
GCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

Иллюстративные последовательности донорных матриц

[0657] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит в направлении 5'-3' 5'-плечо гомологии с последовательностью-мишенью (которое необязательно содержит оптимизированную последовательность, не являющуюся последовательностью дикого типа), второй регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию последовательности груза в качестве отдельного продукта трансляции (например, последовательность IRES и/или элемент 2A), последовательность груза (например, представляющий интерес продукт гена), необязательно второй регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию последовательности груза в качестве отдельного продукта трансляции (например, последовательность IRES и/или элемент 2A), необязательно вторую последовательность груза (например, представляющий интерес продукт гена), необязательно 3'-UTR, сигнал полиаденилирования (например, сигнал BGHpA) и 3'-плечо гомологии с последовательностью-мишенью (которое необязательно содержит оптимизированную последовательность, не являющуюся последовательностью дикого типа).

[0658] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность или состоит из последовательности под любым из SEQ ID NO: 38-57 и 205-218. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность или состоит из последовательности, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 38-57 и 205-218.

SEQ ID NO: 38 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCTGGCCCGAT
GGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA
AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGA
AGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC
GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGA
AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCA
ACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCA
GAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
GACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAG
CACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA
CCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATG
CGGTGACGTGGAGGAGAATCCTGGCCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATC

AAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGG
GCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCC
CCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCC
CGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACT
TCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAG
GTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACAATGGGCTGGG
AGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAA
GCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAG
CTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGT
GGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGCG
GCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG
CCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCT
AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG
CAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
ATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGA
CCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACAC
TCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGG
GCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTG
TCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTG
GGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGA
ACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAG
GCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 39 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG
ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
GCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCC
TGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC
GCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG

TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCT
GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACCCCTCTCCCTCC
CCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTT
TCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATT
CCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCC
TCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTG
GCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCA
GTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGG
GGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTT
ACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTG
AAAAACACGATGATAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATG
CGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGG
GCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCC
TGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCC
CGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCG
GCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGC
GGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACAATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCG
AGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACG
GCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGC
CTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACG
AACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGCGGCCGCGTCGAG
TCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT
TGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAG
GAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA
GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACA
GCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCC
CAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCC
ACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAG
CCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTA
GGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGAC
CTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCT
TCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCT
CTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 40 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG

GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG
ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
GCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCC
TGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC
GCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG
TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCT
GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAAGCGGAGCTACT
AACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCG
AGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAA
CGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAG
CTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGG
CTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCT
TCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTG
CAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAAT
GCAGAAGAAGACAATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAG
GGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCT
ACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCC
CACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCA
TGGACGAGCTGTACAAGTAAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCT
CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAG
GTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATT
CTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG
CTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGG
CCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTC
ACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATG
TAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCT
GTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTG
TGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTC
CAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTG
GCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 41 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG
ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
GCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCC
TGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC
GCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG
TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCT
GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAGGGCAGAGGAAGT
CTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCTGGCCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACA
TGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTC
GAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACC
AAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTAC
GTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCG
CGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAG
TTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGAC
AATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAG
CAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGA
AGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGAC
TACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGT
ACAAGTAAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTT
CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA
CTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGG
GTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG
TGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGT
AAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGA
GTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTG
AAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACC
AGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTG
AGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCT

TGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTAC
TTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 42 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCTGGCCCGAT
GGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA
AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGA
AGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC
GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGA
AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCA
ACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCA
GAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
GACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAG
CACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA
CCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTG
CTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAAC
ATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTT
CGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACC
AAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTAC
GTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCG
CGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAG
TTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGAC
AATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAG
CAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGA
AGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGAC
TACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGT
ACAAGTAAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTT
CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA
CTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGG
GTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG
TGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGT
AAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGA

GTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTG
AAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACC
AGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTG
AGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCT
TGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTAC
TTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 43 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCTGGCCCGAT
GGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA
AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGA
AGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC
GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGA
AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCA
ACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCA
GAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
GACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAG
CACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA
CCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAA
CGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATT
GCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCT
TTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTT
CTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGC
CTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGT
GAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATG
CCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGT
CGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGA
TAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGC
ACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGA
GGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGT
CCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAG
CTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGT

GACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCC
CCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACAATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCC
CGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGA
CGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAAC
ATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGG
GCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCC
GTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCC
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG
GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGG
TGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCAC
AAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAAT
CTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTC
ATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCA
GAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTC
CTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGAC
GTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAG
T

SEQ ID NO: 44 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG
ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
GCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCC
TGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC
GCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG
TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCT
GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGAGCGGCCGCGTCG
AGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG

TTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATG
AGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTA
CAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGC
CCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCC
CCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGG
AGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTC
TAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGG
ACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTG
CTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTC
CTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 45 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAATT
GGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCAC
ACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAC
TGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAACCTGATCATCCT
GGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACT
GGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACCA
GCTCTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCGGCGGTGGTAGTGGCGG
AGGTTCTCTGCAAATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATCTGGGTCAAGAGCT
ACAGCCTGTACAGCAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGGCCGGCACAAGCAG
CCTGACCGAGTGTGTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACCTAGCCTGAAGTGC
ATCAGAGATCCCGCTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCTGGCGTGAC
CCCTCAGCCTGAGTCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCCAGCTCTAACAATAC
TGCTGCCACCACAGCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAGCCCTAGCACCGGCA
CAACAGAGATCAGCTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGA
GCTGACAGCCTCTGCCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTCTGATACAACAGTGG
CCATCAGCACCAGCACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGCCTGCTACCTGAAGT
CTAGACAGACACCTCCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGCCTGTCACATGGGGC
ACCAGCAGCAGAGATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTGTAGGCGGCCGCGTCGAGTCTAG
AGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC

CTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAAT
TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGG
AGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAAC
AGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCA
AGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCAC
ACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCA
CCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCT
GGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTA
TGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGC
TCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTC
GCTCCAGT

SEQ ID NO: 46 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GGCTTTCCCATAATTTCCTTTCAAGGTGGGGAGGGAGGTAGAGGGGTGATGTGGGGAGTACGCTGCAG
GGCCTCACTCCTTTTGCAGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCT
CCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCC
AAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCAC
TGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGA
AGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGT
CTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGA
CCACTTTGTCAAGCTCATCTCTTGGTACGACAATGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGAT
GGCTCATATGGCTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGAC
GTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCC
TGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGC
CACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCC
TCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC
TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAA
CTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACG
TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGA
GGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTG
CTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC
ACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA
GCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC
CAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTT
CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTG
GGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
ATGGAGACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCT
GACAACTCTTTTCATCTTCTAGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATG
GCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAG
AGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCAC

AGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAAT
AAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAA
GCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGG
GTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCT

SEQ ID NO: 47 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *TBP*

GCAGACTTCCATTTACAGTGAGGAGGTGAGCATTGCATTGAACAAAAGATGGCGTTTTCACTTGGAAT
TAGTTATCTGAAGCTTTAGGATTCCTCAGCAATATGATTATGAGACAAGAAAGGAAGATTCAGAAATG
AGTCTAGTTGAAGGCAGCAATTCAGAGAAGAAGATTCAGTTGTTATCATTGCCGTCCTGCTTGGTTTAT
GGCCTGGTTCAGGACCAAGGAGAGAAGTGTGAATACATGCCTCTTGAGCTATAGAATGAGACGCTGG
AGTCACTAAGATGATTTTTTAAAAGTATTGTTTTATAAACAAAAATAAGATTGTGACAAGGGATTCCA
CTATTAATGTTTTCATGCCTGTGCCTTAATCTGACTGGGTATGGTGAGAATTGTGCTTGCAGCTTTAAG
GTAAGAATTTTACCATCTTAATATGTTAAGAAGTGCCATTTCAGTCTCTCATCTCTACTCCAACTTGTCT
TCTTAGGTGCTAAAGTCAGAGCCGAAATCTACGAGGCCTTCGAGAACATCTACCCCATCCTGAAGGGC
TTCAGAAAGACCACCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGG
AGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA
GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGAC
CACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCA
AGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG
ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACT
TCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATAT
CATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGA
CAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC
CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGAGCGGCCGC
GTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT
GTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAA
ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC
AGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCAGAA
ATTTATGAAGCATTTGAAAACATCTACCCTATTCTAAAGGGATTCAGGAAGACGACGTAATGGCTCTC
ATGTACCCTTGCCTCCCCCACCCCCTTCTTTTTTTTTTTTTAAACAAATCAGTTTGTTTTGGTACCTTTAA
ATGGTGGTGTTGTGAGAAGATGGATGTTGAGTTGCAGGGTGTGGCACCAGGTGATGCCCTTCTGTAAG
TGCCCACCGCGGGATGCCGGGAAGGGGCATTATTTGTGCACTGAGAACACCGCGCAGCGTGACTGTG
AGTTGCTCATACCGTGCTGCTATCTGGGCAGCGCTGCCCATTTATTTATATGTAGATTTTAAACACTGC
TGTTGACAAGTTGGTTTGAGGGAGAAAACTTTAAGTGTTAAAGCCACCTCTATAATTGATTGGACTTTT
TAATTTTAATGTTTTTCCCCATGAACCACAGTTTTTATATTTCTACCAGAAAAGTAAAAATCTTTTTTAA
AAGTGTTGTTTTT

SEQ ID NO: 49 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *TBP*

CTGACCACAGCTCTGCAAGCAGACTTCCATTTACAGTGAGGAGGTGAGCATTGCATTGAACAAAAGAT
GGCGTTTTCACTTGGAATTAGTTATCTGAAGCTTTAGGATTCCTCAGCAATATGATTATGAGACAAGAA
AGGAAGATTCAGAAATGAGTCTAGTTGAAGGCAGCAATTCAGAGAAGAAGATTCAGTTGTTATCATTG
CCGTCCTGCTTGGTTTATGGCCTGGTTCAGGACCAAGGAGAGAAGTGTGAATACATGCCTCTTGAGCT
ATAGAATGAGACGCTGGAGTCACTAAGATGATTTTTTAAAAGTATTGTTTTATAAACAAAAATAAGAT
TGTGACAAGGGATTCCACTATTAATGTTTTCATGCCTGTGCCTTAATCTGACTGGGTATGGTGAGAATT
GTGCTTGCAGCTTTAAGGTAAGAATTTTACCATCTTAATATGTTAAGAAGTGCCATTTCAGTCTCTCAT
CTCTACTCCAACTTGTCTTCTTAGGGGCTAAAGTGCGGGCCGAGATCTACGAGGCCTTCGAGAATATCT
ACCCCATCCTGAAGGGCTTCAGAAAGACCACCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCA
GGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTG
GTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC
TGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA
GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGG
ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGA
GCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAAC
AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCC
ACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGG
CCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGA
AGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTG
TACAAGTGAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCT
TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG
GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG
GTGGGCTCTATGGTAGGTGCTAAAGTCAGAGCAGAAATTTATGAAGCATTTGAAAACATCTACCCTAT
TCTAAAGGGATTCAGGAAGACGACGTAATGGCTCTCATGTACCCTTGCCTCCCCCACCCCCTTCTTTTT
TTTTTTTTAAACAAATCAGTTTGTTTTGGTACCTTTAAATGGTGGTGTTGTGAGAAGATGGATGTTGAG
TTGCAGGGTGTGGCACCAGGTGATGCCCTTCTGTAAGTGCCCACCGCGGGATGCCGGGAAGGGGCATT
ATTTGTGCACTGAGAACACCGCGCAGCGTGACTGTGAGTTGCTCATACCGTGCTGCTATCTGGGCAGC
GCTGCCCATTTATTTATATGTAGATTTTAAACACTGCTGTTGACAAGTTGGTTTGAGGGAGAAAACTTT
AAGTGTTAAAGCCACCTCTATAATTGATTGGACTTTTTAATTTTAATGTTTTTCCCCATGAACCACAGTT
TTTATATTTCTACCAGAAAAGTAAAAATCTTT

SEQ ID NO: 50 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *TBP*

ACAAAAGATGGCGTTTTCACTTGGAATTAGTTATCTGAAGCTTTAGGATTCCTCAGCAATATGATTATG
AGACAAGAAAGGAAGATTCAGAAATGAGTCTAGTTGAAGGCAGCAATTCAGAGAAGAAGATTCAGTT
GTTATCATTGCCGTCCTGCTTGGTTTATGGCCTGGTTCAGGACCAAGGAGAGAAGTGTGAATACATGC
CTCTTGAGCTATAGAATGAGACGCTGGAGTCACTAAGATGATTTTTTAAAAGTATTGTTTTATAAACAA
AAATAAGATTGTGACAAGGGATTCCACTATTAATGTTTTCATGCCTGTGCCTTAATCTGACTGGGTATG
GTGAGAATTGTGCTTGCAGCTTTAAGGTAAGAATTTTACCATCTTAATATGTTAAGAAGTGCCATTTCA
GTCTCTCATCTCTACTCCAACTTGTCTTCTTAGGTGCTAAAGTCAGAGCAGAAATTTATGAAGCATTCG

AGAACATCTACCCTATTCTAAAGGGATTCAGGAAGACGACGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCT
GCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
ACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCG
GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT
GCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG
ACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA
ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTA
CAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTC
AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCA
TCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCAT
GGACGAGCTGTACAAGTGAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTC
GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGT
GCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT
ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT
GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGGGATTCAGGAAGACGACGTAATGGCTCTCATGTACCCTTGCCT
CCCCCACCCCCTTCTTTTTTTTTTTTTAAACAAATCAGTTTGTTTTGGTACCTTTAAATGGTGGTGTTGTG
AGAAGATGGATGTTGAGTTGCAGGGTGTGGCACCAGGTGATGCCCTTCTGTAAGTGCCCACCGCGGGA
TGCCGGGAAGGGGCATTATTTGTGCACTGAGAACACCGCGCAGCGTGACTGTGAGTTGCTCATACCGT
GCTGCTATCTGGGCAGCGCTGCCCATTTATTTATATGTAGATTTTAAACACTGCTGTTGACAAGTTGGT
TTGAGGGAGAAAACTTTAAGTGTTAAAGCCACCTCTATAATTGATTGGACTTTTTAATTTTAATGTTTT
TCCCCATGAACCACAGTTTTTATATTTCTACCAGAAAAGTAAAAATCTTTTTTAAAAGTGTTGTTTTTCT
AATTTATAACTCCTAGGGGTTATTTCTGTGCCAGACACA

SEQ ID NO: 51 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *G6PD*

GGCCCGGGGGACTCCACATGGTGGCAGGCAGTGGCATCAGCAAGACACTCTCTCCCTCACAGAACGT
GAAGCTCCCTGACGCCTATGAGCGCCTCATCCTGGACGTCTTCTGCGGGAGCCAGATGCACTTCGTGC
GCAGGTGAGGCCCAGCTGCCGGCCCCTGCATACCTGTGGGCTATGGGGTGGCCTTTGCCCTCCCTCCCT
GTGTGCCACCGGCCTCCCAAGCCATACCATGTCCCCTCAGCGACGAGCTCCGTGAGGCCTGGCGTATT
TTCACCCCACTGCTGCACCAGATTGAGCTGGAGAAGCCCAAGCCCATCCCCTATATTTATGGCAGGTG
AGGAAAGGGTGGGGGCTGGGGACAGAGCCCAGCGGGCAGGGGCGGGGTGAGGGTGGAGCTACCTCA
TGCCTCTCCTCCACCCGTCACTCTCCAGCCGAGGCCCCACGGAGGCAGACGAGCTGATGAAGAGAGTG
GGCTTCCAGTACGAGGGAACCTACAAATGGGTCAACCCTCACAAGCTGGGAAGCGGAGCTACTAACT
TCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
GCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCG
TGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGC
AAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTA
CCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCA
CCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCT
GGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTG

GAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA
ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC
CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC
GGCATGGACGAGCTGTACAAGTGAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATC
AGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTG
GAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG
TCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG
CATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTGGGTGAACCCCCACAAGCTCTGAGCCCTGGGCACCCAC
CTCCACCCCCGCCACGGCCACCCTCCTTCCCGCCGCCCGACCCCGAGTCGGGAGGACTCCGGGACCAT
TGACCTCAGCTGCACATTCCTGGCCCCGGGCTCTGGCCACCCTGGCCCGCCCCTCGCTGCTGCTACTAC
CCGAGCCCAGCTACATTCCTCAGCTGCCAAGCACTCGAGACCATCCTGGCCCCTCCAGACCCTGCCTG
AGCCCAGGAGCTGAGTCACCTCCTCCACTCACTCCAGCCCAACAGAAGGAAGGAGGAGGGCGCCCAT
TCGTCTGTCCCAGAGCTTATTGGCCACTGGGTCTCACTCCTGAGTGGGGCCAGGGTGGGAGGGAGGGA
CGAGGGGGAGGAAAGGGGCGAGCACCCACGTGAGAGAATCTGCCTGTGGCCTTGCCCGCCAGCCTCA
GTGCCACTTGACATTCCTTGTCACCAGCAACATCTCGAGCCCCCTGGATGTCC

SEQ ID NO: 52 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *E2F4*

CCAGGGGGCTGTAGTGGGGCCAGGCTGGACCTCTGTGCCCTGAGCATGGCTTTCTTGTTTTTCAGTTTT
GGAACTCCCCAAAGAGCTGTCAGAAATCTTTGATCCCACACGAGGTAGGCTGCTGCATTCCTCCCTGA
GGCTAGGGGTAAGGGACACAGCTCATTGGGTCCTATGGCTGTTTTCTTGCCCTTTTGAGGACCTTGTTG
TGGCGCTTATGGTAACTGGGGCAAAGGGTGAAGTTCCTGATGGGCAGGTGGGGTTCCCTTTCCTGGGC
TTTGGTGGGTGGAGAGGTGGGAGCTGGAATGTTAGTAACTGAGCTCCCTCCATTCCCAGAGTGCATGA
GCTCGGAGCTGCTGGAGGAGTTGATGTCCTCAGAAGGTGGGTGGCCCTGGAAGGTGGGAGTGGGTGT
GGGCAGGGGTTGGGCTGCTGCTAGGGGAGCCCTGGCCCAGGGCCTGAGACTAGTGCTCTCTGCAGTGT
TCGCCCCTCTGCTGAGACTTTCTCCTCCTCCTGGCGACCACGACTACATCTACAACCTGGACGAGAGCG
AGGGCGTGTGCGACCTGTTTGATGTGCCCGTGCTGAACCTGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTG
CTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA
CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGC
GAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGC
CCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC
CACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTT
CTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC
CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA
ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAA
GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATC
GGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGG
ACGAGCTGTACAAGTGAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA
CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC
CACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT

TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG
GGATGCGGTGGGCTCTATGGCCACCCCCGGGAGACCACGATTATATCTACAACCTGGACGAGAGTGA
AGGTGTCTGTGACCTCTTTGATGTGCCTGTTCTCAACCTCTGACTGACAGGGACATGCCCTGTGTGGCT
GGGACCCAGACTGTCTGACCTGGGGGTTGCCTGGGGACCTCTCCCACCCGACCCCTACAGAGCTTGAG
AGCCACAGACGCCTGGCTTCTCCGGCCTCCCCTCACCGCACAGTTCTGGCCACAGCTCCCGCTCCTGTG
CTGGCACTTCTGTGCTCGCAGAGCAGGGGAACAGGACTCAGCCCCCATCACCGTGGAGCCAAAGTGTT
TGCTTCTCCCTTTCTGCGGCCTTCGCCAGCCCAGGCTCGGCTGCCACCCAGTGGCACAGAACCGAGGA
GCTGCCATTACCCCCCATAGGGGGCAGTGTCTTGTTCCTGCCAGCCTCAGTGTCTTGCTTCTGCCAGCT
CCTTCCCCTAGGAGGGAAGGGTGGGGTGGAACTGGGCACATG

SEQ ID NO: 53 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *E2F4*

CCAGGCTGGACCTCTGTGCCCTGAGCATGGCTTTCTTGTTTTTCAGTTTTGGAACTCCCCAAAGAGCTG
TCAGAAATCTTTGATCCCACACGAGGTAGGCTGCTGCATTCCTCCCTGAGGCTAGGGGTAAGGGACAC
AGCTCATTGGGTCCTATGGCTGTTTTCTTGCCCTTTTGAGGACCTTGTTGTGGCGCTTATGGTAACTGGG
GCAAAGGGTGAAGTTCCTGATGGGCAGGTGGGGTTCCCTTTCCTGGGCTTTGGTGGGTGGAGAGGTGG
GAGCTGGAATGTTAGTAACTGAGCTCCCTCCATTCCCAGAGTGCATGAGCTCGGAGCTGCTGGAGGAG
TTGATGTCCTCAGAAGGTGGGTGGCCCTGGAAGGTGGGAGTGGGTGTGGGCAGGGGTTGGGCTGCTGC
TAGGGGAGCCCTGGCCCAGGGCCTGAGACTAGTGCTCTCTGCAGTGTTTGCCCCTCTGCTTCGTCTTAG
TCCTCCTCCGGGCGACCACGACTACATCTACAACCTGGACGAGAGCGAGGGCGTGTGCGACCTGTTTG
ATGTGCCCGTGCTGAACCTGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTG
GAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGG
TCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCAC
CTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCG
TGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTC
TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC
GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCT
ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA
CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGC
CCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
GGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGAGCGG
CCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAA
TAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAT
TATATCTACAACCTGGACGAGAGTGAAGGTGTCTGTGACCTCTTTGATGTGCCTGTTCTCAACCTCTGA
CTGACAGGGACATGCCCTGTGTGGCTGGGACCCAGACTGTCTGACCTGGGGGTTGCCTGGGGACCTCT
CCCACCCGACCCCTACAGAGCTTGAGAGCCACAGACGCCTGGCTTCTCCGGCCTCCCCTCACCGCACA
GTTCTGGCCACAGCTCCCGCTCCTGTGCTGGCACTTCTGTGCTCGCAGAGCAGGGGAACAGGACTCAG
CCCCCATCACCGTGGAGCCAAAGTGTTTGCTTCTCCCTTTCTGCGGCCTTCGCCAGCCCAGGCTCGGCT
GCCACCCAGTGGCACAGAACCGAGGAGCTGCCATTACCCCCCATAGGGGGCAGTGTCTTGTTCCTGCC

AGCCTCAGTGTCTTGCTTCTGCCAGCTCCTTCCCCTAGGAGGGAAGGGTGGGGTGGAACTGGGCACAT
GCCAGCACCACTTCTAGCTT

SEQ ID NO: 54 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *E2F4*

GTCAGAAATCTTTGATCCCACACGAGGTAGGCTGCTGCATTCCTCCCTGAGGCTAGGGGTAAGGGACA
CAGCTCATTGGGTCCTATGGCTGTTTTCTTGCCCTTTTGAGGACCTTGTTGTGGCGCTTATGGTAACTGG
GGCAAAGGGTGAAGTTCCTGATGGGCAGGTGGGGTTCCCTTTCCTGGGCTTTGGTGGGTGGAGAGGTG
GGAGCTGGAATGTTAGTAACTGAGCTCCCTCCATTCCCAGAGTGCATGAGCTCGGAGCTGCTGGAGGA
GTTGATGTCCTCAGAAGGTGGGTGGCCCTGGAAGGTGGGAGTGGGTGTGGGCAGGGGTTGGGCTGCT
GCTAGGGGAGCCCTGGCCCAGGGCCTGAGACTAGTGCTCTCTGCAGTGTTTGCCCCTCTGCTTCGTCTT
TCTCCACCCCCGGGAGACCACGATTATATCTACAACCTGGACGAGAGTGAAGGTGTCTGTGACCTCTT
CGACGTGCCCGTGCTCAACCTCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACG
TGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCT
GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC
ACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCT
CGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACT
TCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAAC
TACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA
TCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGT
CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCT
GCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAC
ATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGAGC
GGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCA
GCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCC
TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG
GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATG
GTGACTGACAGGGACATGCCCTGTGTGGCTGGGACCCAGACTGTCTGACCTGGGGGTTGCCTGGGGAC
CTCTCCCACCCGACCCCTACAGAGCTTGAGAGCCACAGACGCCTGGCTTCTCCGGCCTCCCCTCACCGC
ACAGTTCTGGCCACAGCTCCCGCTCCTGTGCTGGCACTTCTGTGCTCGCAGAGCAGGGGAACAGGACT
CAGCCCCCATCACCGTGGAGCCAAAGTGTTTGCTTCTCCCTTTCTGCGGCCTTCGCCAGCCCAGGCTCG
GCTGCCACCCAGTGGCACAGAACCGAGGAGCTGCCATTACCCCCCATAGGGGGCAGTGTCTTGTTCCT
GCCAGCCTCAGTGTCTTGCTTCTGCCAGCTCCTTCCCCTAGGAGGGAAGGGTGGGGTGGAACTGGGCA
CATGCCAGCACCACTTCTAGCTTCCTTCGCTATCCCCCACCCCCTGACCCTCCAGCTCCTCCTGGCCCTC
TCACGTGCCCACTTCTGCTGG

SEQ ID NO: 55 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *KIF11*

AGAGCAGGGTTTCTTGACAGCAGTGCTATTGGCATTTTAAACTGGATAATTCTTTGTTGTGATGGGCTT
TCCTGTGGACTGTACTATGTTGGTACACAAGAAAAACAGTGTACTATGTGAATACTCACTCAAAGCCA
GTAGCACTCCCTGATTGTAACACCAAAAAAGTCTCTCAGCATTGCCAAATGTCCCCTGTGGCAGCAGA
ATCACTCCCTGATGAGAACCACTACCCTGGAGTAAAATCTATAACTATGTCTTAGAAAATAACACAGA

AAATTAATATTTCTTTCACTCTACTCCTTCCATTAGTGATCAAATAAAGAAGGCATTTGGCGCTACTTG
CCAAATTGTTGGCTCAAACTTGTGCTGAACCTTTTTTGGTTTTCTACACTTAAGTTTTTTTGCCTATAAC
CCAGAGAACTTTGAAAATAGAGTGTAGTTAATGTGTATCTAATGTTACTTTGTATTGACTTAATTTACC
GGCCTTTAATCCACAGCATAAGAAGTCCCACGGCAAGGACAAAGAGAACCGGGGCATCAACACACTG
GAACGGTCCAAGGTCGAGGAAACAACCGAGCACCTGGTCACCAAGAGCAGACTGCCTCTGAGAGCCC
AGATCAACCTGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG
ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
GCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCC
TGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC
GCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG
TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCT
GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGAGCGGCCGCGTCG
AGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG
TTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATG
AGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAAAAATCA
CATGGAAAAGACAAAGAAAACAGAGGCATTAACACACTGGAGAGGTCTAAAGTGGAAGAAACTACA
GAGCACTTGGTTACAAAGAGCAGATTACCTCTGCGAGCCCAGATCAACCTTTAATTCACTTGGGGGTT
GGCAATTTTATTTTTAAAGAAAACTTAAAAATAAAACCTGAAACCCCAGAACTTGAGCCTTGTGTATA
GATTTTAAAAGAATATATATATCAGCCGGGCGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAG
GCTGAGGCGGGTGGATTGCTTGAGCCCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGCAAAACCTCGT
CTCTGTTAAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCACACTCCTGTAATCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCA
CGAGAATCACTTGAACCCAGGAAGCGGGGTTGCAGTGAGCCAAAGGTACACCACTACACTCCAGCCT
GGGCAACAGAGCAAGACT

SEQ ID NO: 56 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *KIF11*

TTCCTGTGGACTGTACTATGTTGGTACACAAGAAAAACAGTGTACTATGTGAATACTCACTCAAAGCC
AGTAGCACTCCCTGATTGTAACACCAAAAAAGTCTCTCAGCATTGCCAAATGTCCCCTGTGGCAGCAG
AATCACTCCCTGATGAGAACCACTACCCTGGAGTAAAATCTATAACTATGTCTTAGAAAATAACACAG
AAAATTAATATTTCTTTCACTCTACTCCTTCCATTAGTGATCAAATAAAGAAGGCATTTGGCGCTACTT
GCCAAATTGTTGGCTCAAACTTGTGCTGAACCTTTTTTGGTTTTCTACACTTAAGTTTTTTTGCCTATAA
CCCAGAGAACTTTGAAAATAGAGTGTAGTTAATGTGTATCTAATGTTACTTTGTATTGACTTAATTTTC
CCGCCTTAAATCCACAGCATAAAAAATCACATGGAAAAGACAAAGAAAACAGAGGCATTAACACACT
GGAGAGGTCTAAAGTGGAAGAAACAACCGAGCACCTGGTCACCAAGAGCAGACTGCCTCTGAGAGCC
CAGATCAACCTGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGA
ACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTG

GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACC
CTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC
CGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG
TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCT
GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGAGCGGCCGCGTCG
AGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG
TTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATG
AGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACTACAGA
GCACTTGGCTACATAGAGCAGATTACCTCTGCGAGCCCAGATCAACCTTTAATTCACTTGGGGGTTGG
CAATTTTATTTTTAAAGAAAACTTAAAAATAAAACCTGAAACCCCAGAACTTGAGCCTTGTGTATAGA
TTTTAAAAGAATATATATATCAGCCGGGCGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGC
TGAGGCGGGTGGATTGCTTGAGCCCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGCAAAACCTCGTCT
CTGTTAAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCACACTCCTGTAATCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCACG
AGAATCACTTGAACCCAGGAAGCGGGGTTGCAGTGAGCCAAAGGTACACCACTACACTCCAGCCTGG
GCAACAGAGCAAGACTCGGTCTCAAAAACAAAATTTAAAAAAGATATAAGGCAGTACTGTAAATTCA
GTTGAATTTTGATATCT

SEQ ID NO: 57 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *KIF11*

TTAAACTGGATAATTCTTTGTTGTGATGGGCTTTCCTGTGGACTGTACTATGTTGGTACACAAGAAAAA
CAGTGTACTATGTGAATACTCACTCAAAGCCAGTAGCACTCCCTGATTGTAACACCAAAAAAGTCTCT
CAGCATTGCCAAATGTCCCCTGTGGCAGCAGAATCACTCCCTGATGAGAACCACTACCCTGGAGTAAA
ATCTATAACTATGTCTTAGAAAATAACACAGAAAATTAATATTTCTTTCACTCTACTCCTTCCATTAGT
GATCAAATAAAGAAGGCATTTGGCGCTACTTGCCAAATTGTTGGCTCAAACTTGTGCTGAACCTTTTTT
GGTTTTCTACACTTAAGTTTTTTTGCCTATAACCCAGAGAACTTTGAAAATAGAGTGTAGTTAATGTGT
ATCTAATGTTACTTTGTATTGACTTAATTTTCCCGCCTTAAATCCACAGCATAAAAAATCACATGGAAA
AGACAAAGAAAACAGAGGCATCAACACACTGGAACGGTCCAAGGTCGAGGAAACAACCGAGCACCT
GGTCACCAAGAGCAGACTGCCTCTGAGAGCCCAGATCAACCTGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGC
CTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT
TCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC
GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
TGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG
ACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA
ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTA
CAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTC

AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCA
TCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCAT
GGACGAGCTGTACAAGTGAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTC
GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGT
GCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT
ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT
GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTAACACACTGGAGAGTTCTGAAGTGGAAGAAACTACAGAGCAC
TTGGTTACAAAGAGCAGATTACCTCTGCGAGCCCAGATCAACCTTTAATTCACTTGGGGGTTGGCAAT
TTTATTTTTAAAGAAAACTTAAAAATAAAACCTGAAACCCCAGAACTTGAGCCTTGTGTATAGATTTTA
AAAGAATATATATATCAGCCGGGCGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGG
CGGGTGGATTGCTTGAGCCCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGCAAAACCTCGTCTCTGTT
AAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCACACTCCTGTAATCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCACGAGAA
TCACTTGAACCCAGGAAGCGGGGTTGCAGTGAGCCAAAGGTACACCACTACACTCCAGCCTGGGCAA
CAGAGCAAGACTCGGTCTCAAAAACAAAATTTAAAAAAGATATAAGGC

SEQ ID NO: 48 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTCAGC
TACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTG
TTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATAT
TTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGT
CTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAA
ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTT
GTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTG
GGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTAC
TTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC
ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCACTACTA
TGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTA
TATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGAT
TTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAA
TCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAA
GGAATGATGAATGATGAATGAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGC

CTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA
GGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT
TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG
CTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGG
CCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTC
ACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATG
TAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCT
GTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTG
TGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTC
CAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTG
GCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 205 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGTGGCAACTGCTGCTGCCTACAGCTCTGCTGCTTCTGGTGTCTGCCGGCATGAGAAC
CGAGGATCTGCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGAACCTCAGTGGTACAGAGTGCTGGAAAAGGACAGC
GTGACCCTGAAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCGAGGACAATAGCACCCAGTGGTTCCACAACGAGAG
CCTGATCAGCAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATCGATGCCGCCACCGTGGACGACAGCGGCGAGTACA
GATGCCAGACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACCCTGTGCAGCTGGAAGTGCACATTGGATGGTTGCTG
CTGCAAGCCCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAGGACCCCATCCACCTGAGATGCCACTCTTGGAAGAA
CACAGCCCTGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAACGGCAAGGGCAGAAAGTACTTCCACCACAACAGC
GACTTCTACATCCCCAAGGCCACACTGAAGGACTCCGGCTCCTACTTCTGCAGAGGCCTGGTCGGCAG
CAAGAACGTGTCCAGCGAGACAGTGAACATCACCATCACACAGGGCCTCGCCGTGTCTACCATCAGCA
GCTTTTTCCCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTGCCTGGTCATGGTGCTGCTGTTCGCCGTGGATACCG
GCCTGTACTTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTCCAGCACCAGAGACTGGAAGGACCACAAGTTCAA
GTGGCGGAAGGACCCTCAGGACAAGTAAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCT
GATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGAC
CCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAG
CAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGC
CCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAG
AGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAG
TTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAA

AGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGC
TGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGT
AGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACA
GGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 206 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GTCGACGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAAC
ATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCT
CACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAA
AACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCAT
CCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGA
CGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAG
AGACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACA
ACTCTTTACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCA
TATGGCTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG
GAGAACCCTGGACCTATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTC
CTCCTGATCCCAGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGT
CACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATG
GAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTT
TTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGCTCCA
CCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTC
AGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTAC
CCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGG
GGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAA
GAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAAC
ATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
GCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTAT
CCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCT
GGTGGTGGTTGGGGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGT
GAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCC
ACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT
CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAG
CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCT
CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAAAGCGGCC
GCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT
CTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATA
AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTT

GGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCA
CCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCA
GTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCC
TAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCT
TATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGG
AGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACC
ATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCC
TTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 207 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GTCGACGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAAC
ATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCT
CACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAA
AACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCAT
CCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGA
CGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAG
AGACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACA
ACTCTTTACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCA
TATGGCTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG
GAGAACCCTGGACCTATGGCACTCCCCGTCACCGCCCTTCTCTTGCCCCTCGCCCTGCTGCTGCATGCT
GCCAGGCCCATGGACGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCCGGTGGAGGACTCGTCCAACCGGGCGGATCCC
TTCGCTTGTCCTGCGCCGCATCAGGCTTCAGCTTCACCAACTATGGCGTCCACTGGGTCAGACAGGCCC
CCGGAAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTGATCTGGAGCGGCGGGAACACCGACTACAACACCTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACTATTAGCCGCGACAACTCCAAGAACACTCTGTACCTCCAAATGAACTCCCTGA
GGGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCGAGAGCCCTGACCTACTACGACTACGAGTTCGCGTAC
TGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTCCAGCGGTGGTGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGTTCTGGTG
GCGGGGGATCAGAAATCGTGCTGACTCAGTCCCCTGCGACCTTGTCCCTGAGCCCTGGAGAACGGGCC
ACCCTGAGCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCGGGACAAATATTCACTGGTACCAGCAGAAACCCGGAC
AAGCACCACGGCTGCTGATCTACTACGCCTCCGAGTCGATTTCCGGAATCCCGGCTCGCTTTTCGGGGT
CTGGATCGGGAACGGACTTCACTCTGACCATCTCGTCGCTGGAACCCGAGGATTTCGCCGTGTACTAC
TGCCAACAGAACAACAATTGGCCGACCACGTTCGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATTAAGGGATCAC
TGGAAGCGGCCGCAACCACAACACCTGCTCCAAGGCCCCCCACACCCGCTCCAACTATAGCCAGCCAA
CCATTGAGCCTCAGACCTGAAGCTTGCAGGCCCGCAGCAGGAGGCGCCGTCCATACGCGAGGCCTGG
ACTTCGCGTGTGATATTTATATTTGGGCCCCTTTGGCCGGAACATGTGGGGTGTTGCTTCTCTCCCTTGT
GATCACTCTGTATTGTAAGCGCGGGAGAAAGAAGCTCCTGTACATCTTCAAGCAGCCTTTTATGCGAC
CTGTGCAAACCACTCAGGAAGAAGATGGGTGTTCATGCCGCTTCCCCGAGGAGGAAGAAGGAGGGTG
TGAACTGAGGGTGAAATTTTCTAGAAGCGCCGATGCTCCCGCATATCAGCAGGGTCAGAATCAGCTCT
ACAATGAATTGAATCTCGGCAGGCGAGAAGAGTACGATGTTCTGGACAAGAGACGGGGCAGGGATCC
CGAGATGGGGGGAAAGCCCCGGAGAAAAAATCCTCAGGAGGGGTTGTACAATGAGCTGCAGAAGGA
CAAGATGGCTGAAGCCTATAGCGAGATCGGAATGAAAGGCGAAAGACGCAGAGGCAAGGGGCATGA
CGGTCTGTACCAGGGTCTCTCTACAGCCACCAAGGACACTTATGATGCGTTGCATATGCAAGCCTTGC

CACCCCGCTAAAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTG
CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTC
CCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGG
GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG
CGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGG
AGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGG
GAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCT
TGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAAC
CAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGT
GAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCC
TTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTA
CTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 208 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAATT
GGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCAC
ACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAC
TGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAACCTGATCATCCT
GGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACT
GGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACCA
GCGGAAGCGGAGCCACAAACTTCTCTCTGCTGAAGCAGGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCTGGACC
TATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCCTGTACA
GCAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGGCCGGCACAAGCAGCCTGACCGAGTG
TGTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACCTAGCCTGAAGTGCATCAGAGATCCC
GCTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCTGGCGTGACCCCTCAGCCTGA
GTCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCCAGCTCTAACAATACTGCTGCCACCAC
AGCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAGCCCTAGCACCGGCACAACAGAGATCA
GCTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGAGCTGACAGCCTCT
GCCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCACCAG
CACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGCCTGCTACCTGAAGTCTAGACAGACACC
TCCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGCCTGTCACATGGGGCACCAGCAGCAGA
GATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTGGGAAGCGGAGCCACAAACTTCTCTCTGCTGAAGC

AGGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGT
GGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC
GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC
CTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA
AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAG
GACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCG
AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAA
CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC
CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACG
GCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAG
AAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCT
GTACAAGTAAGCGGCCGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC
TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG
GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG
GTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAG
TAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGA
GTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTG
AAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACC
AGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTG
AGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCT
TGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTAC
TTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 209 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGTGGCAGCTGTTGCTGCCGACAGCCCTCCTGTTGCTGGTCTCCGCTGGCATGAGAAC
CGAGGATCTGCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGAACCTCAGTGGTACAGAGTGCTGGAAAAGGACAGC
GTGACCCTGAAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCGAGGACAATAGCACCCAGTGGTTCCACAACGAGAG
CCTGATCAGCAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATCGATGCCGCCACCGTGGACGACAGCGGCGAGTACA
GATGCCAGACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACCCTGTGCAGCTGGAAGTGCACATTGGATGGTTGCTG
CTGCAAGCCCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAGGACCCCATCCACCTGAGATGCCACTCTTGGAAGAA
CACAGCCCTGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAACGGCAAGGGCAGAAAGTACTTCCACCACAACAGC

GACTTCTACATCCCCAAGGCCACACTGAAGGACTCCGGCTCCTACTTCTGCAGAGGCCTGGTCGGCAG
CAAGAACGTGTCCAGCGAGACAGTGAACATCACCATCACACAGGGCCTCGCCGTGTCTACCATCAGCA
GCTTTTTCCCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTGCCTGGTCATGGTGCTGCTGTTCGCCGTGGATACCG
GCCTGTACTTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTCCAGCACCAGAGACTGGAAGGACCACAAGTTCAA
GTGGCGGAAGGACCCTCAGGACAAGGGAAGCGGAGCCACAAACTTCTCTCTGCTGAAGCAGGCAGGA
GATGTTGAAGAAAACCCTGGACCTATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAG
AGTGCACAGCAATTGGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATG
CACATCGACGCCACACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTG
CTTTCTGCTGGAACTGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAA
ACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGA
GTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATG
TTCATCAACACCAGCGGAAGCGGAGCCACAAACTTCTCTCTGCTGAAGCAGGCAGGAGATGTTGAAG
AAAACCCTGGACCTATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATCTGGGTCAAGAGC
TACAGCCTGTACAGCAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGGCCGGCACAAGCA
GCCTGACCGAGTGTGTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACCTAGCCTGAAGTG
CATCAGAGATCCCGCTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCTGGCGTGA
CCCCTCAGCCTGAGTCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCCAGCTCTAACAATA
CTGCTGCCACCACAGCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAGCCCTAGCACCGGC
ACAACAGAGATCAGCTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGG
AGCTGACAGCCTCTGCCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTCTGATACAACAGTG
GCCATCAGCACCAGCACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGCCTGCTACCTGAAG
TCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGCCTGTCACATGGGG
CACCAGCAGCAGAGATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTGTAAGCGGCCGCGTCGAGTCTA
GAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCC
CCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA
TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGG
GAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAGCAA
CAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGC
AAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCA
CACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGC
ACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGT
CTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGG
TATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCC
GCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCC
TCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 210 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC

TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAATT
GGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCAC
ACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAC
TGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAACCTGATCATCCT
GGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACT
GGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACCA
GCTCTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCGGCGGTGGTAGTGGCGG
AGGTTCTCTGCAAATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATCTGGGTCAAGAGCT
ACAGCCTGTACAGCAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGGCCGGCACAAGCAG
CCTGACCGAGTGTGTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACCTAGCCTGAAGTGC
ATCAGAGATCCCGCTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCTGGCGTGAC
CCCTCAGCCTGAGTCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCCAGCTCTAACAATAC
TGCTGCCACCACAGCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAGCCCTAGCACCGGCA
CAACAGAGATCAGCTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGA
GCTGACAGCCTCTGCCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTCTGATACAACAGTGG
CCATCAGCACCAGCACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGCCTGCTACCTGAAGT
CTAGACAGACACCTCCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGCCTGTCACATGGGGC
ACCAGCAGCAGAGATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTGGGAAGCGGAGCCACAAACTTCT
CTCTGCTGAAGCAGGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCTGGACCTATGTGGCAGCTGTTGCTGCCGACA
GCCCTCCTGTTGCTGGTCTCCGCTGGCATGAGAACCGAGGATCTGCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGA
ACCTCAGTGGTACAGAGTGCTGGAAAAGGACAGCGTGACCCTGAAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCG
AGGACAATAGCACCCAGTGGTTCCACAACGAGAGCCTGATCAGCAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATC
GATGCCGCCACCGTGGACGACAGCGGCGAGTACAGATGCCAGACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACC
CTGTGCAGCTGGAAGTGCACATTGGATGGTTGCTGCTGCAAGCCCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAG
GACCCCATCCACCTGAGATGCCACTCTTGGAAGAACACAGCCCTGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAA
CGGCAAGGGCAGAAAGTACTTCCACCACAACAGCGACTTCTACATCCCCAAGGCCACACTGAAGGAC
TCCGGCTCCTACTTCTGCAGAGGCCTGGTCGGCAGCAAGAACGTGTCCAGCGAGACAGTGAACATCAC
CATCACACAGGGCCTCGCCGTGTCTACCATCAGCAGCTTTTTCCCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTG
CCTGGTCATGGTGCTGCTGTTCGCCGTGGATACCGGCCTGTACTTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTC
CAGCACCAGAGACTGGAAGGACCACAAGTTCAAGTGGCGGAAGGACCCTCAGGACAAGTAAGCGGCC
GCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT
CTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATA
AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTT
GGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCA
CCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCA

GTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCC
TAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCT
TATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGG
AGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACC
ATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCC
TTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 211 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCACAGCAATT
GGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCAC
ACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAC
TGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAACCTGATCATCCT
GGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACT
GGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACCA
GCGGAAGCGGAGCCACAAACTTCTCTCTGCTGAAGCAGGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCTGGACC
TATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCCTGTACA
GCAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGGCCGGCACAAGCAGCCTGACCGAGTG
TGTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACCTAGCCTGAAGTGCATCAGAGATCCC
GCTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAACAGCTGGCGTGACCCCTCAGCCTGA
GTCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCCAGCTCTAACAATACTGCTGCCACCAC
AGCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAGCCCTAGCACCGGCACAACAGAGATCA
GCTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACCGCCAAGAATTGGGAGCTGACAGCCTCT
GCCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTCTGATACAACAGTGGCCATCAGCACCAG
CACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGCCTGCTACCTGAAGTCTAGACAGACACC
TCCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGCCTGTCACATGGGGCACCAGCAGCAGA
GATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTGGGAAGCGGAGCCACAAACTTCTCTCTGCTGAAGC
AGGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCTGGACCTATGTGGCAGCTGTTGCTGCCGACAGCCCTCCTGTTG
CTGGTCTCCGCTGGCATGAGAACCGAGGATCTGCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGAACCTCAGTGGTA
CAGAGTGCTGGAAAAGGACAGCGTGACCCTGAAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCGAGGACAATAGC
ACCCAGTGGTTCCACAACGAGAGCCTGATCAGCAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATCGATGCCGCCAC
CGTGGACGACAGCGGCGAGTACAGATGCCAGACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACCCTGTGCAGCTG
GAAGTGCACATTGGATGGTTGCTGCTGCAAGCCCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAGGACCCCATCCA

CCTGAGATGCCACTCTTGGAAGAACACAGCCCTGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAACGGCAAGGGC
AGAAAGTACTTCCACCACAACAGCGACTTCTACATCCCCAAGGCCACACTGAAGGACTCCGGCTCCTA
CTTCTGCAGAGGCCTGGTCGGCAGCAAGAACGTGTCCAGCGAGACAGTGAACATCACCATCACACAG
GGCCTCGCCGTGTCTACCATCAGCAGCTTTTTCCCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTGCCTGGTCATG
GTGCTGCTGTTCGCCGTGGATACCGGCCTGTACTTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTCCAGCACCAG
AGACTGGAAGGACCACAAGTTCAAGTGGCGGAAGGACCCTCAGGACAAGTAAGCGGCCGCGTCGAGT
CTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTT
GCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGG
AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG
GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATTTGGCTACAG
CAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCC
AGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCA
CCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGC
CGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAG
GGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACC
TGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTT
CCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTC
TCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 212 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGTGGCAGCTGTTGCTGCCGACAGCCCTCCTGTTGCTGGTCTCCGCTGGCATGAGAAC
CGAGGATCTGCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGAACCTCAGTGGTACAGAGTGCTGGAAAAGGACAGC
GTGACCCTGAAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCGAGGACAATAGCACCCAGTGGTTCCACAACGAGAG
CCTGATCAGCAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATCGATGCCGCCACCGTGGACGACAGCGGCGAGTACA
GATGCCAGACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACCCTGTGCAGCTGGAAGTGCACATTGGATGGTTGCTG
CTGCAAGCCCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAGGACCCCATCCACCTGAGATGCCACTCTTGGAAGAA
CACAGCCCTGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAACGGCAAGGGCAGAAAGTACTTCCACCACAACAGC
GACTTCTACATCCCCAAGGCCACACTGAAGGACTCCGGCTCCTACTTCTGCAGAGGCCTGGTCGGCAG
CAAGAACGTGTCCAGCGAGACAGTGAACATCACCATCACACAGGGCCTCGCCGTGTCTACCATCAGCA
GCTTTTTCCCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTGCCTGGTCATGGTGCTGCTGTTCGCCGTGGATACCG
GCCTGTACTTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTCCAGCACCAGAGACTGGAAGGACCACAAGTTCAA
GTGGCGGAAGGACCCTCAGGACAAGGGAAGCGGAGCCACAAACTTCTCTCTGCTGAAGCAGGCAGGA

GATGTTGAAGAAAACCCTGGACCTATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAG
AGTGCACAGCAATTGGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATG
CACATCGACGCCACACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTG
CTTTCTGCTGGAACTGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAA
ACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGA
GTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATG
TTCATCAACACCAGCTCTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCGGCG
GTGGTAGTGGCGGAGGTTCTCTGCAAATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATC
TGGGTCAAGAGCTACAGCCTGTACAGCAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGG
CCGGCACAAGCAGCCTGACCGAGTGTGTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACC
TAGCCTGAAGTGCATCAGAGATCCCGCTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAA
CAGCTGGCGTGACCCCTCAGCCTGAGTCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCC
AGCTCTAACAATACTGCTGCCACCACAGCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAG
CCCTAGCACCGGCACAACAGAGATCAGCTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACC
GCCAAGAATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTC
TGATACAACAGTGGCCATCAGCACCAGCACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGC
CTGCTACCTGAAGTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGC
CTGTCACATGGGGCACCAGCAGCAGAGATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTGTAAGCGGC
CGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAA
TAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAT
TTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACC
ACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTC
AGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGC
CTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTC
TTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGG
GAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAAC
CATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGC
CTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 213 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA

CCCTGGACCTATGTGGCAGCTGTTGCTGCCGACAGCCCTCCTGTTGCTGGTCTCCGCTGGCATGAGAAC
CGAGGATCTGCCTAAGGCCGTGGTGTTCCTGGAACCTCAGTGGTACAGAGTGCTGGAAAAGGACAGC
GTGACCCTGAAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCCGAGGACAATAGCACCCAGTGGTTCCACAACGAGAG
CCTGATCAGCAGCCAGGCCAGCAGCTACTTTATCGATGCCGCCACCGTGGACGACAGCGGCGAGTACA
GATGCCAGACCAATCTGAGCACCCTGAGCGACCCTGTGCAGCTGGAAGTGCACATTGGATGGTTGCTG
CTGCAAGCCCCTAGATGGGTGTTCAAAGAAGAGGACCCCATCCACCTGAGATGCCACTCTTGGAAGAA
CACAGCCCTGCACAAAGTGACCTACCTGCAGAACGGCAAGGGCAGAAAGTACTTCCACCACAACAGC
GACTTCTACATCCCCAAGGCCACACTGAAGGACTCCGGCTCCTACTTCTGCAGAGGCCTGGTCGGCAG
CAAGAACGTGTCCAGCGAGACAGTGAACATCACCATCACACAGGGCCTCGCCGTGTCTACCATCAGCA
GCTTTTTCCCACCTGGCTATCAGGTGTCCTTCTGCCTGGTCATGGTGCTGCTGTTCGCCGTGGATACCG
GCCTGTACTTCAGCGTCAAGACCAACATCCGGTCCAGCACCAGAGACTGGAAGGACCACAAGTTCAA
GTGGCGGAAGGACCCTCAGGACAAGGGAAGCGGAGCCACAAACTTCTCTCTGCTGAAGCAGGCAGGA
GATGTTGAAGAAAACCCTGGACCTATGGATTGGACCTGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCCACAAG
AGTGCACAGCAATTGGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATG
CACATCGACGCCACACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTG
CTTTCTGCTGGAACTGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAA
ACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGA
GTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTCCTCCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATG
TTCATCAACACCAGCTCTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCGGCG
GTGGTAGTGGCGGAGGTTCTCTGCAAATCACCTGTCCTCCACCTATGAGCGTGGAACACGCCGACATC
TGGGTCAAGAGCTACAGCCTGTACAGCAGAGAGCGGTACATCTGCAACAGCGGCTTCAAGAGAAAGG
CCGGCACAAGCAGCCTGACCGAGTGTGTGCTGAACAAGGCCACAAACGTGGCCCACTGGACCACACC
TAGCCTGAAGTGCATCAGAGATCCCGCTCTGGTTCATCAGAGGCCTGCCCCTCCATCTACAGTGACAA
CAGCTGGCGTGACCCCTCAGCCTGAGTCTCTGTCTCCATCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCTCTCCC
AGCTCTAACAATACTGCTGCCACCACAGCCGCTATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCTAGCAAGAG
CCCTAGCACCGGCACAACAGAGATCAGCTCTCACGAGAGCAGCCACGGAACACCTTCTCAGACCACC
GCCAAGAATTGGGAGCTGACAGCCTCTGCCTCTCATCAGCCACCTGGCGTGTACCCACAGGGCCACTC
TGATACAACAGTGGCCATCAGCACCAGCACCGTTCTGCTGTGTGGCCTGTCTGCTGTTAGCCTGCTGGC
CTGCTACCTGAAGTCTAGACAGACACCTCCTCTGGCCAGCGTGGAAATGGAAGCCATGGAAGCTCTGC
CTGTCACATGGGGCACCAGCAGCAGAGATGAGGACCTCGAGAATTGCAGCCACCACCTGTAAGCGGC
CGCGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAA
TAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAT
TTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACC
ACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTC
AGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGC
CTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTC
TTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGG
GAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAAC

CATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGC
CTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 214 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGTCAAATATTACAGATCCACAGATGTGGGATTTTGATGATCTAAATTTCACTGGCAT
GCCACCTGCAGATGAAGATTACAGCCCCTGTATGCTAGAAACTGAGACACTCAACAAGTATGTTGTGA
TCATCGCCTATGCCCTAGTGTTCCTGCTGAGCCTGCTGGGAAACTCCCTGGTGATGCTGGTCATCTTAT
ACAGCAGGGTCGGCCGCTCCGTCACTGATGTCTACCTGCTGAACCTGGCCTTGGCCGACCTACTCTTTG
CCCTGACCTTGCCCATCTGGGCCGCCTCCAAGGTGAATGGCTGGATTTTTGGCACATTCCTGTGCAAGG
TGGTCTCACTCCTGAAGGAAGTCAACTTCTACAGTGGCATCCTGCTGTTGGCCTGCATCAGTGTGGACC
GTTACCTGGCCATTGTCCATGCCACACGCACACTGACCCAGAAGCGTCACTTGGTCAAGTTTGTTTGTC
TTGGCTGCTGGGGACTGTCTATGAATCTGTCCCTGCCCTTCTTCCTTTTCCGCCAGGCTTACCATCCAAA
CAATTCCAGTCCAGTTTGCTATGAGGTCCTGGGAAATGACACAGCAAAATGGCGGATGGTGTTGCGGA
TCCTGCCTCACACCTTTGGCTTCATCGTGCCGCTGTTTGTCATGCTGTTCTGCTATGGATTCACCCTGCG
TACACTGTTTAAGGCCCACATGGGGCAGAAGCACCGAGCCATGAGGGTCATCTTTGCTGTCGTCCTCA
TCTTCCTGCTTTGCTGGCTGCCCTACAACCTGGTCCTGCTGGCAGACACCCTCATGAGGACCCAGGTGA
TCCAGGAGAGCTGTGAGCGCCGCAACAACATCGGCCGGGCCCTGGATGCCACTGAGATTCTGGGATTT
CTCCATAGCTGCCTCAACCCCATCATCTACGCCTTCATCGGCCAAAATTTTCGCCATGGATTCCTCAAG
ATCCTGGCTATGCATGGCCTGGTCAGCAAGGAGTTCTTGGCACGTCATCGTGTTACCTCCTACACTTCT
TCGTCTGTCAATGTCTCTTCCAACCTCTGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCA
CATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAG
ACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTT
GCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAA
GTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCT
GGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTA
GGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAG
GAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 215 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC

CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGAGTTGAGGAAGTACGGCCCTGGAAGACTGGCGGGGACAGTTATAGGAGGAGCT
GCTCAGAGTAAATCACAGACTAAATCAGACTCAATCACAAAAGAGTTCCTGCCAGGCCTTTACACAGC
CCCTTCCTCCCCGTTCCCGCCCTCACAGGTGAGTGACCACCAAGTGCTAAATGACGCCGAGGTTGCCG
CCCTCCTGGAGAACTTCAGCTCTTCCTATGACTATGGAGAAAACGAGAGTGACTCGTGCTGTACCTCC
CCGCCCTGCCCACAGGACTTCAGCCTGAACTTCGACCGGGCCTTCCTGCCAGCCCTCTACAGCCTCCTC
TTTCTGCTGGGGCTGCTGGGCAACGGCGCGGTGGCAGCCGTGCTGCTGAGCCGGCGGACAGCCCTGAG
CAGCACCGACACCTTCCTGCTCCACCTAGCTGTAGCAGACACGCTGCTGGTGCTGACACTGCCGCTCT
GGGCAGTGGACGCTGCCGTCCAGTGGGTCTTTGGCTCTGGCCTCTGCAAAGTGGCAGGTGCCCTCTTC
AACATCAACTTCTACGCAGGAGCCCTCCTGCTGGCCTGCATCAGCTTTGACCGCTACCTGAACATAGTT
CATGCCACCCAGCTCTACCGCCGGGGGCCCCCGGCCCGCGTGACCCTCACCTGCCTGGCTGTCTGGGG
GCTCTGCCTGCTTTTCGCCCTCCCAGACTTCATCTTCCTGTCGGCCCACCACGACGAGCGCCTCAACGC
CACCCACTGCCAATACAACTTCCCACAGGTGGGCCGCACGGCTCTGCGGGTGCTGCAGCTGGTGGCTG
GCTTTCTGCTGCCCCTGCTGGTCATGGCCTACTGCTATGCCCACATCCTGGCCGTGCTGCTGGTTTCCA
GGGGCCAGCGGCGCCTGCGGGCCATGCGGCTGGTGGTGGTGGTCGTGGTGGCCTTTGCCCTCTGCTGG
ACCCCCTATCACCTGGTGGTGCTGGTGGACATCCTCATGGACCTGGGCGCTTTGGCCCGCAACTGTGG
CCGAGAAAGCAGGGTAGACGTGGCCAAGTCGGTCACCTCAGGCCTGGGCTACATGCACTGCTGCCTCA
ACCCGCTGCTCTATGCCTTTGTAGGGGTCAAGTTCCGGGAGCGGATGTGGATGCTGCTCTTGCGCCTGG
GCTGCCCCAACCAGAGAGGGCTCCAGAGGCAGCCATCGTCTTCCCGCCGGGATTCATCCTGGTCTGAG
ACCTCAGAGGCCTCCTACTCGGGCTTGTGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCC
ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGA
GACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGT
TGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAA
GTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCT
GGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTA
GGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAG
GAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 216 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT

TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGTCCTTGAGGTGAGTGACCACCAAGTGCTAAATGACGCCGAGGTTGCCGCCCTCC
TGGAGAACTTCAGCTCTTCCTATGACTATGGAGAAAACGAGAGTGACTCGTGCTGTACCTCCCCGCCC
TGCCCACAGGACTTCAGCCTGAACTTCGACCGGGCCTTCCTGCCAGCCCTCTACAGCCTCCTCTTTCTG
CTGGGGCTGCTGGGCAACGGCGCGGTGGCAGCCGTGCTGCTGAGCCGGCGGACAGCCCTGAGCAGCA
CCGACACCTTCCTGCTCCACCTAGCTGTAGCAGACACGCTGCTGGTGCTGACACTGCCGCTCTGGGCA
GTGGACGCTGCCGTCCAGTGGGTCTTTGGCTCTGGCCTCTGCAAAGTGGCAGGTGCCCTCTTCAACATC
AACTTCTACGCAGGAGCCCTCCTGCTGGCCTGCATCAGCTTTGACCGCTACCTGAACATAGTTCATGCC
ACCCAGCTCTACCGCCGGGGGCCCCCGGCCCGCGTGACCCTCACCTGCCTGGCTGTCTGGGGGCTCTG
CCTGCTTTTCGCCCTCCCAGACTTCATCTTCCTGTCGGCCCACCACGACGAGCGCCTCAACGCCACCCA
CTGCCAATACAACTTCCCACAGGTGGGCCGCACGGCTCTGCGGGTGCTGCAGCTGGTGGCTGGCTTTC
TGCTGCCCCTGCTGGTCATGGCCTACTGCTATGCCCACATCCTGGCCGTGCTGCTGGTTTCCAGGGGCC
AGCGGCGCCTGCGGGCCATGCGGCTGGTGGTGGTGGTCGTGGTGGCCTTTGCCCTCTGCTGGACCCCC
TATCACCTGGTGGTGCTGGTGGACATCCTCATGGACCTGGGCGCTTTGGCCCGCAACTGTGGCCGAGA
AAGCAGGGTAGACGTGGCCAAGTCGGTCACCTCAGGCCTGGGCTACATGCACTGCTGCCTCAACCCGC
TGCTCTATGCCTTTGTAGGGGTCAAGTTCCGGGAGCGGATGTGGATGCTGCTCTTGCGCCTGGGCTGCC
CCAACCAGAGAGGGCTCCAGAGGCAGCCATCGTCTTCCCGCCGGGATTCATCCTGGTCTGAGACCTCA
GAGGCCTCCTACTCGGGCTTGTGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGG
CCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTC
ACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATG
TAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCT
GTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGGAAGCTGGGCTTG
TGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGAGGGTAGGGCCTC
CAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGCTACAGGAAGCTG
GCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 217 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTATACATCGGAGCCCTG
CCAAAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCTCCGCTCTACTCACTGGTGTTCATCTT
TGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAGGCTGAAGAGCATGACTG
ACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCCTTCTTACTGTCCCCTTCTGGGCTCACTA

TGCTGCCGCCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATGTGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGCTT
CTTCTCTGGAATCTTCTTCATCATCCTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCGTCCATGCTGTGTTT
GCTTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTT
TGCGTCTCTCCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCA
TTTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGT
CCTGCCGCTGCTTGTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTCGAAATGA
GAAGAAGAGGCACAGGGCTGTGAGGCTTATCTTCACCATCATGATTGTTTATTTTCTCTTCTGGGCTCC
CTACAACATTGTCCTTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAGCTCTAA
CAGGTTGGACCAAGCTATGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACCCCATCA
TCTATGCCTTTGTCGGGGAGAAGTTCAGAAACTACCTCTTAGTCTTCTTCCAAAAGCACATTGCCAAAC
GCTTCTGCAAATGCTGTTCTATTTTCCAGCAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACACCCGAT
CCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTTGTGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCAT
GGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGA
GAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTC
ACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCA
ATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGGAGGG
AAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGACTGA
GGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGAGTGC
TACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

SEQ ID NO: 218 – иллюстративная донорная матрица для вставки в локус *GAPDH*

GAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC
CTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGC
ATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGC
CAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGC
TACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG
GCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTG
GCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAAGGGCCCTGACAACTCTT
TACATCTTCTAGGTATGACAACGAGTTCGGATATAGCAATAGAGTGGTCGATCTGATGGCTCATATGG
CTAGCAAAGAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA
CCCTGGACCTATGCTGTCCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAGCGGTGAAGAAG
TCACCACCTTTTTTGATTATGATTACGGTGCTCCCTGTCATAAATTTGACGTGAAGCAAATTGGGGCCC
AACTCCTGCCTCCGCTCTACTCGCTGGTGTTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCGTCCTCAT
CTTAATAAACTGCAAAAAGCTGAAGTGCTTGACTGACATTTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGATCT
GCTTTTTCTTATTACTCTCCCATTGTGGGCTCACTCTGCTGCAAATGAGTGGGTCTTTGGGAATGCAAT
GTGCAAATTATTCACAGGGCTGTATCACATCGGTTATTTTGGCGGAATCTTCTTCATCATCCTCCTGAC
AATCGATAGATACCTGGCTATTGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTTTGGGGT
GGTGACAAGTGTGATCACCTGGTTGGTGGCTGTGTTTGCTTCTGTCCCAGGAATCATCTTTACTAAATG
CCAGAAAGAAGATTCTGTTTATGTCTGTGGCCCTTATTTTCCACGAGGATGGAATAATTTCCACACAAT
AATGAGGAACATTTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTCATCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTGA
AAACCCTGCTTCGGTGTCGAAACGAGAAGAAGAGGCATAGGGCAGTGAGAGTCATCTTCACCATCAT

GATTGTTTACTTTCTCTTCTGGACTCCCTATAATATTGTCATTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTC
GGCCTGAGTAACTGTGAAAGCACCAGTCAACTGGACCAAGCCACGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGA
TGACTCACTGCTGCATCAATCCCATCATCTATGCCTTCGTTGGGGAGAAGTTCAGAAGCCTTTTTCACA
TAGCTCTTGGCTGTAGGATTGCCCCACTCCAAAAACCAGTGTGTGGAGGTCCAGGAGTGAGACCAGGA
AAGAATGTGAAAGTGACTACACAAGGACTCCTCGATGGTCGTGGAAAAGGAAAGTCAATTGGCAGAG
CCCCTGAAGCCAGTCTTCAGGACAAAGAAGGAGCCTAGATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACC
TCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGG
AAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCT
CCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACC
ATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCAGTTACTTGTCCTGTCTTATTCTAGGGTCTGGGGCAGAGGGG
AGGGAAGCTGGGCTTGTGTCAAGGTGAGACATTCTTGCTGGGGAGGGACCTGGTATGTTCTCCTCAGA
CTGAGGGTAGGGCCTCCAAACAGCCTTGCTTGCTTCGAGAACCATTTGCTTCCCGCTCAGACGTCTTGA
GTGCTACAGGAAGCTGGCACCACTACTTCAGAGAACAAGGCCTTTTCCTCTCCTCGCTCCAGT

Нуклеаза

[0659] Любая нуклеаза, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, может применяться в способах по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой ДНК-нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза вызывает однонитевой разрыв (SSB) внутри эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, например, в системе "праймированного редактирования". В некоторых вариантах осуществления нуклеаза вызывает двухнитевой разрыв (DSB) внутри эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления двухнитевой разрыв вызывает одна нуклеаза. В некоторых вариантах осуществления двухнитевой разрыв вызывают две нуклеазы, каждая из которых вызывает однонитевой разрыв в противоположных нитях, например, в системе с двумя "никазами". В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с одной или несколькими направляющими молекулами для нуклеазы CRISPR/Cas. Иллюстративные нуклеазы CRISPR/Cas и направляющие молекулы описаны в данном документе более подробно. Следует понимать, что нуклеаза (включая никазу) никоим образом не ограничена и может также представлять собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), мегануклеазу или другую нуклеазу, известную из уровня техники (или их комбинацию). Способы разработки нуклеаз с "цинковыми пальцами" (ZFN) хорошо известны из уровня техники, например, см. Urnov et al., Nature Reviews Genetics 2010; 11:636-640 и Paschon et al., Nat. Commun. 2019; 10(1):1133 и цитируемые в них литературные источники. Способы разработки эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), хорошо известны из уровня техники, например, см. Joung and Sander, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013; 14(1):49-55 и цитируемые в них литературные источники. Способы разработки мегануклеаз также хорошо известны из уровня техники, например, см. Silva et al., Curr. Gene Ther. 2011; 11(1):11-27 и Redel and Prather, Toxicol. Pathol. 2016; 44(3):428-433.

[0660] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 50%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов,

описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 55%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 60%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 65%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 70%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 75%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 85%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 96%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 97%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 98%. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, подходящая для способов, описанных в данном документе, может характеризоваться эффективностью редактирования, превышающей приблизительно 99%.

[0661] Как правило, нуклеаза может быть доставлена в клетку в виде белка или нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, например, молекулы ДНК или молекулы мРНК. Белок или нуклеиновая кислота могут быть объединены с другими средствами доставки, например, липидами или полимерами в липидных или полимерных наночастицах, и нацеливающими средствами, такими как антитела или другие связывающие средства, обладающие специфичностью в отношении клетки. Молекула ДНК может представлять собой вектор на основе нуклеиновой кислоты, такой как вирусный геном или кольцевая двухнитевая ДНК, например, плазмида. Векторы на основе нуклеиновых кислот, кодирующие нуклеазу, могут содержать другие кодирующие или некодирующие элементы. Например, нуклеаза может быть доставленав качестве части вирусного генома (например, в геноме AAV, аденовируса или лентивируса), который содержит определенные элементы остова генома (например, инвертированные концевые повторы в случае генома AAV).

[0662] Нуклеаза CRISPR/Cas может быть доставлена в клетку в виде белка или нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, например, молекулы ДНК или молекулы мРНК. Направляющая молекула может быть доставлена в виде молекулы РНК или может кодироваться молекулой ДНК. Нуклеаза

CRISPR/Cas также может быть доставлена с направляющей молекулой в виде рибонуклеопротеина (RNP) и введена в клетку посредством нуклеофекции (электропорации).

Нуклеазы CRISPR/Cas

[0663] Нуклеазы CRISPR/Cas по настоящему изобретению включают без ограничения встречающиеся в природе нуклеазы CRISPR класса 2, такие как Cas9 и Cpf1 (Cas12a), а также другие нуклеазы Cas12 и нуклеазы, происходящие или полученные из них. С функциональной точки зрения нуклеазы CRISPR/Cas определяются как те нуклеазы, которые: (a) взаимодействуют с gRNA (например, образуют комплекс с ней) и (b) вместе с gRNA связываются с областью-мишенью ДНК, которая содержит (i) последовательность, комплементарную нацеливающему домену gRNA, и необязательно (ii) дополнительную последовательность, называемую "мотивом, прилегающим к протоспейсеру" или "PAM", который более подробно описан ниже, и необязательно расщепляют или модифицируют ее. Как будет проиллюстрировано в следующих примерах, нуклеазы CRISPR/Cas могут быть определены в общих чертах по их специфичности в отношении PAM и активности расщепления, даже несмотря на то, что могут существовать различия между отдельными нуклеазами CRISPR/Cas, которые обладают одинаковой специфичностью в отношении PAM или активностью расщепления. Специалисты в данной области поймут, что некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к системам и способам, которые могут быть реализованы с использованием любой подходящей нуклеазы CRISPR/Cas, характеризующейся определенной специфичностью в отношении PAM и/или активностью расщепления. По этой причине, если не указано иное, термин "нуклеаза CRISPR/Cas" следует понимать как общий термин, не ограниченный каким-либо конкретным типом (например, Cas9 в сравнении с Cpf1), видом (например, *S. pyogenes* в сравнении с *S. aureus*) или вариантом (например, полноразмерная в сравнении с усеченной или расщепленной; встречающаяся в природе специфичность в отношении PAM в сравнении со сконструированной специфичностью в отношении PAM и т. д.) нуклеазы CRISPR/Cas.

[0664] Последовательность PAM получила свое название от ее последовательного взаимного расположения с последовательностью "протоспейсера", которая комплементарна нацеливающим доменам gRNA (или "спейсерам"). Вместе с последовательностями протоспейсеров последовательности PAM определяют области-мишени или последовательности-мишени для конкретных комбинаций нуклеаз CRISPR/Cas и gRNA.

[0665] Для различных нуклеазы CRISPR/Cas могут требоваться различные последовательные взаимные расположения между PAM и протоспейсерами. Как правило, Cas9 распознают последовательности PAM, расположенные с 3'-стороны от протоспейсера. Cpf1 (Cas12a), в свою очередь, обычно распознает последовательности PAM, которые расположены с 5'-стороны от протоспейсера.

[0666] Помимо распознавания конкретных последовательных ориентаций PAM и протоспейсеров, нуклеазы CRISPR/Cas могут также распознавать конкретные последовательности PAM. Cas9 *S. aureus*, например, распознает последовательность PAM NNGRRT или NNGRRV, где остатки N расположены непосредственно с 3'-стороны от области, распознаваемой нацеливающим доменом gRNA. Cas9 *S. pyogenes* распознает последовательности PAM NGG. Cpf1 *F. novicida* распознает последовательность PAM TTH. Последовательности PAM были идентифицированы для множества нуклеаз CRISPR/Cas, и стратегия идентификации новых последовательностей PAM была описана в Shmakov et al., Molecular Cell 2015; 60:385-397. Следует также отметить, что сконструированные нуклеазы CRISPR/Cas могут характеризоваться специфичностью в отношении PAM, которая отличается от специфичности в отношении PAM эталонных

молекул (например, в случае сконструированной нуклеазы CRISPR/Cas, эталонная молекула может представлять собой встречающийся в природе вариант, из которого происходит нуклеаза CRISPR/Cas, или встречающийся в природе вариант, характеризующийся наибольшей гомологией аминокислотной последовательности со сконструированной нуклеазой CRISPR/Cas).

[0667] В дополнение к своей специфичности в отношении PAM, нуклеазы CRISPR/Cas можно охарактеризовать по их активности расщепления ДНК: встречающиеся в природе нуклеазы CRISPR/Cas обычно образуют двухнитевые разрывы (DSB) в нуклеиновых кислотах-мишенях, но были получены сконструированные варианты, называемые "никазами", которые образуют только однонитевые разрывы (SSB), например, обсуждаемые в Ran et al., Cell 2013; 154(6):1380-1389 ("Ran"), или которые вообще не производят разрезы.

Cas9

[0668] Были определены кристаллические структуры Cas9 *S. pyogenes* (Jinek et al., Science 2014; 343(6176):1247997 ("Jinek 2014") и Cas9 *S. aureus* в комплексе с мономолекулярной направляющей РНК и ДНК-мишенью. См. Nishimasu et al., Cell 1024; 156:935-949 ("Nishimasu 2014"); Nishimasu et al., Cell 2015; 162:1113-1126 ("Nishimasu 2015"); и Anders et al., Nature 2014; 513(7519):569-73 ("Anders 2014").

[0669] Встречающийся в природе белок Cas9 содержит две доли: распознающую долю (REC) и нуклеазную долю (NUC); каждая из которых содержит определенные структурные и/или функциональные домены. Доля REC содержит домен богатой аргинином мостиковой спирали (BH), и представлен по меньшей мере один домен REC (например, домен REC1 и необязательно домен REC2). Доля REC не имеет структурного сходства с другими известными белками, что указывает на то, что это уникальный функциональный домен. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, мутационный анализ позволяет предположить определенные функциональные роли доменов BH и REC: домен BH, по-видимому, играет роль в распознавании gRNA:ДНК, тогда как домен REC, как полагают, взаимодействует с дуплексом повтор:антиповтор в gRNA и опосредует образование комплекса Cas9/gRNA.

[0670] Доля NUC содержит домен RuvC, домен HNH и домен, взаимодействующий с PAM (PI). Домен RuvC обладает структурным сходством с представителями суперсемейства ретровирусных интеграз и расщепляет некомплементарную (т. е. нижнюю) нить нуклеиновой кислоты-мишени. Он может быть образован из двух или более расщепленных мотивов RuvC (таких как RuvC I, RuvCII и RuvCIII в *S. pyogenes* и *S. aureus*). Вместе с тем домен HNH структурно сходен с эндонуклеазными мотивами HNN и расщепляет комплементарную (т. е. верхнюю) нить нуклеиновой кислоты-мишени. Домен PI, как позволяет предположить его название, вносит свой вклад в специфичность в отношении PAM.

[0671] Хотя определенные функции Cas9 связаны с конкретными доменами, представленными выше (но не обязательно полностью определяются ими), эти и другие функции могут быть опосредованы другими доменами Cas9 или несколькими доменами в каждой доле или находиться под их влиянием. Например, в Cas9 *S. pyogenes*, как описано в Nishimasu 2014, дуплекс повтор:антиповтор в gRNA попадает в борозду между долями REC и NUC, и нуклеотиды в дуплексе взаимодействуют с аминокислотами в доменах BH, PI, и REC. Некоторые нуклеотиды в первой структуре типа "стебель-петля" также взаимодействуют с аминокислотами в нескольких доменах (PI, BH и REC1), как и некоторые нуклеотиды во второй и третьей структурах типа "стебель-петля" (домены RuvC и PI).

Cpf1

[0672] Кристаллическая структура Cpf1 *Acidaminococcus sp.* в комплексе с crRNA и dsDNA-мишенью, содержащей последовательность PAM TTTN, была расшифрована в Yamano et al., Cell. 2016; 165(4):949–962 ("Yamano"). Cpf1, как и Cas9, имеет две доли: долю REC (распознающую) и долю NUC (нуклеазную). Доля REC содержит домены REC1 и REC2, которые не имеют сходства с какими-либо известными белковыми структурами. Вместе с тем доля NUC содержит три домена RuvC (RuvC-I, -II и -III) и домен BH. Однако, в отличие от Cas9, доля REC Cpf1 не имеет домена HNH и содержит другие домены, которые также не имеют сходства с известными белковыми структурами: структурно уникальный домен PI, три клиновидных домена (WED) (WED-I, -II и - III) и нуклеазный (Nuc) домен.

[0673] Хотя Cas9 и Cpf1 имеют сходство по структуре и функциям, следует понимать, что определенные виды активности Cpf1 опосредуются структурными доменами, которые не являются аналогичными каким-либо доменам Cas9. Например, расщепление комплементарной нити ДНК-мишени, по-видимому, опосредуется доменом Nuc, который по последовательности и пространственной структуре отличается от домена HNH Cas9. Кроме того, ненацеливающая часть gRNA Cpf1 ("рукоятка") принимает структуру псевдоузла, а не структуру типа "стебель-петля", образуемую дуплексом повтор:антиповтор в gRNA Cas9.

Варианты нуклеаз

[0674] Нуклеазы CRISPR/Cas, описанные в данном документе, обладают видами активности и свойствами, которые могут быть полезными в различных путях применения, но специалист в данной области поймет, что нуклеазы CRISPR/Cas также могут быть модифицированы в определенных случаях для изменения активности расщепления, специфичности в отношении PAM или других структурных или функциональных признаков.

[0675] При обращении сначала к модификациям, которые изменяют активность расщепления, выше были описаны мутации, которые приводят к снижению или устранению активности доменов в доле NUC. Иллюстративные мутации, которые могут быть произведены в доменах RuvC, в домене HNH Cas9 или в домене Nuc Cpf1, описаны в публикациях Ran, Yamano и публикации согласно PCT № WO 2016/073990A1, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. Как правило, мутации, которые приводят к снижению или устранению активности в одном из двух нуклеазных доменов, приводят к получению нуклеаз CRISPR/Cas с никазной активностью, но следует отметить, что тип никазной активности варьируется в зависимости от того, какой домен инактивирован. В качестве одного примера, инактивация домена RuvC или домена HNH Cas9 приводит к получению никазы. Иллюстративные варианты никаз включают Cas9 D10A и Cas9 H840A (схема нумерации в соответствии с последовательностью SpCas9 дикого типа). Дополнительные подходящие варианты никаз, в том числе варианты Cas12a, будут очевидны специалисту в данной области на основании настоящего раскрытия и знаний из уровня техники. Настоящее изобретение не ограничено в этом отношении. В некоторых вариантах осуществления никаза может быть слита с обратной транскриптазой с получением средства праймированного редактирования (PE), например, как описано в Anzalone et al., Nature 2019; 576:149-157, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0676] Модификации специфичности в отношении PAM по сравнению со встречающимися в природе эталонными молекулами Cas9 были описаны как для *S. pyogenes* (Kleinstiver et al., Nature 2015; 523(7561):481-5); так и для *S. aureus* (Kleinstiver et al., Nat Biotechnol. 2015; 33(12):1293-1298). Также были

описаны модификации, улучшающие точность нацеливания Cas9 (Kleinstiver et al., Nature 2016; 529:490-495). Каждый из этих литературных источников включен в данный документ посредством ссылки.

[0677] Нуклеазы CRISPR/Cas были также расщеплены на две или более частей, как описано в Zetsche et al., Nat Biotechnol. 2015; 33(2):139-42, включенной посредством ссылки, и в Fine et al., Sci Rep. 2015; 5:10777, включенной посредством ссылки.

[0678] Нуклеазы CRISPR/Cas могут быть в определенных вариантах осуществления оптимизированными по размеру или усеченными, например, посредством одной или нескольких делеций, которые приводят к уменьшению размера нуклеазы с сохранением при этом по-прежнему активности связывания с gRNA, активности распознавания PAM и мишени и активности расщепления. В определенных вариантах осуществления РНК-направляемые нуклеазы связаны ковалентно или нековалентно с другим полипептидом, нуклеотидом или другой структурой, необязательно посредством линкера. Иллюстративные связанные нуклеазы и линкеры описаны в Guilinger et al., Nature Biotech. 2014; 32:577-582, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0679] Нуклеазы CRISPR/Cas также необязательно содержат метку, такую как, без ограничения, сигнал ядерной локализации, для облегчения перемещения белка нуклеазы CRISPR/Cas в ядро. В определенных вариантах осуществления нуклеаза CRISPR/Cas может содержать C- и/или N-концевые сигналы ядерной локализации. Последовательности ядерной локализации известны из уровня техники.

[0680] Вышеприведенный перечень модификаций предполагается как иллюстративный по своей природе, и специалист в данной области поймет с учетом настоящего раскрытия, что другие модификации могут быть возможными или желаемыми в определенных путях применения. Поэтому для краткости иллюстративные системы, способы и композиции по настоящему изобретению представлены со ссылкой на конкретные нуклеазы CRISPR/Cas, но следует понимать, что применяемые нуклеазы CRISPR/Cas могут быть модифицированы таким образом, что их принципы функционирования не изменяются. Такие модификации находятся в пределах объема настоящего изобретения.

[0681] Иллюстративные подходящие варианты нуклеаз включают без ограничения варианты AsCpf1 (AsCas12a), содержащие замену M537R, замену H800A и/или замену F870L или любую их комбинацию (схема нумерации в соответствии с последовательностью AsCpf1 дикого типа). В некоторых вариантах осуществления вариант нуклеазы представляет собой вариант Cas12a, например, вариант Cas12a, содержащий 1, 2 или 3 аминокислотные замены, выбранные из M537R, F870L и H800A. В некоторых вариантах осуществления вариант Cas12a содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90%, 95% или 100% идентичностью с последовательностью AsCpf1, описанной в данном документе.

[0682] Другие подходящие модификации аминокислотной последовательности AsCpf1 известны средним специалистам в данной области. Некоторые иллюстративные последовательности AsCpf1 дикого типа и вариантов AsCpf1 представлены ниже.

SEQ ID NO: 58 - аминокислотная последовательность His-AsCpf1-sNLS-sNLS H800A

MGHHHHHHGSTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYAD
QCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKA
ELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIF
TRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNL
AIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSI

DLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSE
AFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKL
EMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGR
YKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNN
PEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLL
YHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFY
RPKSRMKRMAARLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIK
DRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTI
QQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRT
GIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDP
LTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQ
FDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIR
SVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKL
QNGISNQDWLAYIQELRNGSPKKKRKVGSPKKKRKV

SEQ ID NO: 59 - аминокислотная последовательность варианта 1 Cpf1

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEK
TSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTA
YAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEI
MDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAH
RLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFH
VPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDN
REKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFE
KMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWK
TIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAG
KRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

SEQ ID NO: 60 - аминокислотная последовательность варианта 2 Cpf1

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA

HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTE
KTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQT
AYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEK
EIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMA
HRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFF
HVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLD
NREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQF
EKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVW
KTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIA
GKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSN
AATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDW
LAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

SEQ ID NO: 61 - аминокислотная последовательность варианта 3 Cpf1

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEK
TSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTA
YAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEI
MDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAA
RLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFH
VPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDN
REKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFE
KMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWK
TIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAG
KRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

SEQ ID NO: 62 - аминокислотная последовательность варианта 4 Cpf1

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL

REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEK
TSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTA
YAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEI
MDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAA
RLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFH
VPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDN
REKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFE
KMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWK
TIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAG
KRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKV

SEQ ID NO: 63 - аминокислотная последовательность варианта 5 Cpf1

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEK
TSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTA
YAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEI
MDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAH
RLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFH
VPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDN
REKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFE
KMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWK
TIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAG
KRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKV

SEQ ID NO: 64 - аминокислотная последовательность варианта 6 Cpf1

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK

QLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEK
TSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTA
YAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEI
MDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAH
RLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFH
VPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDN
REKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFE
KMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWK
TIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAG
KRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

SEQ ID NO: 65 - аминокислотная последовательность варианта 7 Cpf1

MGRDPGKPIPNPLLGLDSTAPKKKRKVGIHGVPAATQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEE
DKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFI
GRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSA
EDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLY
NQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFC
KYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKE
KVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHL
LDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEK
NNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQ
THTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSI
DLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLY
WTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRL
SHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGID
RGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIV
DLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFT
SFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNR
NLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFR
DGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADA
NGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNPKKKRKVKLAAALEHHHHHH

SEQ ID NO: 66 - иллюстративная аминокислотная последовательность AsCpf1 дикого типа

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTE
KTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQT
AYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEK
EIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMA
HRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFF
HVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLD
NREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQF
EKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVW
KTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIA
GKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSN
AATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDW
LAYIQELRN

[0683] Дополнительные подходящие нуклеазы и варианты нуклеаз будут очевидны специалисту в данной области на основании настоящего раскрытия с учетом знаний из уровня техники. Иллюстративные подходящие нуклеазы могут включать без ограничения нуклеазы, представленные в таблице 5.

Таблица 5. Иллюстративные подходящие нуклеазы CRISPR/Cas

Нуклеаза	**Длина (а. к.)**	**PAM**	**Литературный источник**
SpCas9	1368	NGG	Cong et al., Science 2013; 339(6121):819-23
SaCas9	1053	NNGRRT	Ran et al., Nature 2015; 520(7546):186-91.
(KKH) SaCas9	1067	NNNRRT	Kleinstiver et al., Nat Biotechnol. 2015; 33(12):1293-1298
AsCpf1 (AsCas12a)	1353	TTTV	Zetsche et al., Nat Biotechnol. 2017; 35(1):31-34.
LbCpf1 (LbCas12a)	1274	TTTV	Zetsche et al., Cell 2015; 163(3):759-71.
CasX	980	TTC	Burstein et al., Nature 2017; 542(7640):237-241.
CasY	1200	TA	Burstein et al., Nature 2017; 542(7640):237-241.
Cas12h1	870	RTR	Yan et al., Science 2019; 363(6422):88-91.
Cas12i1	1093	TTN	Yan et al., Science 2019; 363(6422):88-91.
Cas12c1	неизвестно	TG	Yan et al., Science 2019; 363(6422):88-91.

Нуклеаза	**Длина (а. к.)**	**PAM**	**Литературный источник**
Cas12c2	неизвестно	TN	Yan et al., Science 2019; 363(6422):88-91.
eSpCas9	1423	NGG	Chen et al., Nature 2017; 550(7676):407-410.
Cas9-HF1	1367	NGG	Chen et al., Nature 2017; 550(7676):407-410.
HypaCas9	1404	NGG	Chen et al., Nature 2017; 550(7676):407-410.
dCas9-FokI	1623	NGG	Патент США № 9322037
Sniper-Cas9	1389	NGG	Lee et al., Nat Commun. 2018; 9(1):3048.
xCas9	1786	NGG, NG, GAA, GAT	Hu et al., Nature. 2018 Apr 5;556(7699):57-63.
AaCas12b	1129	TTN	Teng et al., Cell Discov. 2018; 4:63.
evoCas9	1423	NGG	Casini et al., Nat Biotechnol. 2018; 36(3):265-271.
SpCas9-NG	1423	NG	Nishimasu et al., Science 2018; 361(6408):1259-1262.
VRQR	1368	NGA	Li et al., The CRISPR Journal, 2018; 01:01
VRER	1372	NGCG	Kleinstiver et al., Nature 2016; 529(7587):490-5.
NmeCas9	1082	NNNNGATT	Amrani et al., Genome Biol. 2018; 19(1):214.
CjCas9	984	NNNNRYAC	Kim et al., Nat Commun. 2017; 8:14500.
BhCas12b	1108	ATTN	Strecker et al., Nat Commun. 2019; 10(1):212.
BhCas12b V4	1108	ATTN	Pausch *et al.,* Science 2020;369(6501):333-337.

Молекулы направляющей РНК (gRNA)

[0684] Направляющие РНК (gRNA) по настоящему изобретению могут быть мономолекулярными (содержащими одну молекулу РНК и в качестве альтернативы называемыми химерными) или модульными (содержащими более одной отдельной молекулы РНК и обычно две таковые, как, например, crRNA и tracrRNA, которые обычно связаны друг с другом, например, посредством образования дуплекса). gRNA и их составные части описаны в литературе, например, в Briner et al., Molecular Cell 2014; 56(2):333-339 ("Briner") и в публикации согласно PCT № WO2016/073990A1.

[0685] У бактерий и архей системы CRISPR типа II обычно содержат белок нуклеазу CRISPR/Cas, такой как Cas9, РНК CRISPR (crRNA), которая содержит 5'-область, комплементарную чужеродной последовательности, и транс-активирующую crRNA (tracrRNA), которая содержит 5'-область, комплементарную 3'-области crRNA и образующую дуплекс с ней. Не предполагая ограничения какой-либо теорией, полагают, что данный дуплекс облегчает образование комплекса Cas9/gRNA и необходим для его активности. Поскольку системы CRISPR типа II были адаптированы для применения при редактировании генов, было обнаружено, что crRNA и tracrRNA могут быть объединены в единую мономолекулярную или химерную направляющую РНК в одном неограничивающем примере с помощью последовательности "тетрапетли" или "линкера" из четырех нуклеотидов (например, GAAA), образующей мостик между

комплементарными областями crRNA (на ее 3'-конце) и tracrRNA (на ее 5'-конце). См. Mali et al., Science 2013; 339(6121):823–826 ("Mali"); Jiang et al., Nat Biotechnol. 2013; 31(3):233–239 ("Jiang"); и Jinek et al., Science 2012; 337(6096):816-821 ("Jinek 2012").

[0686] Направляющие РНК, мономолекулярные либо модульные, содержат "нацеливающий домен", который полностью или частично комплементарен домену-мишени в последовательности-мишени, такой как последовательность ДНК в геноме клетки, редактирование которого желательно. Нацеливающие домены упоминаются в литературе под разными названиями, в том числе без ограничения как "направляющие последовательности" (Hsu et al., Nat Biotechnol. 2013; 31(9):827–832, ("Hsu")), "области комплементарности" (публикация согласно PCT № WO2016/073990A1), "спейсеры" (Briner) и в общем случае "crRNA" (Jiang). Независимо от полученных ими названий нацеливающие домены обычно имеют длину 10-30 нуклеотидов, а в определенных вариантах осуществления имеют длину 16-24 нуклеотида (например, имеют длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида), а также находятся на 5'-конце или вблизи него в случае gRNA Cas9 и на 3'-конце или вблизи него в случае gRNA Cpf1.

[0687] В дополнение к нацеливающим доменам gRNA, как правило (но не обязательно, как обсуждается ниже), содержат множество доменов, которые могут влиять на образование или активность комплексов gRNA/Cas9. Например, как упоминалось выше, дуплексная структура, образованная первым и вторым доменами комплементарности gRNA (также называемая дуплексом повтор:антиповтор), взаимодействует с распознающей долей (REC) Cas9 и может опосредовать образование комплексов Cas9/gRNA. См. Nishimasu 2014 и 2015. Следует отметить, что первый и/или второй домены комплементарности могут содержать один или несколько поли(A)-трактов, которые могут распознаваться РНК-полимеразами как сигнал терминации. Последовательность первого и второго доменов комплементарности, таким образом, необязательно модифицируется для устранения этих трактов и обеспечения полной транскрипции gRNA in vitro, например, посредством использования замен A-G, как описано в Briner, или замен A-U. Эти и другие аналогичные модификации первого и второго доменов комплементарности находятся в пределах объема настоящего изобретения.

[0688] Наряду с первым и вторым доменами комплементарности gRNA Cas9 обычно содержат две или более дополнительные дуплексные области, которые участвуют в нуклеазной активности in vivo, но не обязательно in vitro. См. Nishimasu 2015. Первую структуру типа "стебель-петля" вблизи 3'-части второго домена комплементарности называют "проксимальным доменом" (публикация согласно PCT № WO2016/073990A1) "структурой 1 типа стебель-петля" (Nishimasu 2014 и 2015) и "нексусом" (Briner). Одна или несколько дополнительных структур типа "стебель-петля" обычно присутствуют вблизи 3'-конца gRNA, причем их количество варьируется в зависимости от вида: gRNA *S. pyogenes* обычно содержат две 3'-структуры типа "стебель-петля" (в общей сложности четыре структуры типа "стебель-петля", включая дуплекс повтор:антиповтор), тогда как *S. aureus* и другие виды имеют только такую одну структуру (в общей сложности три структуры типа "стебель-петля"). Описание консервативных структур типа "стебель-петля" (и в более общем смысле структур gRNA), подготовленное по видам, представлено в Briner.

[0689] Хотя в вышеприведенном описании внимание было сосредоточено на gRNA для применения с Cas9, следует понимать, что были (или могут быть в будущем) обнаружены или изобретены другие нуклеазы CRISPR/Cas, которые используют gRNA, в некоторой степени отличающиеся от тех, что были описаны до сих пор. Например, Cpf1 ("CRISPR из Prevotella и Franciscella 1"), также называемая Cas12a, представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, для функционирования которой не требуется tracrRNA

(см. Zetsche et al., Cell 2015; 163:759–771 ("Zetsche I")). gRNA для применения в системе редактирования генома Cpf1 обычно содержит нацеливающий домен и домен комплементарности (в качестве альтернативы называемый "рукояткой"). Следует также отметить, что в gRNA для применения с Cpf1 нацеливающий домен обычно находится на 3'-конце или вблизи него, а не на 5'-конце, как описано выше применительно к gRNA Cas9 (рукоятка находится на 5'-конце или вблизи него в случае gRNA Cpf1).

[0690] Однако специалистам в данной области будет понятно, что хотя могут существовать структурные различия между gRNA из разных видов прокариот или между gRNA Cpf1 и Cas9, принципы, по которым функционируют gRNA, в целом являются единообразными. Вследствие такого единообразия функционирования gRNA могут быть определены в общих чертах по их последовательностям нацеливающих доменов, и специалистам в данной области будет понятно, что данная последовательность нацеливающего домена может быть включена в любую подходящую gRNA, включая мономолекулярную или химерную gRNA, или gRNA, которая содержит одну или несколько химических модификаций и/или модификаций последовательности (замены, дополнительные нуклеотиды, усечения и т. д.). Таким образом, для экономии представления в настоящем раскрытии gRNA могут быть описаны исключительно в категориях, касающихся их последовательностей нацеливающих доменов.

[0691] В более общем смысле специалистам в данной области будет понятно, что некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к системам, способам и композициям, которые могут быть реализованы с применением нескольких нуклеаз CRISPR/Cas. По этой причине, если не указано иное, термин gRNA следует понимать как охватывающий любую подходящую gRNA, которая может применяться с любой нуклеазой CRISPR/Cas, а не только с теми gRNA, которые совместимы с конкретными видами Cas9 или Cpf1. В качестве иллюстрации термин gRNA в определенных вариантах осуществления может включать gRNA для применения с любой нуклеазой CRISPR/Cas, встречающейся в системе CRISPR класса 2, такой как система CRISPR типа II или типа V, или с нуклеазой CRISPR/Cas, полученной или адаптированной из такой системы.

[0692] В некоторых вариантах осуществления в способе или системе по настоящему изобретению может применяться более одной gRNA. В некоторых вариантах осуществления можно применять две или более gRNA для создания двух или более двухнитевых разрывов в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления может применяться стратегия мультиплексного редактирования, нацеленная на два или более существенных гена одновременно с двумя или более нокин-кассетами. В некоторых таких вариантах осуществления две или более нокин-кассеты могут содержать разные экзогенные последовательности грузов, например, разные нокин-кассеты могут кодировать разные представляющие интерес продукты генов, и, таким образом, подвергнутые редактированию клетки будут экспрессировать множество представляющих интерес продуктов генов из разных нокин-кассет, нацеленных на разные локусы.

[0693] В некоторых вариантах осуществления, в которых применяется более одной gRNA, двухнитевой разрыв может быть обусловлен применением парной "никазной" стратегии с двумя gRNA. В некоторых вариантах осуществления для отбора gRNA, в том числе для определения того, какие gRNA можно применять в парной "никазной" стратегии с двумя gRNA, пары gRNA должны быть ориентированы в отношении ДНК таким образом, чтобы PAM были обращены наружу, и разрезание никазой Cas9 D10A приводило бы к образованию 5'-выступов.

[0694] В некоторых вариантах осуществления в способе или системе по настоящему изобретению может применяться gRNA для праймированного редактирования (pegRNA) в сочетании со средством

праймированного редактирования (PE). Как хорошо известно из уровня техники, pegRNA является значительно более крупной, чем стандартные gRNA, например, в некоторых вариантах осуществления ее длина составляет более 50, 100, 150 или 250 нуклеотидов, например, как описано в Anzalone et al., Nature 2019; 576:149-157, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. pegRNA представляет собой gRNA с последовательностью связывания праймера (PBS) и донорной матрицей, содержащей желаемую последовательность РНК, добавленную к одному из концов, например, к 3'-концу. Комплекс PE:pegRNA связывается с ДНК-мишенью, а никазный домен средства праймированного редактирования вносит однонитевой разрыв только в одной нити, образуя лоскут. PBS, расположенная на pegRNA, связывается с лоскутом ДНК, и отредактированная последовательность РНК подвергается обратной транскрипции с использованием домена обратной транскриптазы средства праймированного редактирования. Отредактированная нить включается в состав ДНК на конце лоскута после однонитевого разрыва, и происходит репарация ДНК-мишени с помощью новой ДНК, полученной в результате обратной транскрипции. Исходный сегмент ДНК удаляется под действием клеточной эндонуклеазы. В результате этого одна нить остается отредактированной, и одна нить остается неотредактированной. В новейших системах PE, например, PE3 и PE3b, неотредактированная нить может быть скорректирована для соответствия свежеотредактированной нити с применением дополнительной стандартной gRNA. В этом случае неотредактированная нить подвергается однонитевому разрыву никазой, а свежеотредактированная нить используется в качестве матрицы для репарации однонитевого разрыва, что таким образом завершает редактирование.

Разработка gRNA

[0695] Способы отбора и валидации последовательностей-мишеней, а также анализы нецелевой активности были описаны ранее, например в Mali; Hsu; Fu et al., Nat Biotechnol 2014; 32(3):279-84, Heigwer et al., Nat methods 2014; 11(2):122-3; Bae et al., Bioinformatics 2014; 30(10):1473-5; и Xiao et al. Bioinformatics 2014; 30(8):1180-1182. В качестве неограничивающего примера разработка gRNA может предусматривать использование инструментального программного обеспечения для оптимизации выбора потенциальных последовательностей-мишеней, соответствующих последовательности-мишени пользователя, например, для минимизации общей нецелевой активности по всему геному. Хотя нецелевая активность не ограничивается расщеплением, эффективность расщепления для каждой нецелевой последовательности может быть предсказана, например, с помощью экспериментально полученной схемы взвешивания. Эти и другие способы отбора направляющих молекул подробно описаны в публикации согласно PCT № WO2016/073990A1.

[0696] Например, способы отбора и валидации последовательностей-мишеней, а также анализы нецелевой активности могут быть выполнены с использованием Cas-OFFinder (Bae et al., Bioinformatics 2014; 30:1473–5). Cas-OFFinder представляет собой инструмент, который может быстро идентифицировать все последовательности в геноме, которые содержат несовпадения с направляющей последовательностью в количестве вплоть до заданного.

[0697] В качестве другого примера могут быть выполнены способы оценивания в баллах вероятности того, что данная последовательность является нецелевой (например, после идентификации кандидатных последовательностей-мишеней). Иллюстративный балл включает балл определения частоты разрезов (CFD), как описано в Doench et al., Nat Biotechnol. 2016; 34:184–91.

Модификации gRNA

[0698] В определенных вариантах осуществления gRNA, как используется в данном документе, могут представлять собой модифицированные или немодифицированные gRNA. В определенных вариантах осуществления gRNA может содержать одну или несколько модификаций. В определенных вариантах осуществления одна или несколько модификаций могут включать модификацию в виде фосфотиоатной связи, модификацию в виде фосфодитиоатной (PS2) связи, 2'-O-метильную модификацию или их комбинации. В определенных вариантах осуществления одна или несколько модификаций могут находиться на 5'-конце gRNA, на 3'-конце gRNA или в их комбинации.

[0699] В определенных вариантах осуществления модификация gRNA может включать в себя одну или несколько модификаций в виде фосфодитиоатной (PS2) связи.

[0700] В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, содержит один или несколько отрезков из оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), также называемых в данном документе "ДНК-удлинениями". В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, содержит ДНК-удлинение на 5'-конце gRNA, 3'-конце gRNA или в их комбинации. В определенных вариантах осуществления ДНК-удлинение может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 оснований ДНК. Например, в определенных вариантах осуществления ДНК-удлинение может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 оснований ДНК. В определенных вариантах осуществления ДНК-удлинение может содержать одно или несколько оснований ДНК, выбранных из аденина (A), гуанина (G), цитозина (C) или тимина (T). В определенных вариантах осуществления ДНК-удлинение содержит одинаковые основания ДНК. Например, ДНК-удлинение может содержать отрезок из оснований аденина (A). В определенных вариантах осуществления ДНК-удлинение может содержать отрезок из оснований тимина (T). В определенных вариантах осуществления ДНК-удлинение содержит комбинацию различных оснований ДНК.

[0701] Иллюстративные подходящие 5'-удлинения для направляющих РНК Cpf1 представлены в таблице 6 ниже.

Таблица 6. Иллюстративные 5'-удлинения gRNA Cpf1

SEQ ID NO:	**Последовательность 5'-удлинения**	**5'-модификация**
N/A	rCrUrUrUrU	+ 5 РНК
67	rArArGrArCrCrUrUrUrU	+ 10 РНК
68	rArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+ 25 РНК
69	rArGrGrCrCrArGrCrUrUrGrCrCrGrGrUrUrUrUrUrUrArGrUrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+ 60 РНК
N/A	CTTTT	+ 5 ДНК
70	AAGACCTTTT	+ 10 ДНК
71	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+ 25 ДНК

SEQ ID NO:	Последовательность 5'-удлинения	5'-модификация
72	AGGCCAGCTTGCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+ 60 ДНК
73	TTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+ 20 ДНК
74	GCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+ 30 ДНК
75	GCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+ 50 ДНК
76	TAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+ 40 ДНК
77	C*C*GAAGTTTTCTTCGGTTTT	+ 20 ДНК + 2 x PS
78	T*T*TTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+ 25 ДНК + 2 x PS
79	A*A*CGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+ 30 ДНК + 2 x PS
80	G*C*GTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+ 41 ДНК + 2 x PS
81	G*G*CTTCTTTTGAAGCCTTTTTGCGTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+ 62 ДНК + 2 x PS
82	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+ 25 ДНК + 2 x PS
83	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	+ 25 A
84	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	+ 25 T
85	mA*mU*rGrUrGrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+ 25 РНК + 2 x PS
86	mA*mA*rArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArA	Поли(A) РНК + 2 x PS
87	mU*mU*rUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrU	Поли(U) РНК+ 2 x PS

[0702] В определенных вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, содержит ДНК-удлинение, а также химическую модификацию, например, одну или несколько модификаций в виде фосфотиоатной связи, одну или несколько модификаций в виде фосфодитиоатной (PS2) связи, одну или несколько 2'-O-метильных модификаций или одну или несколько дополнительных подходящих химических модификаций gRNA, раскрытых в данном документе, или их комбинации. В определенных вариантах осуществления одна или несколько модификаций могут находиться на 5'-конце gRNA, на 3'-конце gRNA или в их комбинации.

[0703] Не желая ограничиваться теорией, предполагают, что можно использовать любое ДНК-удлинение с любой gRNA, раскрытой в данном документе, при условии, что оно не гибридизируется с нуклеиновой кислотой-мишенью, на которую нацелена gRNA, а также демонстрирует увеличение уровня

редактирования в сайте нуклеиновой кислоты-мишени по сравнению с gRNA, которая не содержит такое ДНК-удлинение.

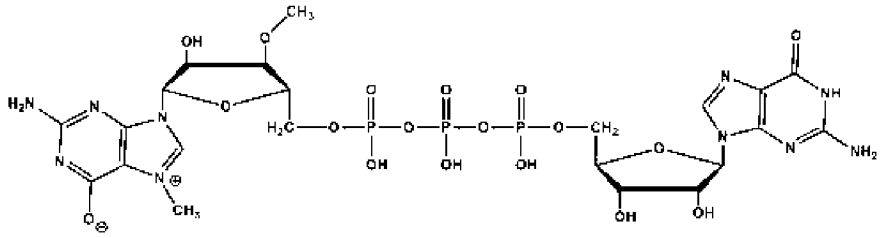
[0704] В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, содержит один или несколько отрезков из оснований рибонуклеиновой кислоты (РНК), также называемых в данном документе "РНК-удлинениями". В некоторых вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, содержит РНК-удлинение на 5'-конце gRNA, 3'-конце gRNA или в их комбинации. В определенных вариантах осуществления РНК-удлинение может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 оснований РНК. Например, в определенных вариантах осуществления РНК-удлинение может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 оснований РНК. В определенных вариантах осуществления РНК-удлинение может содержать одно или несколько оснований РНК, выбранных из аденина (rA), гуанина (rG), цитозина (rC) или урацила (rU), в которых "r" означает РНК с 2'-гидроксигруппой. В определенных вариантах осуществления РНК-удлинение содержит одинаковые основания РНК. Например, РНК-удлинение может содержать отрезок из оснований аденина (rA). В определенных вариантах осуществления РНК-удлинение содержит комбинацию различных оснований РНК. В определенных вариантах осуществления gRNA, используемая в данном документе, содержит РНК-удлинение, а также одну или несколько модификаций в виде фосфотиоатной связи, одну или несколько модификаций в виде фосфодитиоатной (PS2) связи, одну или несколько 2'-О-метильных модификаций, одну или несколько дополнительных подходящих модификаций gRNA, например, химических модификаций, раскрытых в данном документе, или их комбинации. В определенных вариантах осуществления одна или несколько модификаций могут находиться на 5'-конце gRNA, на 3'-конце gRNA или в их комбинации. В определенных вариантах осуществления gRNA, содержащая РНК-удлинение, может содержать последовательность, представленную в данном документе.

[0705] Предполагается, что используемые в данном документе gRNA могут также содержать РНК-удлинение и ДНК-удлинение. В определенных вариантах осуществления как РНК-удлинение, так и ДНК-удлинение могут находиться на 5'-конце gRNA, 3'-конце gRNA или их комбинации. В определенных вариантах осуществления РНК-удлинение находится на 5'-конце gRNA, а ДНК-удлинение находится на 3'-конце gRNA. В определенных вариантах осуществления РНК-удлинение находится на 3'-конце gRNA, а ДНК-удлинение находится на 5'-конце gRNA.

[0706] В некоторых вариантах осуществления gRNA, которая содержит модификацию, например, ДНК-удлинение на 5'-конце и/или химическую модификацию, как раскрыто в данном документе, входит в состав комплекса с нуклеазой CRISPR/Cas, например, нуклеазой AsCpf1, с образованием RNP, который затем используется для редактирования в клетке-мишени, например, плюрипотентной стволовой клетке или ее потомстве.

[0707] Определенные иллюстративные модификации, обсуждаемые в этом разделе, могут быть включены в любое положение в пределах последовательности gRNA, в том числе без ограничения на 5'-конце или вблизи него (например, в пределах 1-10, 1-5 или 1-2 нуклеотидов с 5'-конца) и/или на 3'-конце или вблизи него (например, в пределах 1-10, 1-5 или 1-2 нуклеотидов с 3'-конца). В некоторых случаях модификации расположены внутри функциональных мотивов, таких как дуплекс повтор-антиповтор в gRNA Cas9, структура "стебель-петля" в gRNA Cas9 или Cpf1 и/или нацеливающий домен gRNA.

[0708] В качестве одного примера, 5'-конец gRNA может содержать кэп-структуру эукариотической мРНК или аналог кэпа (например, аналог кэпа G(5')ppp(5')G, аналог кэпа m7G(5′)ppp(5′)G или аналог кэпа с правильной ориентацией 3′-O-Me-m7G(5′)ppp(5′)G (ARCA)), как показано ниже:

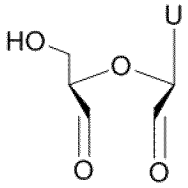


Кэп или аналог кэпа могут быть включены в ходе химического либо ферментативного синтеза gRNA.

[0709] Аналогичным образом, на 5'-конце gRNA может отсутствовать 5'-трифосфатная группа. Например, транскрибированные *in vitro* gRNA могут быть обработаны фосфатазой (например, с использованием кишечной щелочной фосфатазы теленка) для удаления 5'-трифосфатной группы.

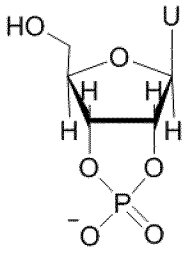
[0710] Другая распространенная модификация включает добавление к 3'-концу gRNA множества (например, 1-10, 10-20 или 25-200) остатков аденина (A), называемых поли(A)-трактом. Поли(A)-тракт может быть добавлен к gRNA в ходе химического или ферментативного синтеза с использованием полиаденозинполимеразы (например, поли(A)-полимеразы *E. coli*).

[0711] Направляющие РНК могут быть модифицированы по рибозе 3'-концевого U. Например, две концевые гидроксильные группы рибозы U могут быть окислены до альдегидных групп и сопутствующего раскрытия кольца рибозы с получением модифицированного нуклеозида, как показано ниже:



где "U" может представлять собой немодифицированный или модифицированный уридин.

[0712] Рибоза 3'-концевого U может быть модифицирована с помощью 2',3'-циклического фосфата, как показано ниже:



где "U" может представлять собой немодифицированный или модифицированный уридин.

[0713] Направляющие РНК могут содержать 3'-нуклеотиды, которые могут быть стабилизированы в отношении разрушения, например, благодаря включению одного или нескольких модифицированных нуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления остатки уридина можно заменить модифицированными остатками уридина, например, 5-(2-амино)пропилуридином и 5-бромуридином, или любыми модифицированными остатками уридина, описанными в данном документе; остатки аденозина и гуанозина могут быть заменены модифицированными остатками аденозина и

гуанозина, например, с модификациями в 8-положении, например, 8-бромгуанозином, или любым из модифицированных остатков аденозина или гуанозина, описанных в данном документе.

[0714] В определенных вариантах осуществления в состав gRNA могут быть включены рибонуклеотиды, модифицированные по сахарному фрагменту, например, где 2'-OH-группа заменена группой, выбранной из -H, -OR, -R (где R может представлять собой, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар), галогена, -SH, -SR (где R может представлять собой, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар), амино (где амино может представлять собой, например, NH_2, алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту) или циано (-CN). В определенных вариантах осуществления фосфатный остов может быть модифицирован так, как описано в данном документе, например, с помощью фосфотиоатной (PhTx) группы. В определенных вариантах осуществления каждый из одного или нескольких нуклеотидов gRNA может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, в том числе без ограничения модифицированный по 2'-сахарному фрагменту, такой как 2'-O-метил-, 2'-O-метоксиэтил- или 2'-фтор-модифицированный, в том числе, например, 2'-F- или 2'-O-метиладенозин (A), 2'-F- или 2'-O-метилцитидин (C), 2'-F- или 2'-O-метилуридин (U), 2'-F- или 2'-O-метилтимидин (T), 2'-F- или 2'-O-метилгуанозин (G), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Teo), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Aeo), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации.

[0715] Направляющие РНК также могут содержать "запертые" нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-OH-группа может быть соединена, например, с помощью C1-6-алкиленового или C1-6-гетероалкиленового мостика, с 4'-атомом углерода того же сахара рибозы. Для получения таких мостиков, в том числе без ограничения метиленовых, пропиленовых, эфирных или аминных мостиков, можно использовать любой подходящий фрагмент; O-амино (где амино может представлять собой, например, NH_2, алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино) и аминоалкокси или $O(CH_2)_n$-амино (где амино может представлять собой, например, NH_2, алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино).

[0716] В определенных вариантах осуществления gRNA может содержать модифицированный нуклеотид, который является полициклическим (например, трициклический нуклеотид); и "незапертые" формы, такие как гликолевая нуклеиновая кислота (GNA) (например, R-GNA или S-GNA, где рибоза заменена гликолевыми звеньями, присоединенными к фосфодиэфирным связям) или треозонуклеиновая кислота (TNA, где рибоза заменена на α-L-треофуранозил-(3'→2')).

[0717] Как правило, gRNA содержат сахарную группу в виде рибозы, которая представляет собой 5-членное кольцо, содержащее кислород. Иллюстративные модифицированные gRNA могут содержать без ограничения замену атома кислорода в рибозе (например, серой (S), селеном (Se) или алкиленом, таким как, например, метилен или этилен); добавление двойной связи (например, для замещения рибозы циклопентенилом или циклогексенилом); сужение кольца рибозы (например, с образованием 4-членного кольца циклобутана или оксетана); расширение кольца рибозы (например, с образованием 6- или 7-членного кольца, имеющего дополнительный атом углерода или гетероатом, такого как, например, ангидрогексит, альтрит, маннит, циклогексанил, циклогексенил и морфолино, который также имеет фосфорамидатный остов). Хотя большинство изменений с использованием аналогов сахаров локализовано в положении 2',

модификации подвержены и другие сайты, включая положение 4'. В определенных вариантах осуществления gRNA содержит модификацию 4'-S, 4'-Se или 4'-C-аминометил-2'-O-Me.

[0718] В определенных вариантах осуществления деазануклеотиды, например, 7-деазааденозин, могут быть включены в gRNA. В определенных вариантах осуществления O- и N-алкилированные нуклеотиды, например, N6-метиладенозин, могут быть включены в gRNA. В определенных вариантах осуществления один или несколько или все нуклеотиды в gRNA являются дезоксинуклеотидами.

[0719] Направляющие РНК также могут содержать одну или несколько поперечных связей между комплементарными областями crRNA (на ее 3'-конце) и tracrRNA (на ее 5'-конце) (например, в пределах структуры "тетрапетли" и/или расположенные в любой структуре "стебель-петля", встречающейся в пределах gRNA). Для использования подходят различные линкеры. Например, направляющие РНК могут содержать распространенные связывающие фрагменты, в том числе без ограничения поливиниловый эфир, полиэтилен, полипропилен, полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полигликолид (PGA), полилактид (PLA), поликапролактон (PCL) и их сополимеры.

[0720] В некоторых вариантах осуществления бифункциональное сшивающее средство используется для связывания 5'-конца первого фрагмента gRNA и 3'-конца второго фрагмента gRNA, и 3'- или 5'-концы подвергающихся связыванию фрагментов gRNA модифицируют с использованием функциональных групп, которые вступают в реакцию с реакционноспособными группами сшивающего средства. Как правило, эти модификации включают одну или более из амино-, сульфгидрильной , карбоксильной гидроксильной, алкеновой (например, концевой алкеновой), азидной и/или другой подходящей функциональной группы. Полифункциональные (например, бифункциональные) сшивающие средства также широко известны из уровня техники и могут быть гетерофункциональными либо гомофункциональными и могут содержать любую подходящую функциональную группу, в том числе без ограничения изотиоцианат, изоцианат, ацилазид, сложный NHS-эфир, сульфонилхлорид, тозиловый сложный эфир, трезиловый сложный эфир, альдегид, амин, эпоксид, карбонат (например, бис(п-нитрофенил)карбонат), арилгалогенид, алкилгалогенид, сложный имидоэфир, карбоксилат, алкилфосфат, ангидрид, фторфениловый сложный эфир, сложный эфир HOBt, гидроксиметилфосфин, O-метилизомочевину, DSC, NHS-карбамат, глутаровый альдегид, активированную двойную связь, циклический полуацеталь, NHS-карбонат, карбамат имидазола, ацилимидазол, метилпиридиниевый эфир, азлактон, цианатный сложный эфир, циклический имидокарбонат, хлортриазин, дегидроазепин, производные 6-сульфоцитозина, малеимид, азиридин, TNB-тиол, реактив Эллмана, пероксид, винилсульфон, сложный фенилтиоэфир, диазоалканы, диазоацетил, эпоксид, диазоний, бензофенон, антрахинон, диазопроизводные, производные диазирина, производные псоралена, алкен, фенилбороновую кислоту и т. д. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент gRNA содержит первую реакционноспособную группу, а второй фрагмент gRNA содержит вторую реакционноспособную группу. Например, каждая из первой и второй реакционноспособных групп может содержать аминный фрагмент, который сшит с карбонатсодержащим бифункциональным сшивающим реагентом с образованием мочевинной связи. В других случаях (a) первая реакционноспособная группа содержит бромацетильный фрагмент, а вторая реакционноспособная группа содержит сульфгидрильный фрагмент, или (b) первая реакционноспособная группа содержит сульфгидрильный фрагмент, а вторая реакционноспособная группа содержит бромацетильный фрагмент, которые сшиты посредством реакции бромацетильного фрагмента с сульфгидрильным фрагментом с образованием бромацетил-тиольной связи. Эти и другие химические

соединения для сшивания известны из уровня техники и обобщенно представлены в литературе, включая Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 3rd Ed. 2013, опубликованную Academic Press.

[0721] Дополнительные подходящие модификации gRNA будут очевидны средним специалистам в данной области на основании настоящего раскрытия. Подходящие модификации gRNA включают, например, модификации, описанные в публикации согласно PCT № WO2019070762A1, озаглавленной "MODIFIED CPF1 GUIDE RNA"; в публикации согласно PCT № WO2016089433A1, озаглавленной "GUIDE RNA WITH CHEMICAL MODIFICATIONS"; в публикации согласно PCT № WO2016164356A1, озаглавленной "CHEMICALLY MODIFIED GUIDE RNAS FOR CRISPR/CAS-MEDIATED GENE REGULATION"; и в публикации согласно PCT № WO2017053729A1, озаглавленной "NUCLEASE-MEDIATED GENOME EDITING OF PRIMARY CELLS AND ENRICHMENT THEREOF"; полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Иллюстративные gRNA

[0722] Неограничивающие примеры направляющих РНК, подходящих для определенных вариантов осуществления, охватываемых настоящим изобретением, представлены в данном документе, например, в таблицах ниже. Средние специалисты в данной области смогут представить себе подходящие последовательности направляющих РНК для конкретной нуклеазы, например, нуклеазы Cas9 или Cpf1, на основании раскрытия последовательности нацеливающего домена в виде последовательности ДНК либо РНК. Например, направляющая РНК, содержащая нацеливающую последовательность, состоящую из нуклеотидов РНК, будет содержать последовательность РНК, соответствующую последовательности нацеливающего домена, представленной в виде последовательности ДНК, и она будет содержать урациловые нуклеотиды вместо тимидиновых. Например, направляющая РНК, содержащая последовательность нацеливающего домена, состоящую из нуклеотидов РНК и описываемую последовательностью ДНК TCTGCAGAAATGTTCCCCGT (SEQ ID NO: 88), будет иметь нацеливающий домен с соответствующей последовательностью РНК UCUGCAGAAAUGUUCCCCGU (SEQ ID NO: 89). Как будет очевидно специалисту в данной области, такая направляющая последовательность будет связана с подходящей каркасной структурой направляющей РНК, например, с последовательностью каркасной структуры crRNA или последовательностью каркасной структуры химерной crRNA/tracrRNA. Подходящие последовательности каркасных структур gRNA известны средним специалистам в данной области. Например, для AsCpf1 подходящая последовательность каркасной структуры включает последовательность UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 90), добавленную к 5'-концу нацеливающего домена. В приведенном выше примере это приведет к образованию направляющей РНК Cpf1 с последовательностью UAAUUUCUACUCUUGUAGAUUCUGCAGAAAUGUUCCCCGU (SEQ ID NO: 91). Специалистам в данной области также будет дополнительно понятно, как модифицировать такую направляющую РНК, например, путем добавления ДНК-удлинения (например, в приведенном выше примере добавление 25-мерного ДНК-удлинения, как описано в данном документе, приведет, например, к получению последовательности направляющей РНК ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrCrArGrArArArUrGrUrUrCrCrCrCrGrU (SEQ ID NO: 92)). Будет понятно, что иллюстративные нацеливающие последовательности, предусмотренные в данном документе, не являются ограничивающими, и дополнительные подходящие последовательности, например, варианты конкретных последовательностей,

раскрытых в данном документе, будут очевидны специалисту в данной области на основании настоящего раскрытия с учетом общедоступных сведений из уровня техники.

[0723] Будет понятно, что иллюстративные gRNA, раскрытые в данном документе, предусмотрены для иллюстрации неограничивающих вариантов осуществления, охватываемых настоящим изобретением. Дополнительные подходящие последовательности gRNA будут очевидны специалисту в данной области на основании настоящего раскрытия, и настоящее раскрытие не ограничено в этом отношении.

Клетки-мишени

[0724] Способы по настоящему изобретению можно применять для редактирования генома любой клетки. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой стволовую клетку, например, клетку iPS или ES. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень может представлять собой клетку, происходящую из iPS или ES, где генетическая модификация осуществляется на любой стадии в ходе процесса перепрограммирования из донорной клетки в iPSC, в ходе стадии iPSC и/или на любой стадии процесса дифференцировки iPSC или ESC в специализированную клетку или даже вплоть до достижения конечного специализированного состояния клетки или в самом таком состоянии. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень может представлять собой NK-клетку, происходящую из iPS (iNK-клетку), или T-клетку, происходящую из iPS (iT-клетку), где генетическая модификация осуществляется на любой стадии в ходе процесса перепрограммирования из донорной клетки в iPSC, в ходе стадии iPSC и/или на любой стадии процесса дифференцировки iPSC в состояние iNK или iT, например, в промежуточном состоянии, таком как, например, состояние HSC, происходящей из iPSC, или даже вплоть до достижения конечного состояния iNK- или iT-клетки или в самом таком состоянии.

[0725] В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой одну или несколько из гемопоэтической стволовой клетки с долгосрочной активностью, гемопоэтической стволовой клетки с краткосрочной активностью, мультипотентной клетки-предшественника, клетки-предшественника, ограниченной линией дифференцировки, лимфоидной клетки-предшественника, миелоидной клетки-предшественника, общей миелоидной клетки-предшественника, эритроидной клетки-предшественника, клетки-предшественника эритроцитов и мегакариоцитов, клетки сетчатки, фоторецепторной клетки, палочковой клетки, колбочковой клетки, клетки пигментного эпителия сетчатки, клетки трабекулярной сети, волосковой клетки улитки, наружной волосковой клетки, внутренней волосковой клетки, клетки легочного эпителия, клетки бронхиального эпителия, клетки альвеолярного эпителия, клетки-предшественника легочного эпителия, клетки поперечнополосатой мышечной ткани, клетки сердечной мышечной ткани, сателлитной клетки мышечной ткани, нейрона, нейрональной стволовой клетки, мезенхимальной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPS), эмбриональной стволовой клетки, фибробласта, макрофага или дендритной клетки моноцитарного происхождения, мегакариоцита, нейтрофила, эозинофила, базофила, тучной клетки, ретикулоцита, B-клетки, например, предшественника B-клетки, пре-B-клетки, про-B-клетки, B-клетки памяти, плазматической B-клетки, клетки эпителия желудочно-кишечного тракта, клетки билиарного эпителия, клетки эпителия протоков поджелудочной железы, стволовой клетки кишечника, гепатоцита, звездчатой клетки печени, клетки Купфера, остеобласта, остеокласта, адипоцита, преадипоцита, островковой клетки поджелудочной железы (например, бета-клетки, альфа-клетки, дельта-клетки), экзокринной клетки поджелудочной железы, шванновской клетки или олигодендроцита. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень

представляет собой нейрональную клетку-предшественника. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой нейрон.

[0726] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой циркулирующую кровяную клетку, например, ретикулоцит, клетку-предшественника эритроцитов и мегакариоцитов (MEP), миелоидную клетку-предшественника (CMP/GMP), лимфоидную клетку-предшественника (LP), гемопоэтическую стволовую клетку/клетку-предшественника (HSC) или эндотелиальную клетку (EC). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой одну или несколько из клетки костного мозга (например, ретикулоцита, эритроидной клетки (например, эритробласта), клетки MEP, миелоидной клетки-предшественника (CMP/GMP), клетки LP, эритроидной клетки-предшественника (EP), HSC, мультипотентной клетки-предшественника (MPP), эндотелиальной клетки (EC), клетки гемогенного эндотелия (HE) или мезенхимальной стволовой клетки). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой одну или несколько из миелоидной клетки-предшественника (например, общей миелоидной клетки-предшественника (CMP) или клетки-предшественника гранулоцитов и макрофагов (GMP)). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой лимфоидную клетку-предшественника, например, общую лимфоидную клетку-предшественник (CLP). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой одну или несколько из эритроидной клетки-предшественника (например, клетку MEP). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой одну или несколько из гемопоэтической стволовой клетки/клетки-предшественника (например, HSC с долгосрочной активностью (LT-HSC), HSC с краткосрочной активностью (ST-HSC), клетки MPP или клетки-предшественника, ограниченной линией дифференцировки (LRP)). В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой $CD34^+$ клетку, $CD34^+CD90^+$ клетку, $CD34^+CD38^-$ клетку, $CD34^+CD90^+CD49f^+CD38^-CD45RA^-$ клетку, $CD105^+$ клетку, $CD31^+$ или $CD133^+$ клетку или $CD34^+CD90^+$ $CD133^+$ клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой одну или несколько из $CD34^+$ HSPC пуповинной крови, эндотелиальной клетки пуповинной артерии, эндотелиальной клетки пуповинной вены, $CD34^+$ клетки амниотической жидкости, эндотелиальной клетки амниотической жидкости, эндотелиальной клетки плаценты или $CD34^+$ гемопоэтической клетки плаценты. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой одну или несколько из $CD34^+$ гемопоэтической клетки мобилизованной периферической крови (после обработки субъекта с помощью средства мобилизации, например, G-CSF или плериксафора). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой эндотелиальную клетку периферической крови. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой естественную клетку-киллера периферической крови.

[0727] В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой первичную клетку, например, клетку, выделенную из субъекта-человека. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой иммунную клетку, например, первичную иммунную клетку, выделенную из субъекта-человека. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой часть популяции клеток, выделенных из субъекта, например, субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит популяцию иммунных клеток, выделенных из субъекта. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), например, TIL, выделенные из субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень выделена из здорового субъекта, например, из здорового донора-человека. В

некоторых вариантах осуществления клетка-мишень выделена из субъекта, у которого имеется заболевание или нарушение, например, из нуждающегося в лечении пациента-человека.

[0728] В определенных вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой иммунную клетку, например, первичную иммунную клетку, например, $CD8^+$ Т-клетку, необученную $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^+$ центральную Т-клетку памяти, $CD8^+$ центральную Т-клетку памяти, $CD4^+$ эффекторную Т-клетку памяти, $CD4^+$ эффекторную Т-клетку памяти, $CD4^+$ Т-клетку, $CD4^+$ стволовую Т-клетку памяти, $CD8^+$ стволовую Т-клетку памяти, $CD4^+$ хелперную Т-клетку, регуляторную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку, естественную Т-клетку-киллера, необученную CD4+ Т-клетку, $CD4^+$ Т-клетку TH17-типа, $CD4^+$ Т-клетку TH1-типа, $CD4^+$ Т-клетку TH2-типа, $CD4^+$ Т-клетку TH9-типа, $CD4^+$ $Foxp3^+$ Т-клетку, $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^-$ Т-клетку или $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^-$ $Foxp3^+$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой альфа/бета-Т-клетку, гамма/дельта-Т-клетку или Treg. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой макрофаг. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой лимфоидную клетку врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой бета-клетку, например, бета-клетку поджелудочной железы.

[0729] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень выделена из субъекта, у которого имеется рак.

[0730] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень выделена из субъекта, у которого имеется рак, в том числе без ограничения невринома слухового нерва; аденокарцинома; рак надпочечников; рак анального канала; ангиосаркома (например, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, гемангиосаркома); рак аппендикса; доброкачественная моноклональная гаммапатия; рак желчевыводящей системы (например, холангиокарцинома); рак желчных протоков; рак мочевого пузыря; рак кости; рак молочной железы (например, аденокарцинома молочной железы, папиллярная карцинома молочной железы, рак молочной железы, медуллярная карцинома молочной железы); рак головного мозга (например, менингиома, глиобластома, глиома (например, астроцитома, олигодендроглиома, медуллобластома); рак бронхов; карциноидная опухоль; опухоль сердца; рак шейки матки (например, аденокарцинома шейки матки); хориокарцинома; хордома; краниофарингиома; колоректальный рак (например, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, колоректальная аденокарцинома); рак соединительной ткани; эпителиальная карцинома; протоковая карцинома *in situ*; эпендимома; эндотелиосаркома (например, саркома Капоши, множественная идиопатическая геморрагическая саркома); рак эндометрия (например, рак матки, саркома матки); рак пищевода (например, аденокарцинома пищевода, аденокарцинома Барретта); саркома Юинга; рак глаза (например, внутриглазная меланома, ретинобластома); семейная гиперэозинофилия; рак желчного пузыря; рак желудка (например, аденокарцинома желудка); стромальная опухоль желудочно-кишечного тракта (GIST); рак из зародышевых клеток; рак головы и шеи (например, плоскоклеточная карцинома головы и шеи), рак ротовой полости (например, плоскоклеточная карцинома ротовой полости), рак горла (например, рак гортани, рак глотки, рак носоглотки, рак ротоглотки); рак кроветворной системы (например, формы лимфомы, первичной лимфомы легкого, лимфомы из лимфоидной ткани, ассоциированной с бронхами, лимфомы селезенки, узловой лимфомы из клеток маргинальной зоны, педиатрической В-клеточной неходжкинской лимфомы); гемангиобластома; гистиоцитоз; рак гортаноглотки; воспалительные миофибробластические опухоли; иммуноцитарный амилоидоз; рак почки (например, нефробластома, также

известная как опухоль Вильмса, почечноклеточная карцинома); рак печени (например, гепатоцеллюлярный рак (HCC), злокачественная гепатома); рак легкого (например, бронхогенная карцинома, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), аденокарцинома легкого); лейомиосаркома (LMS); меланома; карцинома срединного тракта; синдром множественной эндокринной неоплазии; рак мышц; мезотелиома; рак носоглотки; нейробластома; нейрофиброма (например, нейрофиброматоз (NF) типа 1 или типа 2, шванноматоз); нейроэндокринный рак (например, гастроэнтеропанкреатическая нейроэндокринная опухоль (GEP-NET), карциноидная опухоль); остеосаркома (например, рак кости); рак яичника (например, цистаденокарцинома, эмбриональная карцинома яичника, аденокарцинома яичника); папиллярная аденокарцинома; рак поджелудочной железы (например, аденокарцинома поджелудочной железы, внутрипротоковое папиллярное муцинозное новообразование (IPMN), опухоли из островковых клеток); рак паращитовидной железы; папиллярная аденокарцинома; рак полового члена (например, болезнь Педжета полового члена и мошонки); рак глотки; пинеалома; рак гипофиза; плевропульмональная бластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль (PNT); новообразование из плазматических клеток; паранеопластические синдромы; внутриэпителиальные новообразования; рак предстательной железы (например, аденокарцинома предстательной железы); рак прямой кишки; рабдомиосаркома; ретинобластома; рак слюнной железы; рак кожи (например, плоскоклеточная карцинома (SCC), кератоакантома (KA), меланома, базальноклеточная карцинома (BCC)); рак тонкой кишки (например, рак аппендикса); саркома мягких тканей (например, злокачественная фиброзная гистиоцитома (MFH), липосаркома, злокачественная опухоль оболочек периферических нервов (MPNST), хондросаркома, фибросаркома, миксосаркома); карцинома сальной железы; рак желудка; рак тонкой кишки; карцинома потовой железы; синовиома; рак яичка (например, семинома, эмбриональная карцинома яичка); рак тимуса; рак щитовидной железы (например, папиллярная карцинома щитовидной железы, папиллярная тиреоидная карцинома (PTC), медуллярный рак щитовидной железы); рак уретры; рак матки; рак влагалища; рак вульвы (например, болезнь Педжета вульвы) или любая их комбинация.

[0731] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень выделена из субъекта, у которого имеется гематологическое нарушение. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень выделена из субъекта, у которого имеется серповидноклеточная анемия. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень выделена из субъекта, у которого имеется β-талассемия.

Стволовые клетки

[0732] Способы по настоящему изобретению можно применять со стволовыми клетками. Стволовые клетки, как правило, представляют собой клетки, способные производить неизмененные дочерние клетки (способные к самообновлению; при делении клеток образуется по меньшей мере одна дочерняя клетка, идентичная исходной клетке) и давать начало специализированным типам клеток (потентность). Стволовые клетки включают без ограничения эмбриональные стволовые (ES) клетки, эмбриональные зародышевые (EG) клетки, стволовые клетки зародышевой линии (GS), мезенхимальные стволовые клетки человека (hMSC), стволовые клетки жировой ткани (ADSC), мультипотентные клетки-предшественники взрослых организмов (MAPC), мультипотентные стволовые клетки зародышевой линии взрослых организмов (maGSC) и неограниченные соматические стволовые клетки (USSC). Как правило, стволовые клетки могут делиться неограниченно. После деления стволовая клетка может остаться стволовой клеткой, стать клеткой-предшественником или перейти к терминальной дифференцировке. Клетка-предшественник представляет собой клетку, которая может образовывать полностью дифференцированную

функциональную клетку по меньшей мере одного заданного типа клеток. Как правило, клетки-предшественники могут делиться. После деления клетка-предшественник может оставаться клеткой-предшественником или может переходить к терминальной дифференцировке.

[0733] Плюрипотентные стволовые клетки широко известны из уровня техники. В настоящем изобретении предусмотрены технологии (например, системы, композиции, способы и т. д.), относящиеся к плюрипотентным стволовым клеткам. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки представляют собой стволовые клетки, которые: (a) способны индуцировать тератомы при трансплантации мышам с иммунодефицитом (SCID); (b) способны дифференцироваться в типы клеток всех трех зародышевых листков (например, могут дифференцироваться в эктодермальные, мезодермальные и энтодермальные типы клеток) и/или (c) экспрессируют один или несколько маркеров эмбриональных стволовых клеток (например, эмбриональные стволовые клетки человека экспрессируют Oct-4, щелочную фосфатазу, поверхностный антиген SSEA-3, поверхностный антиген SSEA-4, NANOG, TRA-1-60, TPA-1-81, Sox-2, REX1 и т. д.). В некоторых аспектах плюрипотентные стволовые клетки человека не демонстрируют экспрессию маркеров дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления клетки ES и/или iPSC, подвергнутые редактированию с применением способов по настоящему изобретению, сохраняют свою плюрипотентность, например, (a) способны индуцировать тератомы при трансплантации мышам с иммунодефицитом (SCID); (b) способны дифференцироваться в типы клеток всех трех зародышевых листков, например, могут дифференцироваться в эктодермальные, мезодермальные и энтодермальные типы клеток; и/или (c) экспрессируют один или несколько маркеров эмбриональных стволовых клеток.

[0734] В некоторых вариантах осуществления клетки ES (например, клетки ES человека) могут быть получены из внутренней клеточной массы бластоцисты или морулы. В некоторых вариантах осуществления клетки ES могут быть выделены из одного или нескольких бластомеров эмбриона, например, без разрушения остальной части эмбриона. В некоторых вариантах осуществления клетки ES могут быть получены путем переноса ядер соматических клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки ES могут быть получены в результате оплодотворения яйцеклетки спермой или ДНК, переноса ядра, партеногенеза или путем получения клеток ES, например, с гомозиготностью в области HLA. В некоторых вариантах осуществления клетки ES человека могут продуцироваться зиготой, бластомерами или эмбрионами млекопитающих на стадии бластоцисты, полученными путем слияния сперматозоида и яйцеклетки, переноса ядра, партеногенеза или перепрограммирования хроматина и последующего включения перепрограммированного хроматина в плазматическую мембрану для получения эмбриональной клетки, или быть получены из них. Иллюстративные клетки ES человека известны из уровня техники и включают без ограничения клетки ES MAO1, MAO9, ACT-4, No. 3, H1, H7, H9, H14 и ACT30. В некоторых вариантах осуществления клетки ES человека, независимо от их источника или конкретного способа, применяемого для их получения, можно идентифицировать на основании, например, (i) способности дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, (ii) экспрессии по меньшей мере Oct-4 и щелочной фосфатазы и/или (iii) способности образовывать тератомы при трансплантации животным с ослабленным иммунитетом. В некоторых вариантах осуществления клетки ES подвергали серийному пассированию как линии клеток.

Клетки iPS

[0735] Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) представляют собой тип плюрипотентных стволовых клеток, искусственным путем полученных из неплюрипотентных клеток, таких

как соматическая клетка взрослого организма (например, фибробласт или другая подходящая соматическая клетка), путем индукции экспрессии определенных генов. iPSC могут быть получены из любого организма, как, например, из млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления iPSC получены из мышей, крыс, кроликов, морских свинок, коз, свиней, коров, отличных от человека приматов или людей. iPSC подобны клеткам ES во многих отношениях, таких как экспрессия определенных генов и белков стволовых клеток, паттерны метилирования хроматина, время удвоения, образование эмбриоидных телец, образование тератом, образование жизнеспособных химер, потентность и/или способность к дифференцировке. Из уровня техники известны различные подходящие способы получения iPSC. В некоторых вариантах осуществления iPSC могут быть получены путем трансфекции определенных генов, ассоциированных со стволовыми клетками (таких как Oct-3/4 (Pouf51) и Sox-2), в неплюрипотентные клетки, такие как фибробласты взрослых организмов. Трансфекция может осуществляться посредством вирусных векторов, таких как ретровирусы, лентивирусы или аденовирусы. Дополнительные подходящие способы перепрограммирования включают применение векторов, которые не интегрируются в геном клетки-хозяина, например, эписомальных векторов, а также была описана доставка факторов перепрограммирования непосредственно через кодирующую их РНК или в виде белков. Например, клетки могут быть трансфицированы посредством Oct-3/4, Sox-2, Klf4 и/или c-Myc с использованием ретровирусной системы или посредством Oct-4, Sox-2, NANOG и/или LIN28 с использованием лентивирусной системы. Через 3-4 недели небольшое количество трансфицированных клеток начинает становиться морфологически и биохимически сходными с плюрипотентными стволовыми клетками, и их можно выделить с помощью морфологического отбора, на основании времени удвоения или с помощью отбора по репортерному гену и с использованием антибиотиков. В одном примере iPSC из клеток взрослого человека получают посредством способа, описанного в Yu et al., Science 2007; 318(5854):1224 или в Takahashi et al., Cell 2007; 131:861-72. Специалистам в данной области известны многочисленные подходящие способы перепрограммирования, и настоящее изобретение не ограничено в этом отношении.

[0736] В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень для способов редактирования и интеграции груза, описанных в данном документе, представляет собой iPSC, где подвергнутая редактированию iPSC затем дифференцируется, например, в иммунную клетку, происходящую из iPSC. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка представляет собой иммунную клетку, происходящую из iPSC. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка представляет собой iNK-клетку, происходящую из iPSC, Т-клетку, происходящую из iPSC (например, альфа/бета-Т-клетку, происходящую из iPSC, гамма/дельта-Т-клетку, происходящую из iPSC, Treg, CD4+ Т-клетку или CD8+ Т-клетку), дендритную клетку, происходящую из iPSC, или макрофаг, происходящий из iPSC. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка представляет собой бета-клетку поджелудочной железы, происходящую из iPSC.

iNK-клетки

[0737] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы получения iNK-клеток (например, генетически модифицированных iNK-клеток).

[0738] В некоторых вариантах осуществления генетические модификации, присутствующие в iNK-клетке по настоящему изобретению, могут быть осуществлены на любой стадии в ходе процесса перепрограммирования из донорной клетки в iPSC, в ходе стадии iPSC и/или на любой стадии процесса дифференцировки iPSC в состояние iNK, например, в промежуточном состоянии, таком как, например,

состояние HSC, происходящей из iPSC, или даже вплоть до достижения конечного состояния iNK-клетки или в самом таком состоянии.

[0739] Например, одна или несколько геномных модификаций, присутствующих в генетически модифицированной iNK-клетке по настоящему изобретению, могут быть осуществлены на одной или нескольких различных стадиях клетки (например, на стадии перепрограммирования из донорной клетки в iPSC, дифференцировки iPSC в iNK). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько геномных модификаций, присутствующих в генетически модифицированной iNK-клетке, предусмотренной в данном документе, осуществляются до перепрограммирования донорной клетки в состояние iPSC. В некоторых вариантах осуществления все редактирования, присутствующие в генетически модифицированной iNK-клетке, предусмотренной в данном документе, осуществляются одновременно, в непосредственной близости по времени и/или на одной и той же стадии процесса перепрограммирования/дифференцировки клетки, например, на стадии донорной клетки, в ходе процесса перепрограммирования, на стадии iPSC или в ходе процесса дифференцировки, например, из iPSC в iNK. В некоторых вариантах осуществления два или более редактирования, присутствующие в генетически модифицированной iNK-клетке, предусмотренной в данном документе, осуществляются в разное время и/или на разных стадиях процесса перепрограммирования/дифференцировки клетки из донорной клетки в iPSC и в iNK. Например, в некоторых вариантах осуществления первое редактирование осуществляют на стадии донорной клетки, а второе (другое) редактирование осуществляют на стадии iPSC. В некоторых вариантах осуществления первое редактирование осуществляют на стадии перепрограммирования (например, донорной клетки в iPSC), а второе (другое) редактирование осуществляют на стадии iPSC.

[0740] В качестве донорной клетки можно использовать различные типы клеток, которые можно подвергнуть стратегиям перепрограммирования, дифференцировки и/или генной инженерии, описанным в данном документе. Например, донорная клетка может представлять собой плюрипотентную стволовую клетку или дифференцированную клетку, например, соматическую клетку, такую как, например, фибробласт или Т-лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления донорные клетки подвергают манипуляциям (например, подвергают перепрограммированию, дифференцировке и/или генной инженерии) для получения iNK-клеток, описанных в данном документе.

[0741] Донорная клетка может быть получена из любого подходящего организма. Например, в некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой клетку млекопитающего, например, клетку человека или клетку примата, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой соматическую клетку. В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой стволовую клетку или клетку-предшественник. В некоторых вариантах осуществления донорная клетка не является или не являлась частью человеческого эмбриона, и ее получение не включает разрушение человеческого эмбриона.

[0742] В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированная iNK-клетка происходит из iPSC, которая, в свою очередь, происходит из соматической донорной клетки. Любая подходящая соматическая клетка может быть использована для получения iPSC и, в свою очередь, для получения iNK-клеток. Подходящие стратегии получения iPSC из различных типов соматических донорных клеток были описаны и известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления соматическая донорная клетка представляет собой клетку-фибробласт. В некоторых вариантах осуществления соматическая донорная клетка представляет собой зрелую Т-клетку.

[0743] Например, в некоторых вариантах осуществления соматическая донорная клетка, из которой происходит iPS-клетка, а затем и iNK-клетка, представляет собой Т-клетку, созревшую в процессе развития (Т-клетку, которая подверглась селекции в тимусе). Отличительной чертой Т-клеток, созревших в процессе развития, является перестроенный локус Т-клеточного рецептора. В ходе созревания Т-клеток локус TCR подвергается V(D)J-перестройкам с образованием полных экзонов V-домена. Эти перестройки сохраняются в ходе перепрограммирования Т-клеток в iPSC и в ходе дифференцировки полученной в результате iPSC в соматическую клетку.

[0744] В определенных вариантах осуществления соматическая донорная клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку, необученную $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^+$ центральную Т-клетку памяти, $CD8^+$ центральную Т-клетку памяти, $CD4^+$ эффекторную Т-клетку памяти, $CD4^+$ эффекторную Т-клетку памяти, $CD4^+$ Т-клетку, $CD4^+$ стволовую Т-клетку памяти, $CD8^+$ стволовую Т-клетку памяти, $CD4^+$ хелперную Т-клетку, регуляторную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку, естественную Т-клетку-киллера, необученную CD4+ Т-клетку, $CD4^+$ Т-клетку TH17-типа, $CD4^+$ Т-клетку TH1-типа, $CD4^+$ Т-клетку TH2-типа, $CD4^+$ Т-клетку TH9-типа, $CD4^+$ $Foxp3^+$ Т-клетку, $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^-$ Т-клетку или $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^-$ $Foxp3^+$ Т-клетку.

[0745] Т-клетки могут быть преимущественными для получения iPSC. Например, Т-клетки можно относительно легко подвергать редактированию, например, с помощью способов на основе CRISPR или других способов генной инженерии. Кроме того, перестроенный локус TCR позволяет осуществлять генетическое отслеживание отдельных клеток и их дочерних клеток. Например, если стратегии перепрограммирования, размножения, культивирования и/или дифференцировки задействованы в получении NK-клеток путем клонального размножения отдельной клетки, перестроенный локус TCR можно использовать в качестве генетического маркера, однозначно идентифицирующего клетку и ее дочерние клетки. Это, в свою очередь, позволяет характеризовать популяцию клеток как истинно клональную или идентифицировать смешанные популяции или контаминирующие клетки в клональной популяции. Другое потенциальное преимущество применения Т-клеток для получения iNK-клеток, несущих множественные редактирования, заключается в том, что в культуре Т-клеток осуществляется отрицательный отбор определенных кариотипических аберраций, ассоциированных с хромосомными транслокациями. Такие аберрации могут являться поводом для беспокойства при редактировании в клетках с помощью технологии CRISPR и, в частности, при получении клеток, несущих множественные редактирования. Использование iPSC, полученных из Т-клеток, в качестве отправной точки для получения терапевтических лимфоцитов может обеспечивать возможность экспрессии подвергнутых предварительному скринингу TCR в лимфоцитах, например, путем отбора Т-клеток по активности связывания в отношении специфического антигена, например, опухолевого антигена, перепрограммирования выбранных Т-клеток в iPSC, а затем получения из этих iPSC лимфоцитов, которые экспрессируют TCR (например, Т-клеток). Эта стратегия может обеспечивать возможность активации TCR в других типах клеток, например, с помощью генетических или эпигенетических стратегий. Кроме того, Т-клетки сохраняют по меньшей мере часть своей "эпигенетической памяти" в ходе процесса перепрограммирования, и, таким образом, последующая дифференцировка в такой же тип клеток или близкородственный тип клеток, такой как iNK-клетки, может быть более эффективной и/или приводить к получению более качественных популяций клеток по сравнению с подходами, в которых используются неродственные клетки, такие как фибробласты, в качестве отправной точки для получения iNK.

[0746] В некоторых вариантах осуществления донорная клетка, которая подвергается манипуляциям, например, клетка, которая подвергается перепрограммированию и/или подвергается генной инженерии, как описано в данном документе, представляет собой одну или несколько из гемопоэтической стволовой клетки с долгосрочной активностью, гемопоэтической стволовой клетки с краткосрочной активностью, мультипотентной клетки-предшественника, клетки-предшественника, ограниченной линией дифференцировки, лимфоидной клетки-предшественника, миелоидной клетки-предшественника, общей миелоидной клетки-предшественника, эритроидной клетки-предшественника, клетки-предшественника эритроцитов и мегакариоцитов, клетки сетчатки, фоторецепторной клетки, палочковой клетки, колбочковой клетки, клетки пигментного эпителия сетчатки, клетки трабекулярной сети, волосковой клетки улитки, наружной волосковой клетки, внутренней волосковой клетки, клетки легочного эпителия, клетки бронхиального эпителия, клетки альвеолярного эпителия, клетки-предшественника легочного эпителия, клетки поперечнополосатой мышечной ткани, клетки сердечной мышечной ткани, сателлитной клетки мышечной ткани, нейрона, нейрональной стволовой клетки, мезенхимальной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPS), эмбриональной стволовой клетки, фибробласта, макрофага или дендритной клетки моноцитарного происхождения, мегакариоцита, нейтрофила, эозинофила, базофила, тучной клетки, ретикулоцита, В-клетки, например, предшественника В-клетки, пре-В-клетки, про-В-клетки, В-клетки памяти, плазматической В-клетки, клетки эпителия желудочно-кишечного тракта, клетки билиарного эпителия, клетки эпителия протоков поджелудочной железы, стволовой клетки кишечника, гепатоцита, звездчатой клетки печени, клетки Купфера, остеобласта, остеокласта, адипоцита, преадипоцита, островковой клетки поджелудочной железы (например, бета-клетки, альфа-клетки, дельта-клетки), экзокринной клетки поджелудочной железы, шванновской клетки или олигодендроцита.

[0747] В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой одну или несколько из циркулирующей кровяной клетки, например, ретикулоцита, клетки-предшественника эритроцитов и мегакариоцитов (MEP), миелоидной клетки-предшественника (CMP/GMP), лимфоидной клетки-предшественника (LP), гемопоэтической стволовой клетки/клетки-предшественника (HSC) или эндотелиальной клетки (EC). В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой одну или несколько из клетки костного мозга (например, ретикулоцита, эритроидной клетки (например, эритробласта), клетки MEP, миелоидной клетки-предшественника (CMP/GMP), клетки LP, эритроидной клетки-предшественника (EP), HSC, мультипотентной клетки-предшественника (MPP), эндотелиальной клетки (EC), клетки гемогенного эндотелия (HE) или мезенхимальной стволовой клетки). В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой одну или несколько из миелоидной клетки-предшественника (например, общей миелоидной клетки-предшественника (CMP) или клетки-предшественника гранулоцитов и макрофагов (GMP)). В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой одну или несколько из лимфоидной клетки-предшественника, например, общую лимфоидную клетку-предшественника (CLP). В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой одну или несколько из эритроидной клетки-предшественника (например, клетку MEP). В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой одну или несколько из гемопоэтической стволовой клетки/клетки-предшественника (например, HSC с долгосрочной активностью (LT-HSC), HSC с краткосрочной активностью (ST-HSC), клетки MPP или клетки-предшественника, ограниченной линией дифференцировки (LRP)). В определенных вариантах осуществления донорная клетка представляет собой $CD34^+$ клетку, $CD34^+CD90^+$ клетку, $CD34^+CD38^-$ клетку, $CD34^+CD90^+CD49f^+CD38^-$

$CD45RA^-$ клетку, $CD105^+$ клетку, $CD31^+$ или $CD133^+$ клетку или $CD34^+CD90^+$ $CD133^+$ клетку. В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой одну или несколько из $CD34^+$ HSPC пуповинной крови, эндотелиальной клетки пуповинной артерии, эндотелиальной клетки пуповинной вены, $CD34^+$ клетки амниотической жидкости, эндотелиальной клетки амниотической жидкости, эндотелиальной клетки плаценты или $CD34^+$ гемопоэтической клетки плаценты. В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой одну или несколько из $CD34^+$ гемопоэтической клетки мобилизованной периферической крови (после обработки субъекта с помощью средства мобилизации, например, G-CSF или плериксафора). В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой эндотелиальную клетку периферической крови. В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой естественную клетку-киллера периферической крови.

[0748] В некоторых вариантах осуществления донорная клетка представляет собой делящуюся клетку. В других вариантах осуществления донорная клетка представляет собой неделящуюся клетку.

[0749] В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированную (например, подвергнутую редактированию) iNK-клетку, полученную в результате осуществления одного или нескольких способов и/или стратегий, описанных в данном документе, вводят нуждающемуся в этом субъекту, например, в ситуации иммуноонкологического терапевтического подхода. В некоторых вариантах осуществления донорные клетки или любые клетки на любой стадии перепрограммирования, дифференцировки и/или генной инженерии, предусмотренные в данном документе, могут поддерживаться в культуре или храниться (например, замороженными в жидком азоте) с использованием любого подходящего способа, известного из уровня техники, например, для последующего определения характеристик или введения нуждающемуся в этом субъекту.

Способы определения характеристик

[0750] Способы определения характеристик клеток, в том числе определения характеристик клеточного фенотипа, известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления один или несколько таких способов могут включать без ограничения, например, морфологические анализы и проточную цитометрию. Маркеры клеточной линии дифференцировки и принадлежности известны специалистам в данной области. Один или несколько таких маркеров можно использовать в комбинации с одним или несколькими способами определения характеристик для определения состава популяции клеток или фенотипической принадлежности одной или нескольких клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления характеристики клеток из конкретной популяции будут определены с помощью проточной цитометрии (например, см. Ye Li et al., Cell Stem Cell. 2018 Aug 2; 23(2): 181-192.e5). В некоторых таких вариантах осуществления образец популяции клеток будут оценивать в отношении наличия и доли одного или нескольких маркеров клеточной поверхности и/или одного или нескольких внутриклеточных маркеров. Как будет понятно специалистам в данной области, такие маркеры клеточной поверхности могут быть характерными для разных линий дифференцировки. Например, плюрипотентные клетки можно идентифицировать по одному или нескольким из любого количества маркеров, которые, как известно, ассоциированы с такими клетками, по таким как, например, CD34. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления клетки можно идентифицировать по маркерам, указывающим на некоторую степень дифференцировки. Такие маркеры известны специалистам в данной области. Например, в некоторых вариантах осуществления маркеры дифференцированных клеток могут включать маркеры, ассоциированные с дифференцированными гемопоэтическими клетками, такие как, например, CD43, CD45

(дифференцированные гемопоэтические клетки). В некоторых вариантах осуществления маркеры дифференцированных клеток могут быть ассоциированы с фенотипами NK-клеток, такие как, например, CD56, рецептор III Fc-области иммуноглобулина гамма, являющийся рецептором NK-клеток (FcγRIII, кластер дифференцировки 16 (CD16)), представитель D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), CD69, естественный рецептор цитотоксичности и т. д. В некоторых вариантах осуществления маркеры могут представлять собой Т-клеточные маркеры (например, CD3, CD4, CD8 и т. д.).

Способы применения

[0751] Различные заболевания, нарушения и/или состояния можно лечить посредством применения клеток, предусмотренных в настоящем изобретении. Например, в некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение и/или состояние можно лечить путем введения субъекту генетически модифицированных или сконструированных клеток, описанных в данном документе (например, генетически модифицированных iNK-клеток). Примеры заболеваний, которые можно лечить, включают без ограничения рак, например, солидные опухоли, например, головного мозга, предстательный железы, молочной железы, легкого, ободочной кишки, матки, кожи, печени, кости, поджелудочной железы, яичника, яичек, мочевого пузыря, почки, головы, шеи, желудка, шейки матки, прямой кишки, гортани или пищевода; и гематологические злокачественные новообразования, например, формы острого и хронического лейкоза, лимфомы, множественную миелому и формы миелодиспластического синдрома.

[0752] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения нуждающегося в этом субъекта путем введения субъекту композиции, содержащей любую из клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство или композицию можно вводить до, во время или после начала проявления заболевания, нарушения или состояния (в том числе, например, повреждения). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена любая из клеток, описанных в данном документе, для применения при получении лекарственного препарата. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены любые клетки, описанные в данном документе, для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, которое можно лечить с помощью клеточной терапии.

[0753] В конкретных вариантах осуществления у субъекта имеется заболевание, нарушение или состояние, которое можно лечить с помощью клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления нуждающийся в клеточной терапии субъект является субъектом с заболеванием, нарушением и/или состоянием, при котором клеточная терапия, например, терапия, при которой композиция, содержащая клетку, описанную в данном документе, вводится субъекту, обеспечивает лечение по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием, нарушением и/или состоянием. В некоторых вариантах осуществления нуждающийся в клеточной терапии субъект включает без ограничения кандидата на трансплантацию костного мозга или стволовых клеток, субъекта, получавшего химиотерапию или лучевую терапию, субъекта, у которого имеется рак, например, рак кроветворной системы, или есть риск его развития, субъекта, у которого имеется опухоль, например, солидная опухоль, или есть риск ее развития, и/или субъекта, у которого имеются вирусная инфекция или заболевание, ассоциированное с вирусной инфекцией, или есть риск их развития.

Фармацевтические композиции

[0754] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие одну или несколько генетически модифицированных или

сконструированных клеток, описанных в данном документе, например, генетически модифицированную iNK-клетку, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит выделенные клетки гемопоэтической линии дифференцировки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, содержащие по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC, например, генетически модифицированных (например, подвергнутых редактированию) Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит выделенные клетки гемопоэтической линии дифференцировки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, содержащие от приблизительно 95% до приблизительно 100% Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC, например, генетически модифицированных (например, подвергнутых редактированию) Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC.

[0755] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит выделенную популяцию клеток гемопоэтической линии дифференцировки, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, где выделенная популяция содержит менее чем приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC, например, генетически модифицированных (например, подвергнутых редактированию) Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC. В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция клеток гемопоэтической линии дифференцировки, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, содержит более чем приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC, например, генетически модифицированных (например, подвергнутых редактированию) Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC. В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция клеток гемопоэтической линии дифференцировки, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, содержит от приблизительно 0,1% до приблизительно 1%, от приблизительно 1% до приблизительно 3%, от приблизительно 3% до приблизительно 5%, приблизительно 10%-15%, приблизительно 15%-20%, приблизительно 20%-25%, приблизительно 25%-30%, приблизительно 30%-35%, приблизительно 35%-40%, приблизительно 40%-45%, приблизительно 45%-50%, приблизительно 60%-70%, приблизительно 70%-80%, приблизительно 80%-90%, приблизительно 90%-95% или от приблизительно 95% до приблизительно 100% Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC, например, генетически модифицированных (например, подвергнутых редактированию) Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC.

[0756] В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция клеток гемопоэтической линии дифференцировки, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, содержит приблизительно 0,1%, приблизительно 1%, приблизительно 3%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC, например, генетически модифицированных (например, подвергнутых редактированию) Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, CD34+ клеток HE или HSC.

[0757] Как будет понятно среднему специалисту в данной области, в формах адоптивной клеточной терапии можно использовать как аутологичные, так и аллогенные клетки. Формы аутологичной клеточной терапии, как правило, характеризуются сниженным инфицированием, низкой вероятностью GVHD и быстрым восстановлением иммунитета по сравнению с другими формами клеточной терапии. Формы аллогенной клеточной терапии, как правило, характеризуются иммуноопосредованной реакцией "трансплантат против злокачественного новообразования" (GVM) и низкой частотой рецидивов по сравнению с другими формами клеточной терапии. Исходя из конкретного(конкретных) состояния(состояний) субъектов, нуждающихся в клеточной терапии, средний специалист в данной области сможет определить, какой конкретный тип терапии применять.

[0758] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит клетки гемопоэтической линии дифференцировки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, которые являются аллогенными для субъекта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит клетки гемопоэтической линии дифференцировки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, которые являются аутологичными для субъекта. Для аутологичной трансплантации выделенная популяция клеток гемопоэтической линии дифференцировки, полученных из плюрипотентных стволовых клеток, может быть полностью или частично совместимой по HLA с субъектом, получающим лечение. В некоторых вариантах осуществления клетки гемопоэтической линии дифференцировки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, не являются совместимыми по HLA с субъектом.

[0759] В некоторых вариантах осуществления клетки гемопоэтической линии дифференцировки, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток, можно вводить субъекту без размножения ex vivo или in vitro перед введением. В конкретных вариантах осуществления выделенную популяцию производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки модулируют и обрабатывают ex vivo с использованием одного или нескольких средств с получением иммунных клеток с улучшенным терапевтическим потенциалом. В некоторых вариантах осуществления модулированную популяцию производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки можно промыть для удаления средства(средств) обработки, и улучшенную популяцию можно вводить субъекту без дополнительного размножения популяции in vitro. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки размножают перед модулированием выделенной популяции с помощью одного или нескольких средств.

[0760] В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция производных клеток гемопоэтической линии дифференцировки может быть генетически модифицирована в соответствии со способами по настоящему изобретению для экспрессии рекомбинантного TCR, CAR или другого представляющего интерес продукта гена. В случае со сконструированными с помощью методов генной инженерии производными клетками гемопоэтической линии дифференцировки, которые экспрессируют рекомбинантный TCR или CAR, до либо после генетической модификации клеток клетки можно активировать и размножать с применением способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041 и в публикации заявки на патент США № 20060121005.

Формы рака

[0761] Любую форму рака можно лечить с применением клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе. Иллюстративные терапевтические мишени согласно

настоящему изобретению включают раковые клетки из мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, ободочной кишки, пищевода, глаза, желудочно-кишечной системы, десны, головы, почки, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичника, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка или матки. Кроме того, рак может в частности относиться к следующим неограничивающим гистологическим типам: злокачественное новообразование; карцинома; недифференцированная карцинома; гигантоклеточная карцинома и веретеноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базальноклеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходноклеточная карцинома; папиллярная переходноклеточная карцинома; аденокарцинома; злокачественная гастринома; холангиокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; комбинированная гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденоидная кистозная карцинома; аденокарцинома при аденоматозном полипе; аденокарцинома при семейном коли-полипозе; солидная карцинома; злокачественная карциноидная опухоль; бронхиолоальвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; гранулярноклеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярно-фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулирующая склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; карцинома эндометрия; карцинома придатков кожи; апокринная аденокарцинома; аденокарцинома сальной железы; церуминозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидноклеточная карцинома; инфильтративная протоковая карцинома; медуллярная карцинома; лобулярная карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Педжета молочной железы; ацинарноклеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; злокачественная тимома; злокачественная опухоль стромы яичника; злокачественная текома; злокачественная гранулезноклеточная опухоль; злокачественная андробластома; карцинома из клеток Сертоли; злокачественная опухоль из клеток Лейдига; злокачественная липидоклеточная опухоль; злокачественная параганглиома; злокачественная параганглиома вне молочной железы; феохромоцитома; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; поверхностно распространяющаяся меланома; злокачественная меланома при гигантском пигментном невусе; меланома из эпителиоидных клеток; злокачественный голубой невус; саркома; фибросаркома; злокачественная фиброзная гистиоцитома; миксосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; злокачественная смешанная опухоль; смешанная опухоль Мюллера; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; злокачественная мезенхимома; злокачественная опухоль Бреннера; злокачественная филлоидная опухоль; синовиальная саркома; злокачественная мезотелиома; дисгерминома; эмбриональная карцинома; злокачественная тератома; злокачественная струма яичника; хориокарцинома; злокачественная мезонефрома; гемангиосаркома; злокачественная гемангиоэндотелиома; саркома Капоши; злокачественная гемангиоперицитома; лимфангиосаркома; остеосаркома; юкстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; злокачественная хондробластома; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; злокачественная одонтогенная опухоль; амелобластная одонтосаркома; злокачественная амелобластома; амелобластная фибросаркома; злокачественная пинеалома; хордома; злокачественная глиома; эпендимома; астроцитома; протоплазматическая астроцитома; фибриллярная астроцитома;

астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль; саркома мозжечка; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; ольфакторная нейрогенная опухоль; злокачественная менингиома; нейрофибросаркома; злокачественная неврилеммома; злокачественная гранулярноклеточная опухоль; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; лимфома Ходжкина; парагранулема; мелкоклеточная лимфоцитарная злокачественная лимфома; крупноклеточная диффузная злокачественная лимфома; фолликулярная злокачественная лимфома; грибовидный микоз; другие уточненные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; саркома из тучных клеток; иммунопролиферативное заболевание тонкой кишки; лейкоз; лимфолейкоз; плазмоклеточный лейкоз; эритролейкоз; лейкоз из клеток лимфосаркомы; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; лейкоз из тучных клеток; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома и волосатоклеточный лейкоз.

[0762] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак ободочной кишки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой RCC. В другом варианте осуществления рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

[0763] В некоторых вариантах осуществления показания солидного рака, которые можно лечить с помощью клеток, описанных в данном документе (например, клеток, модифицированных с применением способов согласно настоящему изобретению, например, генетически модифицированных iNK-клеток), отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами лечения рака, включают рак мочевого пузыря, гепатоцеллюлярную карциному, рак предстательной железы, рак яичника/матки, рак поджелудочной железы, мезотелиому, меланому, глиобластому, HPV-ассоциированные и/или HPV-положительные формы рака, такие как рак шейки матки и HPV+ рак головы и шеи, рак полости рта, рак глотки, рак щитовидной железы, рак желчного пузыря и формы саркомы мягких тканей. В некоторых вариантах осуществления показания гематологического рака, которые можно лечить с помощью клеток, описанных в данном документе (например, клеток, модифицированных с применением способов согласно настоящему изобретению, например, генетически модифицированных iNK-клеток), отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами лечения рака, включают: ALL, CLL, NHL, DLBCL, AML, CML и множественную миелому (MM).

[0764] В некоторых вариантах осуществления примеры пролиферативных нарушений и/или нарушений дифференцировки клеток легкого, которые можно лечить с помощью клеток, описанных в данном документе (например, клеток, модифицированных с применением способов согласно настоящему изобретению), включают без ограничения опухоли, такие как бронхогенная карцинома, в том числе формы паранеопластического синдрома, бронхиолоальвеолярная карцинома, нейроэндокринные опухоли, такие как бронхиальный карциноид, прочие опухоли, метастатические опухоли и плевральные опухоли, в том числе солитарные фиброзные опухоли (плевральную фиброму) и злокачественную мезотелиому.

[0765] В некоторых вариантах осуществления примеры пролиферативных нарушений и/или нарушений дифференцировки клеток молочной железы, которые можно лечить с помощью клеток, описанных в данном документе (например, клеток, модифицированных с применением способов согласно настоящему изобретению), включают без ограничения пролиферативное заболевание молочной железы, в том числе, например, эпителиальную гиперплазию, склерозирующий аденоз и папилломы малых протоков;

опухоли, например, стромальные опухоли, такие как фиброаденома, филлоидная опухоль и саркомы, и эпителиальные опухоли, такие как папиллома крупных протоков; карциному молочной железы, в том числе карциному in situ (неинвазивную), которая включает протоковую карциному in situ (включая болезнь Педжета) и лобулярную карциному in situ, а также инвазивную (инфильтративную) карциному, в том числе без ограничения инвазивную протоковую карциному, инвазивную лобулярную карциному, медуллярную карциному, коллоидную (муцинозную) карциному, канальцевую карциному и инвазивную папиллярную карциному, а также прочие злокачественные новообразования. Нарушения в молочной железе мужского организма включают без ограничения гинекомастию и карциному.

[0766] В некоторых вариантах осуществления примеры пролиферативных нарушений и/или нарушений дифференцировки клеток, затрагивающих ободочную кишку, которые можно лечить с помощью клеток, описанных в данном документе (например, клеток, модифицированных с применением способов согласно настоящему изобретению), включают без ограничения опухоли ободочной кишки, такие как неопухолевые полипы, аденомы, семейные синдромы, колоректальный канцерогенез, колоректальную карциному и карциноидные опухоли.

[0767] В некоторых вариантах осуществления примеры форм рака или неопластических состояний, в дополнение к описанным выше, которые можно лечить с помощью клеток, описанных в данном документе (например, клеток, модифицированных с применением способов согласно настоящему изобретению), включают без ограничения фибросаркому, миосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак желудка, рак пищевода, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, рак матки, рак головы и шеи, рак кожи, рак головного мозга, плоскоклеточный рак, карциному сальной железы, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак яичка, мелкоклеточную карциному легкого, немелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, акустическую невриному, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластому, ретинобластому, лейкоз, лимфому или саркому Капоши.

[0768] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе (например, клетки, модифицированные с применением способов согласно настоящему изобретению), применяют в комбинации с одним или несколькими средствами лечения рака. В некоторых вариантах осуществления другие средства лечения рака включают без ограничения: химиотерапевтические средства, включая алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид CYTOXAN®; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилолмеламин; ацетогенины (в частности буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин;

каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, циклофосфамид, эстрамустин, ифосфанид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как ендииновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности калихеамицин гамма-1I и калихеамицин омега-I1 (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 1994; 33:183-186); динемицин, включая динемицин A; эсперамицин; а также хромофор неокарциностатина и родственные хромофоры хромопротеиновых ендииновых антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая ADRIAMYCIN®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, инъекционный липосомальный доксорубицин-HCl (DOXIL®) и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолона, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функцию надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; добавки для восполнения дефицита фолиевой кислоты, такие как фолиновая кислота; ацеглатон, гликозид альдофосфамида; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, Орегон, США); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности токсин T-2, верракурин A, роридин A и ангуидин); уретан; виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепу; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL®), состав на основе паклитаксела со сконструированными наночастицами альбумина (ABRAXANE™) и доцетаксел (TAXOTERE®); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатин; лейковорин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; циклоспорин, сиролимус, рапамицин, рапалоги, ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; CHOP, что сокращенно означает комбинированную терапию

циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, что сокращенно означает режим лечения оксалиплатином (ELOXATIN™) в комбинации с 5-FU, лейковорином; антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), в том числе, например, тамоксифен (включая тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен (EVISTA®), дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (FARESTON®); антипрогестероны; средства, снижающие количество эстрогеновых рецепторов (ERD); антагонисты эстрогеновых рецепторов, такие как фулвестрант (FASLODEX®); средства, действующие для подавления или остановки функции яичников, например, агонисты гормона, высвобождающего лютеинизирующий гормон (LHRH), такие как ацетат лейпролида (LUPRON® и ELIGARD®), ацетат гозерелина, ацетат бусерелина и триптерелин; другие антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулирующий выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглютетимид, ацетат мегестрола (MEGASE®), экземестан (AROMASIN®), форместат, фадрозол, ворозол (RIVISOR®), летрозол (FEMARA®) и анастрозол (ARIMIDEX®); бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) или ризедронат (ACTONEL®); троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог нуклеозида цитозина); аптамеры, описанные, например, в патенте США № 6344321, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте; моноклональные антитела к HGF (например, AV299 от Aveo, AMG102 от Amgen); усеченные варианты mTOR (например, CGEN241 от Compugen); ингибиторы протеинкиназ, которые блокируют сигнальные пути, индуцированные mTOR (например, ARQ197 от Arqule, XL880 от Exelexis, SGX523 от SGX Pharmaceuticals, MP470 от Supergen, PF2341066 от Pfizer); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины для генной терапии, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN®); rmRH (например, ABARELIX®); дитозилат лапатиниба (низкомолекулярный двойной ингибитор тирозинкиназ ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016); ингибиторы COX-2, такие как целекоксиб (CELEBREX®; 4-(5-(4-метилфенил)-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил) бензолсульфонамид; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных.

[0769] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе (например, клетки, модифицированные с применением способов согласно настоящему изобретению), применяют в комбинации с одним или несколькими средствами лечения рака, которые содействуют индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см., например, Janeway's Immunobiology, K. Murphy and C. Weaver). В некоторых вариантах осуществления такое средство лечения рака представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления такое антитело представляет собой трастузумаб. В некоторых вариантах осуществления такое антитело представляет собой ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления такое антитело представляет собой ритуксимаб, паливизумаб, инфликсимаб, трастузумаб, алемтузумаб, адалимумаб, ибритумомаб тиуксетан, омализумаб, цетуксимаб, бевацизумаб, натализумаб, панитумумаб, ранибизумаб, цертолизумаб пегол, устекинумаб, канакинумаб, голимумаб, офатумумаб, тоцилизумаб, деносумаб, белимумаб, ипилимумаб, брентуксимаб ведотин, пертузумаб, трастузумаб эмтанзин, обинутузумаб, силтуксимаб, рамуцирумаб, ведолизумаб, блинатумомаб, ниволумаб, пембролизумаб, идаруцизумаб, нецитумумаб, динутуксимаб, секукинумаб, меполизумаб, алирокумаб, эволокумаб, даратумумаб, элотузумаб, иксекизумаб, реслизумаб, оларатумаб, безлотоксумаб, атезолизумаб,

обилтоксаксимаб, инотузумаб озогамицин, бродалумаб, гуселькумаб, дупилумаб, сарилумаб, авелумаб, окрелизумаб, эмицизумаб, бенрализумаб, гемтузумаб озогамицин, дурвалумаб, буросумаб, ланаделумаб, могамулизумаб, эренумаб, галканезумаб, тилдракизумаб, цемиплимаб, эмапалумаб, фреманизумаб, ибализумаб, моксетумомаб пасудодокс, равулизумаб, ромосозумаб, рисанкизумаб, полатузумаб ведотин, бролуцизумаб или любую их комбинацию (см., например, Lu et al., Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science,* 2020). В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе (например, клетки, модифицированные с применением способов согласно настоящему изобретению), применяют в комбинации с одним или несколькими средствами лечения рака, которые содействуют индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), где средство лечения рака представляет собой антитело или его соответствующий фрагмент, нацеленные на CD20, TNFα, HER2, CD52, IgE, EGFR, VEGF-A, ITGA4, CTLA-4, CD30, VEGFR2, интегрин α4β7, CD19, CD3, PD-1, GD2, CD38, SLAMF7, PDGFRα, PD-L1, CD22, CD33, IFNγ, CD79β или любую их комбинацию.

[0770] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, используются в комбинации с ингибиторами контрольных точек. Примеры подходящих ингибиторов контрольных точек для комбинированной терапии включают без ограничения антагонисты PD-1 (Pdcdl, CD279), PDL-l (CD274), TIM-3 (Havcr2), TIGIT (WUCAM и Vstm3), LAG-3 (Lag3, CD223), CTLA-4 (Ctla4, CD152), 2B4 (CD244), 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), A2aR, BATE, BTLA, CD39 (Entpdl), CD47, CD73 (NT5E), CD94, CD96, CD160, CD200, CD200R, CD274, CEACAM1, CSF-1R, Foxpl, GARP, HVEM, IDO, EDO, TDO, LAIR-l, MICA/B, NR4A2, MAFB, OCT-2 (Pou2f2), альфа-рецептора ретиноевой кислоты (Rara), TLR3, VISTA, NKG2A/HLA-E, ингибирующего KIR (например, 2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1 и 3DL2) или любую их подходящую комбинацию.

[0771] В некоторых вариантах осуществления антагонист, ингибирующий любую из вышеуказанных молекул контрольных точек, представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитела, ингибирующие контрольные точки, могут представлять собой мышиные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, верблюжье Ig, антитело акулы, состоящее только из тяжелых цепей (VNAR), Ig NAR, химерные антитела, рекомбинантные антитела или фрагменты этих антител. Неограничивающие примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab)'2, F(ab)'3, Fv, одноцепочечные антигенсвязывающие фрагменты (scFv), (scFv)2, Fv, стабилизированный дисульфидными связями (dsFv), миниантитело, диатело, триатело, тетратело, однодоменные антигенсвязывающие фрагменты (sdAb, нанотело), рекомбинантное антитело, состоящее только из тяжелых цепей (VHH), и другие фрагменты антител, которые сохраняют специфичность связывания целого антитела, которые могут быть более экономически выгодными с точки зрения производства, более простыми в применении или более чувствительными, чем целое антитело. В некоторых вариантах осуществления один, или два, или три, или больше ингибиторов контрольных точек включают по меньшей мере одно из атезолизумаба (mAb к PDL1), авелумаба (mAb к PDL1), дурвалумаба (mAb к PDL1), тремелимумаба (mAb к PDL1), ипилимумаба (mAb к CTLA4), IPH4102 (антитела к KIR), IPH43 (антитела к MICA), IPH33 (антитела к TLR3), лиримумаба (антитела к KIR), монализумаба (антитела к NKG2A), ниволумаба (mAb к PD1), пембролизумаба (mAb к PD1) и любых их производных, функциональных эквивалентов или биоаналогов.

[0772] В некоторых вариантах осуществления в основе антагониста, ингибирующего любую из вышеуказанных молекул контрольных точек, лежит микроРНК, поскольку было обнаружено, что многие микроРНК действуют в качестве регуляторов, которые контролируют экспрессию контрольных точек

иммунного ответа (Dragomir et al , Cancer Biol Med. 2018, 15(2): 103-115). В некоторых вариантах осуществления антагонистические микроРНК для контрольных точек включают без ограничения miR-28, miR-15/16, miR-138, miR-342, miR-20b, miR-21, miR-130b, miR-34a, miR-197, miR-200c, miR-200, miR-17-5p, miR-570, miR-424, miR-155, miR-574-3p, miR-513, miR-29c и/или любую их подходящую комбинацию.

[0773] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе (например, клетки, модифицированные с применением способов согласно настоящему изобретению), применяют в комбинации с одним или несколькими средствами лечения рака, такими как вводимая доза экзогенного интерлейкина (IL). В некоторых вариантах осуществления экзогенный IL, предоставляемый пациенту, представляет собой IL-15. В некоторых вариантах осуществления системная доза IL-15 при применении в комбинации с клетками, описанными в данном документе, является сниженной по сравнению со стандартными концентрациями доз (см., например, Waldmann et al., IL-15 in the Combination Immunotherapy of Cancer. *Front. Immunology,* 2020).

[0774] Другие соединения, которые являются эффективными в лечении рака, известны из уровня техники и описаны в данном документе, и те, которые подходят для применения с композициями и способами по настоящему изобретению в качестве дополнительных средств лечения рака, описаны, например, в "Physicians' Desk Reference, 62nd edition. Oradell, N.J.: Medical Economics Co., 2008", Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eleventh Edition. McGraw-Hill, 2005", "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, Md.: Lippincott Williams & Wilkins, 2000," и "The Merck Index, Fourteenth Edition. Whitehouse Station, N.J.: Merck Research Laboratories, 2006", включенных в данный документ посредством ссылки на соответствующие части.

[0775] Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном документе выше либо ниже, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0776] По всему настоящему описанию, если контекст не требует иного, слова "содержать", "содержит" и "содержащий" будут подразумевать включение указанных стадии или элемента или группы стадий или элементов, но не исключение любых других стадии или элемента или группы стадий или элементов. Термин "состоящий из" подразумевается как включающий все и ограниченный всем, что следует за фразой "состоящий из". Таким образом, фраза "состоящий из" указывает на то, что перечисленные элементы являются требуемыми или обязательными, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Термин "состоящий по существу из" подразумевается как включающий любые элементы, перечисленные после этой фразы, и ограниченный другими элементами, которые не мешают или не способствуют активности или действию, указанным в настоящем раскрытии для перечисленных элементов. Таким образом, фраза "состоящий по существу из" указывает на то, что перечисленные элементы являются требуемыми или обязательными, но другие элементы не являются обязательными и могут присутствовать или могут не присутствовать в зависимости от того, влияют ли они на активность или действие перечисленных элементов.

[0777] Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления с учетом вышеприведенного подробного описания. В целом, в нижеследующей формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в настоящем изобретении и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые

такие пункты формулы изобретения распространяются. Соответственно, формула изобретения не ограничивается настоящим раскрытием.

[0778] Различные варианты осуществления, описанные выше, могут использоваться в комбинации для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, иностранные патенты, иностранные заявки на патенты и непатентные публикации, упомянутые в настоящем изобретении и/или перечисленные в информационном листке заявки, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Содержание записей базы данных, например, записей базы данных нуклеотидов или белков NCBI, приведенных в данном документе, включено в данный документ во всей своей полноте. В случае, если записи в базе данных подлежат изменению с течением времени, то их содержание по состоянию на дату подачи настоящей заявки включено в данный документ посредством ссылки. Аспекты вариантов осуществления могут быть изменены, если необходимо использовать идеи различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения еще нескольких дополнительных вариантов осуществления.

[0779] Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами. Примеры приведены только в иллюстративных целях. Их никоим образом не следует толковать как ограничивающие объем или содержание настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Скрининг направляющих РНК для *GAPDH*

[0780] В этом примере описывается скрининг направляющих РНК AsCpf1 (AsCas12a), которые нацелены на ген "домашнего хозяйства" *GAPDH*. *GAPDH* кодирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу — важный белок, который катализирует окислительное фосфорилирование глицеральдегид-3-фосфата в присутствии неорганического фосфата и никотинамидадениндинуклеотида (NAD), что является важной энергетической стадией углеводного обмена. Все направляющие РНК, использованные в этом анализе, представляли собой 41-мерные молекулы РНК, характеризующиеся следующей конструкцией: 5'-UAAUUUCUACUCUUGUAGAU-[21-мерная последовательность нацеливающего домена]-3' (SEQ ID NO: 90). Например, направляющая РНК, обозначенная как RSQ22337, имела следующую последовательность: 5′-UAAUUUCUACUCUUGUAGAUAUCUUCUAGGUAUGACAACGA-3′ (SEQ ID NO: 93), где 21-мерная последовательность нацеливающего домена подчеркнута. Направляющие РНК с последовательностями нацеливающего домена, показанными в таблице 7, тестировали для определения того, насколько они эффективны при редактировании *GAPDH*. RNP с Cas12a (RNP, содержащие сконструированный Cas12a (SEQ ID NO: 62)), содержащие каждую из этих направляющих РНК, трансфицировали в iPSC, а затем через три дня после трансфекции определяли уровни редактирования (см., например, Wong, K.G. et al. CryoPause: A New Method to Immediately Initiate Experiments after Cryopreservation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 9, 355-365 (2017)). Результаты представлены на фиг. 1 и фиг. 2. RSQ24570, RSQ24582, RSQ24589, RSQ24585 и RSQ22337 продемонстрировали самые высокие уровни измеримого редактирования из протестированных направляющих *GAPDH*, осуществляя редактирование в примерно 70% или больше клеток (приблизительно 92%, 89%, 88%, 87% и 70% соответственно). Наблюдали, что клетки, трансфицированные gRNA, нацеленными на определенные экзонные области, давали на выходе гораздо меньшее количество изолируемой геномной ДНК (gDNA) для анализа эффективности редактирования (в

день 3 день после трансфекции) по сравнению с клетками, трансфицированными gDNA, нацеленными на интронные области, что указывает на то, что RNP с определенными gDNA, нацеленными на экзоны, были цитотоксичными для клеток. Это позволяет предположить, что клетки, подвергнутые редактированию с использованием gRNA, нацеленных на экзонные области, могут привести к значительной гибели клеток вследствие введения вставок/делеций в GAPDH, что приводит к экспрессии нефункционального белка GAPDH или белка с недостаточной функцией. Высказали предположение, что можно использовать спасающую плазмиду для репарации сайта gRNA-опосредованного расщепления в GAPDH, и в то же время подвергать нокину представляющий интерес генный груз в рамке считывания с репарированным GAPDH посредством HDR, тем самым спасая те клетки, в которых GAPDH был подвергнут репарации и представляющий интерес груз успешно интегрирован (как показано на фиг. 1 и фиг. 2). Те трансфицированные клетки, которые подвергаются редактированию (большинство трансфицированных клеток, если используются высокоэффективные РНК-направляемые нуклеазы), но не подвергаются репарации GAPDH посредством HDR и в которые не интегрируется представляющий интерес груз, со временем погибают, так как они не имеют функционирующего гена GAPDH. Те клетки, которые несут представляющий интерес груз, будут иметь преимущество благодаря полностью функционирующему гену GAPDH по мере роста и деления клеток, и отбор будет происходить в пользу данных клеток с течением времени. Ожидаемым конечным результатом будет популяция клеток с очень высокой степенью нокина груза в пределах локуса GAPDH.

[0781] Данные на фиг. 2 свидетельствуют о том, что, хотя RNP Cas12a, содержащий RSQ22337, приводил к уровню редактирования, составляющему примерно 70%, через 3 дня после трансфекции, он вызывал несколько более высокие уровни токсичности, чем другие направляющие для экзонов (RSQ24570, RSQ24582, RSQ24589 и RSQ24585) (см. фиг. 2, только приблизительно 3,9 нг/мкл gDNA было выделено из подвергнутых редактированию клеток). Таким образом, фактическая эффективность редактирования, скорее всего, была значительно выше 70%, поскольку многие клетки уже погибли через 3 дня после трансфекции из-за отсутствия доступных спасающих конструкций и из-за NHEJ, образующего токсичные вставки/делеции. В результате для дальнейшего тестирования выбирали RSQ22337.

Таблица 7. Последовательности направляющих РНК

SEQ ID NO:	Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)	Местоположение
94	RSQ22336	UGAGCCAGCCACCAGAGGGCG	Интрон 8
95	RSQ22337	AUCUUCUAGGUAUGACAACGA	Интрон 8/экзон 9 (сайт разреза в экзоне 9)
96	RSQ22338	GCUACAGCAACAGGGUGGUGG	Экзон 9
97	RSQ24559	CCAUAAUUUCCUUUCAAGGUG	Интрон 7
98	RSQ24560	CUUUCAAGGUGGGGAGGGAGG	Интрон 7
99	RSQ24561	AAGGUGGGGAGGGAGGUAGAG	Интрон 7
100	RSQ24562	GCAGACCACAGUCCAUGCCAU	Экзон 8
101	RSQ24563	CAGACCACAGUCCAUGCCAUC	Экзон 8
102	RSQ24564	CCGGAGGGGCCAUCCACAGUC	Экзон 8
103	RSQ24565	UAGACGGCAGGUCAGGUCCAC	Экзон 8

SEQ ID NO:	Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)	Местоположение
104	RSQ24566	CUAGACGGCAGGUCAGGUCCA	Экзон 8
105	RSQ24567	UCUAGACGGCAGGUCAGGUCC	Экзон 8
106	RSQ24568	GCAGGUUUUUCUAGACGGCAG	Экзон 8
107	RSQ24569	UCAAGCUCAUUUCCUGGUAUG	Экзон 8
108	RSQ24570	CUGGUAUGUGGCUGGGGCCAG	Экзон 8/интрон 8 (сайт разреза в интроне 8)
109	RSQ24571	AGAGCCAGUCUCUGGCCCCAG	Интрон 8
110	RSQ24572	AAGAGCCAGUCUCUGGCCCCA	Интрон 8
111	RSQ24573	UAAGAGCCAGUCUCUGGCCCC	Интрон 8
112	RSQ24574	CUGAGCCAGCCACCAGAGGGC	Интрон 8
113	RSQ24575	UCUGAGCCAGCCACCAGAGGG	Интрон 8
114	RSQ24576	CAUCUUCUAGGUAUGACAACG	Экзон 9
115	RSQ24578	UUGAUGGUACAUGACAAGGUG	1 т. о._ниже
116	RSQ24579	GAGGCCCUACCCUCAGUCUGA	1 т. о._ниже
117	RSQ24580	CCUCUCCUCGCUCCAGUCCUA	1 т. о._ниже
118	RSQ24581	CUCUCCUCGCUCCAGUCCUAG	1 т. о._ниже
119	RSQ24582	GCCAACAGCAGAUAGCCUAGG	1 т. о._ниже
120	RSQ24583	UGUGCCCUCGUGUCUUAUCUG	1 т. о._ниже
121	RSQ24584	CCUAGAUGAAUCCUGCUUGAA	1 т. о._ниже
122	RSQ24585	GGUACUUGGUUUACCUAGAUG	1 т. о._ниже
123	RSQ24586	AGGUACUUGGUUUACCUAGAU	1 т. о._ниже
124	RSQ24587	AAACAUUAUAUAGUCCUUACC	1 т. о._ниже
125	RSQ24588	UAAACAUUAUAUAGUCCUUAC	1 т. о._ниже
126	RSQ24589	CCGAUUUUUAAACAUUAUAUA	1 т. о._ниже
127	RSQ24590	ACCGAUUUUUAAACAUUAUAU	1 т. о._ниже
128	RSQ24591	UACCGAUUUUUAAACAUUAUA	1 т. о._ниже
129	RSQ24592	AAAAUCGGUAAAAAUGCCCAC	1 т. о._ниже
130	RSQ24593	GAGGAAGAUGAACUGAGAUGU	1 т. о._ниже
131	RSQ24594	AGGAAGAUGAACUGAGAUGUG	1 т. о._ниже

Пример 2. Спасение от нокаута *GAPDH* путем целенаправленной интеграции

[0782] Для проверки работоспособности иллюстративной системы отбора, показанной на фиг. 3A, 3B и 3C, осуществляли нацеливание на существенный ген *GAPDH* в iPSC с использованием RNP, содержащего AsCpf1 (SEQ ID NO: 62) и направляющей РНК (RSQ22337) (SEQ ID NO: 95), что привело к двухнитевому разрыву в направлении 5′-конца последнего экзона *GAPDH* (экзона 9). Хотя iPSC тестировали для целей данного эксперимента, описанные способы могут быть применены к другим типам клеток. RSQ22337 определяли как высокоспецифичную в отношении *GAPDH* и имеющую минимальное количество нецелевых сайтов в геноме (данные не показаны). Таким образом, *GAPDH* считали хорошим

иллюстративным кандидатным геном-мишенью для описанных в данном документе способов интеграции груза и отбора, по меньшей мере частично потому, что существовала по меньшей мере одна высокоспецифичная gRNA, нацеленная на концевой экзон, способная опосредовать высокоэффективное РНК-направляемое расщепление.

[0783] Нуклеазу CRISPR/Cas и направляющую РНК вводили в клетки путем нуклеофекции (электропорации) рибонуклеопротеина (RNP) в соответствии с известными способами. Клетки также приводили в контакт с двухнитевой донорной ДНК-матрицей (например, dsDNA-плазмидой), которая содержала нокин-кассету, содержащую в направлении 5′-3′ 5′-плечо гомологии длиной приблизительно 500 п. о. (содержащее часть экзона 8, интрон 8 и кодон-оптимизированную кодирующую 5′-часть экзона 9, оптимизированную для предотвращения дополнительного связывания последовательности нацеливающего домена gRNA направляющей РНК (RSQ22337)), находящуюся в рамке считывания последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид P2A ("P2A"), находящуюся в рамке считывания кодирующую последовательность CD47 ("груз"), стоп-кодон и последовательность поли(A)-сигнала, а также 3′-плечо гомологии длиной приблизительно 500 п. о. (содержащее кодирующую часть экзона 9, в том числе стоп-кодон, 3′-экзонную область экзона 9 и часть нижерасположенной межгенной последовательности) (как показано на фигуре 3B). 5'- и 3'-плечи гомологии, фланкирующие нокин-кассету, конструировали так, чтобы они соответствовали последовательностям, окружающим сайт расщепления RNP.

[0784] Как схематически показано на фиг. 3C, NHEJ-опосредованное создание вставок/делеций в клетках, которые редактируются посредством ДНК-нуклеазы, но на которые не нацеливается успешно донорная ДНК-матрица, приводит к образованию нефункциональной версии *GAPDH*, которая является смертельной для клеток. "Спасение" от этого нокаута происходит в клетках, на которые успешно нацеливается донорная ДНК-матрица, путем правильной интеграции нокин-кассеты, которая восстанавливает кодирующую область *GAPDH*, так что продуцируется функционирующий продукт гена, и располагает последовательность P2A-груз в рамке считывания с кодирующей последовательностью *GAPDH* и ниже нее (с 3'-стороны от нее). Эти клетки выживают и продолжают пролиферировать. Клетки, которые не подвергаются редактированию ДНК-нуклеазой, также продолжают пролиферировать, но ожидается, что они будут составлять очень небольшой процент от общей популяции клеток, если, как в этом случае, эффективность редактирования нуклеазой в комбинации с gRNA является высокой (см. пример 1) и приводит к образованию нефункционального белка. Результаты редактирования для RSQ22337, вероятно, недооценивают фактическую эффективность редактирования у направляющей молекулы из-за гибели клеток в популяции подвергнутых редактированию клеток.

[0785] Эффективность редактирования у RNP, содержащих RSQ22337, тестировали в различных концентрациях (4 мкМ, 1 мкМ, 0,25 мкМ или 0,0625 мкМ RNP в отсутствие двухнитевой донорной ДНК-матрицы) и впервые измеряли через 48 часов после нуклеофекции iPSC (момент времени перед гибелью клеток из-за потери функции гена *GAPDH*). Результаты показывают, что концентрация 4 мкМ привела к самым высоким уровням редактирования.

[0786] На фигурах 5 и 6 показано, что ген, кодирующий белок-груз, можно подвергнуть нокину в ген "домашнего хозяйства", такой как *GAPDH*, с высокой эффективностью с использованием описанных данном документе систем отбора. На фиг. 5 показана эффективность нокина (KI) "груза", кодирующего CD47, в *GAPDH* через 4 дня после электропорации, когда RNP присутствовал в концентрации 4 мкМ, и также присутствовала dsDNA-плазмида ("PLA"), кодирующая CD47. Эффективность нокина измеряли с

двумя различными концентрациями плазмиды (0,5 мкг и 2,5 мкг плазмиды), и обнаружили, что она зависит от дозы. Нокин измеряли с помощью ddPCR, нацеленной на 3'-концевое положение "груза", используемого для нокина. Контрольные клетки, подвергшиеся электропорации с использованием только RNP или только PLA, демонстрировали гораздо более низкие показатели нокина, чем показатели при электропорации с использованием RNP и PLA (в концентрации 2,5 мкг).

[0787] На фиг. 6 показана эффективность нокина "груза", кодирующего CD47, в *GAPDH* через 9 дней после электропорации клеток с использованием RNP и dsDNA-плазмиды, кодирующей CD47. Процент нокина был одинаковым, когда анализировали 5'-конец или 3'-конец груза посредством ddPCR с использованием праймера, специфичного в отношении 5'-конца сайта-мишени gRNA или 3'-конца сайта в области поли(A), что повышало достоверность результата. Эффективность нокина груза была значительно выше через 9 дней по сравнению с 4 днями после трансфекции (сравните фиг. 5 и 6), что согласуется с ожиданием существенной гибели клеток среди клеток с RNP-индуцированным нокаутом *GAPDH*, у которых отсутствовал функциональный ген *GAPDH* в результате неудачного нокина груза и спасения в *GAPDH*.

[0788] Затем проводили эксперимент для проверки механизма системы отбора, описанной выше, путем подтверждения того, что подвергнутые редактированию клетки, содержащие успешно подвергнутый нокину ген груза, будут более эффективно подвергаться отбору с использованием gRNA, нацеленной на кодирующую белок экзонную часть *GAPDH*, а не gRNA, нацеленной на интрон. На фиг. 13 сравнивается эффективность нокина у нокин-кассеты, содержащей "груз", кодирующий GFP, в локусе GAPDH при использовании gRNA, которая опосредует расщепление в пределах интрона (RSQ24570 (SEQ ID NO: 108) связывается с участком соединения экзон 8-интрон 9, что приводит к Cas12a-опосредованному расщеплению в пределах интрона 8) по сравнению с gRNA, специфичной в отношении экзона (RSQ22337 (SEQ ID NO: 95), нацеленной на участок соединения интрон 8-экзон 9, что приводит к Cas12a-опосредованному расщеплению в пределах экзона 9). Спасающую dsDNA-плазмиду PLA1593, содержащую репортерный "груз" GFP, подвергали нуклеофекции в iPSC с использованием RNP (Cas12a и RSQ22337), нацеленного на *GAPDH*, как описано выше, тогда как dsDNA-плазмиду PLA1651, содержащую последовательность донорной матрицы, показанную под SEQ ID NO: 46, подвергали нуклеофекции с использованием RNP, содержащего Cas12a и RSQ24570. Плечи гомологии каждой плазмиды разрабатывали для опосредования HDR на основе сайта-мишени каждой gRNA. Нокин визуализировали с помощью микроскопии (фиг. 13A) и измеряли с помощью проточной цитометрии (фиг. 13B). Эффективность нокина была значительно выше при использовании gRNA и ассоциированной нокин-кассеты, которая расщепляет экзонную кодирующую область (экзон 9), по сравнению с нокин-кассетой, которая расщепляет интронную область (интрон 8). На фиг. 13B показано, что 95,6% клеток, которые подверглись электропорации с использованием RSQ22337 и нокин-кассеты, содержащей "груз", кодирующий GFP (например, PLA1593; содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 44), экспрессировали GFP по сравнению с только 2,1% клеток, которые подверглись электропорации с использованием RSQ24570 и нокин-кассеты, содержащей "груз", кодирующий GFP (PLA1651; содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 46). Результаты, представленные на фиг. 13, поразительны, поскольку измеренная эффективность редактирования (определяемая по частоте образования вставок/делеций через 72 часа после трансфекции, как обсуждалось выше в примере 1, см. фиг. 2) у RSQ24570 выше, чем у RSQ22337, и доля клеток, спасенных нокин-конструкцией, нацеленной на кодирующую экзонную область, значительно выше.

[0789] В дополнительной серии экспериментов iPS-клетки приводили в контакт с RNP, содержащим AsCas12a (SEQ ID NO: 62) и RSQ22337 (SEQ ID NO: 95) или RSQ24570 (SEQ ID NO: 108) вместе с плазмидой на основе двухнитевой донорной ДНК-матрицы PLA1593 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 44) либо PLA1651 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 46) соответственно, как описано выше. Проточную цитометрию проводили через 7 дней после нуклеофекции для выявления экспрессии GFP и для определения степени успешной интеграции опосредованной плазмидой донорной матрицы и нокин-кассеты в соответствующий сайт-мишень *GAPDH*. Результаты GAPDH на фиг. 17A показывают, что клетки, подвергнутые нуклеофекции с использованием RNP, содержащим RSQ22337, демонстрируют гораздо более высокую степень экспрессии GFP по сравнению с клетками, подвергнутыми нуклеофекции с использованием RSQ24750, демонстрируя, что большинство клеток экспрессируют GFP в день 7 после электропорации. Это позволяет предположить, что нокин-кассета, кодирующая GFP, демонстрирует высокие уровни успешной интеграции в клетки, трансфицированные с использованием RSQ22337. Клетки, нуклеофицированные с использованием RNP, содержащих RSQ24750, демонстрировали гораздо более низкую экспрессию GFP, что указывает на то, что нокин-кассета не интегрировалась успешно в большинство этих клеток (фиг. 17A). Результаты для *GAPDH* на фиг. 17B показывают, что использование RSQ22337 приводило к приблизительно 80% редактированию при измерении с использованием геномной ДНК через 48 часов после трансфекции RNP, тогда как RSQ24570 приводила к примерно 75% редактированию при измерении с использованием геномной ДНК через 48 часов после трансфекции RNP. Высокий уровень редактирования RSQ22337 хорошо коррелировал с высоким уровнем экспрессии GFP, показанным на фиг. 17A; однако высокий уровень редактирования RSQ24750 плохо коррелирует с низким уровнем экспрессии GFP, показанным на фиг. 17A. На фиг. 17C показана относительная интенсивность экспрессии интегрированного "груза" (GFP) в подвергнутых редактированию клетках. Наконец, проводили анализ ddPCR для определения процента событий интеграции нокина в аллелях *GAPDH* в клетках, подвергнутых нуклеофекции с использованием RNP, содержащих RSQ22337 и донорную плазмиду PLA1593. На фиг. 19 по данным ddPCR показано, что более 60% аллелей характеризовались успешным нокином кассеты, кодирующей GFP.

Пример 3. Спасение от нокаута *GAPDH* путем целенаправленной интеграции нескольких грузов

[0790] В некоторых случаях желательно использовать стратегии отбора и нокина груза, описанные в данном документе, для эффективного получения и выделения подвергнутой редактированию клетки, содержащей две или более различные экзогенные кодирующие последовательности, например, два или более различных экзогенных гена, интегрированных в один локус существенного гена, такой как, например, локус GAPDH. На фиг. 14 показаны две стратегии введения двух или более различных экзогенных кодирующих областей в локус существенного гена. На фиг. 14A показана первая иллюстративная стратегия, где полицистронная нокин-кассета, например бицистронная нокин-кассета, содержащая две или более кодирующие области (GFP и mCherry на фиг. 14A), разделенные линкерами (например, T2A, P2A и/или IRES, см. SEQ ID NO: 29-32 и 33-37), встраивается в один или оба аллеля существенного гена, например, GAPDH. На фиг. 14B показана вторая иллюстративная стратегия (стратегия биаллельной вставки), где две нокин-кассеты, содержащие разные последовательности грузов (например, разные экзогенные гены, такие как GFP и mCherry на фиг. 14B), встраиваются в отдельные аллели локуса существенного гена, например, GAPDH.

[0791] Проводили эксперименты для проверки стратегии интеграции, изображенной на фиг. 14A, и для определения того, может ли использование различных комбинаций линкеров в нокин-кассете влиять на экспрессию последовательностей грузов. RNP, содержащий Cas12a и RSQ22337 (нацеленную на локус GAPDH, как описано в примерах 1 и 2), подвергали нуклеофекции в iPSC с использованием одной из шести различных плазмид (PLA), содержащих бицистронную нокин-кассету, содержащую последовательности "грузов", кодирующие GFP и mCherry (PLA1573, PLA1574, PLA1575, PLA1582, PLA1583 и PLA1584, как показано на фиг. 15A; содержащие донорные матрицы под SEQ ID NO: 38-43). GFP был первым грузом, а mCherry был вторым грузом в каждой из этих конструкций. Каждая из протестированных плазмид содержала различные комбинации линкеров между кодирующими последовательностями (линкеры 1 и 2, как показано на фиг. 15A). PLA1573 (содержащая донорную матрицу под SEQ ID NO: 38) содержала T2A и T2A в качестве линкеров 1 и 2 соответственно; PLA1574 (содержащая донорную матрицу под SEQ ID NO: 39) содержала P2A и IRES в качестве линкеров 1 и 2 соответственно; PLA1575 (содержащая донорную матрицу под SEQ ID NO: 40) содержала P2A и P2A в качестве линкеров 1 и 2 соответственно; PLA1582 (содержащая донорную матрицу под SEQ ID NO: 41) содержала P2A и T2A в качестве линкеров 1 и 2 соответственно; PLA1583 (содержащая донорную матрицу под SEQ ID NO: 42) содержала T2A и P2A в качестве линкеров 1 и 2 соответственно; и PLA1584 (содержащая донорную матрицу под SEQ ID NO: 43) содержала T2A и IRES в качестве линкеров 1 и 2 соответственно. На фиг. 15B и фиг. 15C показаны результаты различных событий интеграции нокин-кассеты в локусе GAPDH. На фиг. 15B представлены иллюстративные полученные при помощи микроскопии изображения (светлопольная и флуоресцентная микроскопия при увеличении 2X на микроскопе Keyence) подвергнутых редактированию iPSC через девять дней после нуклеофекции с использованием иллюстративных плазмид PLA1582, PLA1583 и PLA1584, каждая из которых демонстрирует выявляемую экспрессию GFP и mCherry.

[0792] На фиг. 15C количественно представлены уровни флуоресценции GFP и mCherry в iPSC, подвергнутых нуклеофекции с использованием различных плазмид, описанных на фиг. 15A, содержащих бицистронные нокин-кассеты с различными описанными парами линкеров (PLA1575, PLA1582, PLA1574, PLA1583, PLA1573 и PLA1584). В каждой из этих бицистронных конструкций GFP всегда был первым грузом, а mCherry всегда был вторым грузом. Плазмиду, содержащую нокин-кассету с mCherry в качестве единственного "груза" (как показано на фиг. 15C), также тестировали в качестве контроля. Данные показывают, что уровни экспрессии GFP в качестве первого груза были сходными среди бицистронных конструкций и были неизменно выше, чем уровни экспрессии mCherry — второго груза. Клетки, содержащие контрольную нокин-кассету, содержащую mCherry в качестве единственного груза, демонстрировали самую высокую экспрессию mCherry, что позволяет предположить, что можно варьировать (например, уменьшать) экспрессию груза, помещая его в качестве второго груза в бицистронную кассету. Кроме того, на фиг. 15C показано, что размещение линкера IRES непосредственно перед второй последовательностью, кодирующей груз, приводило к более низкой экспрессии второго груза по сравнению с экспрессией при размещении линкера P2A или T2A перед второй последовательностью, кодирующей груз. Таким образом, результаты показывают, что можно по-разному модулировать (то есть увеличивать или уменьшать) экспрессию двух последовательностей, кодирующих груз, из полицистронной нокин-кассеты, изменяя порядок грузов в кассете (помещая груз в качестве первого груза для более высокого уровня экспрессии или в качестве второго груза для более низкого уровня экспрессии) и путем

размещения определенных линкеров (P2A или T2A для более высокого уровня экспрессии; IRES для более низкого уровня экспрессии) перед каждым из грузов.

[0793] Проводили эксперимент для тестирования стратегии биаллельной интеграции, изображенной на фиг. 14B. RNP, содержащий Cas12a и RSQ22337 (нацеленную на локус GAPDH, как описано в примерах 1 и 2), подвергали нуклеофекции в iPSC с помощью двух разных плазмид. Одна плазмида содержала нокин-кассету, содержащую кодирующую последовательность GFP в качестве груза, а вторая плазмида содержала нокин-кассету, содержащую кодирующую последовательность mCherry в качестве груза (как показано на фиг. 14B). На фиг. 16A показаны иллюстративные данные проточной цитометрии для нуклеофицированных iPSC. Гейтирование показало, что высокая процентная доля, примерно 15%, подвергнутых нуклеофекции клеток экспрессировали GFP и mCherry, что позволяет предположить, что нокин-кассета с GFP и нокин-кассета с mCherry интегрировались в аллель GAPDH. Примерно 41% подвергнутых нуклеофекции клеток экспрессировали mCherry, и примерно 36% подвергнутых нуклеофекции клеток экспрессировали GFP.

[0794] Проводили дополнительный эксперимент для тестирования биаллельной вставки GFP и mCherry в популяции iPSC. Популяции iPSC трансформировали, как описано. Клетки подвергали нуклеофекции с использованием 0,5 мкМ RNP, содержащих Cas12a и RSQ22337 (нацеленную на локус *GAPDH*, как описано в примерах 1 и 2), и 2,5 мкг донорной матрицы (5 испытаний) или 5 мкг донорной матрицы (1 испытание), а затем сортировали через 3 или 9 дней после нуклеофекции. Иллюстративное изображение подвергнутых редактированию популяций клеток, которые анализировали с помощью анализа методом проточной цитометрии, представлено на фиг. 16B. На фиг. 16C представлены результаты анализа методом проточной цитометрии из этих испытаний. На фиг. 16C больший столбец в каждый момент времени (день 3 или день 9) представляет общую процентную долю клеток в каждой популяции, которые характеризуются положительной экспрессией по меньшей мере одного груза, например, по меньшей мере одного аллеля с грузом GFP и/или по меньшей мере одного аллеля с грузом mCherry. Меньший столбец в каждый момент времени показывает процентную долю клеток в каждой популяции, которые экспрессируют как GFP, так и mCherry, и, следовательно, представляет клетки с биаллельной интеграцией GFP/mCherry. Эти результаты показали, что примерно 8-15% трансформированных клеток в каждой популяции проявляли фенотип биаллельной вставки GFP/mCherry через девять дней после трансформации.

Пример 4. Спасение от нокаута *B2M* путем целенаправленной интеграции

[0795] Подход, описанный в примере 2, используют для нацеливания на ген *B2M* в NK-клетках (например, путем непосредственного нацеливания на NK-клетки, такие как NK-клетки, происходящие из iPS, или клетки iPS, которые затем дифференцируются в NK-клетки). NK-клетки, у которых отсутствует функциональный ген *B2M*, не смогут распознавать MHC класса I на поверхности друг друга и будут атаковать друг друга, истощая популяцию в результате явления, известного как братоубийство. Нокаутируя ген *B2M* и осуществляя нокин последовательности "груза", которая также восстанавливает функциональный ген *B2M*, можно автоматически произвести обогащение в отношении подвергаемого нокину типа клеток.

Пример 5. Оценка *RPLP0* как кандидатного существенного гена для нокаута путем целенаправленной интеграции

[0796] Описанный в примере 2 подход к интеграции и отбору нокина оценивали в отношении потенциального использования для нацеливания на другие существенные гены в клетках, например, рибосомные гены, такие как ген *RPLP0*. Ген *RPLP0* кодирует рибосомный белок, который является компонентом субъединицы 60S. Рибосомный белок P0 является функциональным эквивалентом белка L10 *E.coli* и обычно используется в качестве гена "домашнего хозяйства" в анализах методом RT-qPCR.

[0797] Иллюстративные направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), которые нацеливаются на концевые экзоны гена *RPLP0*, представлены в таблице 8 ниже. Все направляющие РНК представляют собой 41-мерные молекулы РНК, характеризующиеся следующей конструкцией: 5'-UAAUUUCUACUCUUGUAGAU-[21-мерная последовательность нацеливающего домена]-3' (SEQ ID NO: 90). На фиг. 7 и фиг. 8 эти направляющие молекулы картированы на концевые экзоны гена *RPLP0*.

Таблица 8. Последовательности направляющих РНК

SEQ ID NO:	Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)
132	RPLP0-1	UGGCUGCUGCCCCUGUGGCUG
133	RPLP0-2	GUCUCUUUGACUAAUCACCAA
134	RPLP0-3	ACUAAUCACCAAAAAGCAACC
135	RPLP0-4	GUGAUUAGUCAAAGAGACCAA

[0798] Однако анализ потенциальных нецелевых сайтов в другом месте генома (за пределами локуса *RPLP0*) для gRNA в таблице 8 выявил несколько идентичных или почти идентичных сайтов-мишеней для связывания gRNA в других существенных генах, ассоциированных со структурой или функцией рибосом, вероятно вследствие высококонсервативной природы рибосомных генов (данные не показаны). Трансфекция клеток с использованием RNP, содержащих gRNA из таблицы 8, потенциально может привести к уничтожению большинства клеток путем введения вставок/делеций в другие существенные гены, помимо *RPLP0*, даже в присутствии донорной плазмиды, сконструированной для восстановления отредактированного гена *RPLP0*, как описано в примере 2. Кроме того и/или в качестве альтернативы, нецелевые объекты могут забирать на себя комплексы RNP из основного локуса-мишени, что приводит к снижению степени редактирования и уменьшению желаемых событий интеграции. Таким образом, эти конкретные сайты нацеливания gRNA в *RPLP0* не рассматривались как возможные кандидаты для подхода к интеграции и отбору нокина, как описано в данном документе.

Пример 6. Оценка *RPL13A* как кандидатного существенного гена для нокаута путем целенаправленной интеграции

[0799] Описанный в примере 2 подход к интеграции и отбору нокина оценивали в отношении потенциального использования для нацеливания на другие существенные гены в клетках. Ген *RPL13A* ассоциирован с рибосомами, но он не требуется для канонической функции рибосомы и имеет внерибосомные функции. Он участвует в метилировании рРНК и обычно используется в качестве гена "домашнего хозяйства" в анализах RT-qPCR.

[0800] Иллюстративные направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), которые нацеливаются на концевые экзоны гена *RPL13A*, представлены в таблице 9 ниже. Все направляющие РНК представляют

собой 41-мерные молекулы РНК, характеризующиеся следующей конструкцией: 5'-UAAUUUCUACUCUUGUAGAU-[21-мерная последовательность нацеливающего домена]-3' (SEQ ID NO: 90). На фиг. 9 и фиг. 10 эти направляющие молекулы картированы на концевые экзоны гена *RPL13A*.

Таблица 9. Последовательности направляющих РНК

SEQ ID NO:	Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)
136	RPL13A-1	UUCUCCACGUUCUUCUCGGCC
137	RPL13A-2	UCAAUUUUCUUCUCCACGUUC
138	RPL13A-3	CGUAGCCUCUGCCAAGAAUAA
139	RPL13A-4	UUGGGCUCAGACCAGGAGUCC

[0801] Однако анализ потенциальных нецелевых сайтов в другом месте генома (за пределами локуса *RPL13A*) для gRNA в таблице 9 выявил несколько идентичных или почти идентичных сайтов-мишеней для связывания gRNA в других существенных генах, ассоциированных со структурой или функцией рибосом, вероятно вследствие высококонсервативной природы рибосомных генов (данные не показаны). Трансфекция клеток с использованием RNP, содержащих gRNA из таблицы 9, потенциально может привести к уничтожению большинства клеток путем введения вставок/делеций в другие существенные гены, помимо *RPL13A*, даже в присутствии донорной плазмиды, сконструированной для восстановления отредактированного гена *RPL13A*, как описано в примере 2. Кроме того и/или в качестве альтернативы, нецелевые объекты могут забирать на себя комплексы RNP из основного локуса-мишени, что приводит к снижению степени редактирования и уменьшению желаемых событий интеграции. Таким образом, эти конкретные сайты нацеливания gRNA в *RPL13A* не рассматривались как возможные кандидаты для подхода к интеграции и отбору нокина, как описано в данном документе.

Пример 7. Оценка *RPL7* как кандидатного существенного гена для нокаута путем целенаправленной интеграции

[0802] Описанный в примере 2 подход к интеграции и отбору нокина оценивали в отношении потенциального использования для нацеливания на другие существенные гены в клетках, например, рибосомные гены, такие как ген *RPL7*, в клетках. Ген *RPL7* кодирует рибосомный белок, который является компонентом субъединицы 60S. Этот рибосомный белок связывается с G-богатыми структурами в 28S рРНК и в мРНК и играет регуляторную роль в аппарате трансляции.

[0803] Иллюстративные направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), которые нацеливаются на концевые экзоны гена *RPL7*, представлены в таблице 10 ниже. Все направляющие РНК представляют собой 41-мерные молекулы РНК, характеризующиеся следующей конструкцией: 5'-UAAUUUCUACUCUUGUAGAU-[21-мерная последовательность нацеливающего домена]-3' (SEQ ID NO: 90). На фиг. 11 и фиг. 12 эти направляющие молекулы картированы на концевые экзоны гена *RPL7*.

Таблица 10. Последовательности направляющих РНК

SEQ ID NO:	Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)
140	RPL7-1	AUUCAUGAGAUCUAUACUGUU
141	RPL7-2	CAACAGUAUAGAUCUCAUGAA
142	RPL7-3	AAGCGUUUUCCAACAGUAUAG

SEQ ID NO:	Название	Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)
143	RPL7-4	CCUCUUUGAAGCGUUUUCCAA
144	RPL7-5	AAGGGCCACAGGAAGUUAUUU
145	RPL7-6	UUCAUUCCACCUCGUGGAGAA
146	RPL7-7	GUAGAAGGUGGAGAUGCUGGC
147	RPL7-8	UCAGGAUGAGGUCUCUCACCU

[0804] Однако анализ потенциальных нецелевых сайтов в другом месте генома (за пределами локуса *RPL7*) для gRNA в таблице 10 выявил несколько идентичных или почти идентичных сайтов-мишеней для связывания gRNA в других существенных генах, ассоциированных со структурой или функцией рибосом, вероятно вследствие высококонсервативной природы рибосомных генов (данные не показаны). Трансфекция клеток с использованием RNP, содержащих gRNA из таблицы 10, потенциально может привести к уничтожению большинства клеток путем введения вставок/делеций в другие существенные гены, помимо *RPL7*, даже в присутствии донорной плазмиды, сконструированной для восстановления отредактированного гена *RPL7*, как описано в примере 2. Кроме того и/или в качестве альтернативы, нецелевые объекты могут забирать на себя комплексы RNP из основного локуса-мишени, что приводит к снижению степени редактирования и уменьшению желаемых событий интеграции. Таким образом, эти конкретные сайты нацеливания gRNA в *RPL7* не рассматривались как возможные кандидаты для подхода к интеграции и отбору нокина, как описано в данном документе.

Пример 8. Спасение от нокаута *TBP* путем целенаправленной интеграции

[0805] Описанный в примере 2 подход к интеграции и отбору нокина использовали для нацеливания на ген *TBP* в iPSC. Хотя iPSC тестировали для целей данного эксперимента, описанные способы могут быть применены к другим типам клеток. Ген *TBP* кодирует белок, связывающий TATA-бокс — регулятор транскрипции, играющий ключевую роль в аппарате инициации транскрипции. Направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), которые нацеливаются на концевые экзоны гена *TBP*, представлены в таблице 11 ниже. Все направляющие РНК представляют собой 41-мерные молекулы РНК, характеризующиеся следующей конструкцией: 5'-UAAUUUCUACUCUUGUAGAU-[21-мерная последовательность нацеливающего домена]-3' (SEQ ID NO: 90).

Таблица 11. Последовательности направляющих РНК

Название	Сайт-мишень	Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)	Местоположение	Плазмида
TBP-1	RSQ33502 (SEQ ID NO: 148)	AAAUGCUUCAUAAAUUUCUGC	Экзон 8 изоформы 1; экзон 7 изоформы 2	PLA1615
TBP-2	RSQ33503 (SEQ ID NO: 149)	UGCUCUGACUUUAGCACCUAA	Экзон 8 изоформы 1; экзон 7 изоформы 2	PLA1616

Название	Сайт-мишень	Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)	Местоположение	Плазмида
TBP-3	RSQ33504 (SEQ ID NO: 150)	AAAACAUCUACCCUAUUCUAA	Экзон 8 изоформы 1; экзон 7 изоформы 2	PLA1617

[0806] Каждую из RSQ33502, RSQ33503 и RSQ33504 (SEQ ID NO: 148-150), описанных в таблице 11, определяли как высокоспецифичную в отношении *TBP* и имеющую минимальное количество нецелевых сайтов в геноме (данные не показаны). Таким образом, ген *TBP* считали хорошим геном-кандидатом в качестве мишени для способов интеграции и отбора груза, описанных в данном документе, по меньшей мере частично, потому что существуют gRNA, способные высокоспецифично нацеливаться на концевой экзон (экзон 8 изоформы 1 мРНК или экзон 7 изоформы 2 мРНК). Однако для того, чтобы любая из этих gRNA была в высокой степени подходящей для описанных в данном документе способов, они должны быть высокоэффективными для введения вставок/делеций в таком местоположении в локусе *TBP*, что приводило бы к нокауту и/или сильному снижению функции гена.

[0807] Затем каждую из этих gRNA тестировали для определения возможности ее использования для нокина в кассете, содержащей часть *TBP* и последовательность груза в рамке считывания, кодирующую GFP, в концевой экзон гена *TBP* в клетках в процессе спасения от летального фенотипа, который в противном случае возник бы в результате введения RNP-индуцированных вставок/делеций в кодирующую область этого существенного гена. Если тестируемая gRNA была эффективна для введения вставок/делеций в местоположение TBP, важное для функционирования, при высокой частоте, то можно было бы ожидать, что трансфицированные клетки, которые не подвергаются HDR для включения нокин-кассеты, погибнут, что приведет к получению большой популяции клеток, экспрессирующих GFP из локуса *TBP*. В частности, клетки iPSC приводили в контакт с RNP, содержащим AsCas12a (SEQ ID NO: 62), и RSQ33502, RSQ33503 или RSQ33504 (SEQ ID NO: 148-150) вместе с двухнитевой донорной ДНК-матрицей (dsDNA-плазмидой), предназначенной для опосредования HDR в каждом соответствующем сайте-мишени для связывания gRNA. Двухнитевые донорные ДНК-матрицы содержали нокин-кассету с кодирующей последовательностью для GFP ("груз") в рамке считывания с кодон-оптимизированной версией части кодирующей последовательности конечного экзона *TBP* (экзона 8 изоформы 1 мРНК или экзона 7 изоформы 2 мРНК) и ниже нее (с 3′-стороны от нее), а также последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид P2A ("P2A"), аналогично dsDNA-плазмиде, описанной в примере 2 для GAPDH. Последовательность *TBP* в двухнитевых донорных ДНК-матрицах (PLA1615, PLA1616 или PLA1617; содержащих донорную матрицу под SEQ ID NO: 47, 49 или 50) кодон-оптимизировали для предотвращения дополнительного связывания сопутствующей молекулой направляющей РНК (RSQ33502, RSQ33503 или RSQ33504). Нокин-кассета также содержала 3′-UTR и последовательности поли(A)-сигнала ниже последовательности груза. RNP, содержащий RSQ33502, вводили с PLA1615 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 47); RSQ33503 вводили с PLA1616 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 49); а RSQ33504 вводили с PLA1617 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 50). Каждая конкретная dsDNA-плазмида (PLA) содержала донорную матрицу с плечами гомологии и нокин-кассету, разработанную таким образом, чтобы

специфично охватывать и делать неэффективным конкретный сайт-мишень для gRNA после интеграции нокин-кассеты.

[0808] Проточную цитометрию проводили через 7 дней после нуклеофекции и использовали для определения степени успешной интеграции нокин-кассеты на основе плазмиды в соответствующий сайт-мишень *TBP*. На фиг. 17A показано, что клетки, подвергнутые нуклеофекции с использованием RNP, содержащими RSQ33503, демонстрировали самые высокие уровни экспрессии GFP по сравнению с клетками, подвергнутыми нуклеофекции с использованием других RNP, что указывает на то, что нокин-кассета, кодирующая GFP, демонстрирует высокий уровень успешной интеграции в эти клетки. На фиг. 18 показано, что примерно 76% клеток, подвергнутых нуклеофекции с использованием RNP, содержащего RSQ33503 (SEQ ID NO: 149), и плазмиды PLA1616 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 49), экспрессировали GFP по сравнению с только приблизительно 1% клеток, подвергнутых нуклеофекции с использованием плазмиды PLA1616 в отдельности (без RNP-контроля). Клетки, подвергнутые нуклеофекции с использованием RNP, содержащих RSQ33504 (SEQ ID NO: 150), также демонстрировали высокие уровни экспрессии GFP, что также свидетельствует о более высоких уровнях интеграции нокин-кассеты (фиг. 17A). Клетки, подвергнутые нуклеофекции с использованием RNP, содержащих RSQ33502 (SEQ ID NO: 148), демонстрировали гораздо более низкую экспрессию GFP, что указывает на то, что нокин-кассета не интегрировалась успешно в большинство этих клеток (фиг. 17A). На фиг. 17B показано, что применение RNP, содержащего RSQ33503 (SEQ ID NO: 149), привело к приблизительно 80% редактированию, что коррелирует с более высоким уровнем экспрессии GFP, показанным на фиг. 17A. Процент редактирования измеряли через два дня после трансфекции и определяли с помощью анализов ICE (как описано в Hsiau et al., Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. BioRxiv, 251082, August 2019). Применение RNP, содержащего RSQ33502 (SEQ ID NO: 148), приводило к относительно низкому проценту редактирования, что коррелировало с низким уровнем экспрессии GFP на фиг. 17A. На фиг. 17C показана относительная интенсивность экспрессии интегрированного "груза" (GFP) в подвергнутых редактированию клетках. Наконец, проводили анализ ddPCR для определения процента нокина груза GFP в аллелях *TBP* клеток, подвергнутых нуклеофекции с использованием RNP, содержащих RSQ33503 (SEQ ID NO: 149), и донорной плазмиды PLA1616 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 49). На фиг. 19 по данным ddPCR показано, что более 40% аллелей *TBP* характеризовались успешным нокином кассеты, кодирующей GFP.

Пример 9. Спасение от нокаута *E2F4* путем целенаправленной интеграции

[0809] Описанный в примере 2 подход к интеграции и отбору нокин использовали для нацеливания на ген *E2F4* в iPSC. Хотя iPSC тестировали для целей данного эксперимента, описанные способы могут быть применены к другим типам клеток. Ген *E2F4* кодирует фактор транскрипции 4 E2F. Этот регулятор транскрипции играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла. Направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), которые нацеливаются на концевые экзоны гена *E2F4*, представлены в таблице 12 ниже. Все направляющие РНК представляют собой 41-мерные молекулы РНК, характеризующиеся следующей конструкцией: 5'-UAAUUUCUACUCUUGUAGAU-[21-мерная последовательность нацеливающего домена]-3' (SEQ ID NO: 90).

Таблица 12. Последовательности направляющих РНК

Название	Сайт-мишень	Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)	Местоположение	Плазмида
E2F4-1	RSQ33505 (SEQ ID NO: 151)	CCCCUCUGCUUCGUCUUUCUC	Экзон 10	PLA1626
E2F4-2	RSQ33506 (SEQ ID NO: 152)	UCCACCCCCGGGAGACCACGA	Экзон 10	PLA1627
E2F4-3	RSQ33507 (SEQ ID NO: 153)	AUGUGCCUGUUCUCAACCUCU	Экзон 10	PLA1628

[0810] Каждую из RSQ33505, RSQ33506 и RSQ33507 (SEQ ID NO: 151-153) определяли как высокоспецифичную в отношении *E2F4* и имеющую минимальное количество нецелевых сайтов в геноме (данные не показаны). Таким образом, ген *E2F4* считали хорошим геном-кандидатом в качестве мишени для способов интеграции и отбора груза, описанных в данном документе, по меньшей мере частично, потому что существуют gRNA, способные высокоспецифично нацеливаться на концевой экзон (экзон 10). Однако для того, чтобы любая из этих gRNA была в высокой степени подходящей для описанных в данном документе способов, они должны быть высокоэффективными для введения вставок/делеций в таком местоположении в локусе *E2F4*, что приводило бы к нокауту или сильному снижению функции гена.

[0811] gRNA RSQ33505, RSQ33506 и RSQ33507 (SEQ ID NO: 151-153) затем тестировали для определения возможности их использования для нокина кассеты, содержащей часть *E2F4* и последовательность груза, кодирующую GFP, в концевой экзон локуса *E2F4* в клетках в процессе спасения от летального фенотипа, который в противном случае возник бы в результате введения RNP-индуцированных вставок/делеций в кодирующую область этого существенного гена с высокой частотой. В частности, iPSC приводили в контакт с RNP, содержащим AsCas12a (SEQ ID NO: 62), и RSQ33505, RSQ33506 или RSQ33507 (SEQ ID NO: 151-153), вместе с двухнитевой донорной ДНК-матрицей (dsDNA-плазмидой), предназначенной для опосредования HDR в каждом соответствующем сайте-мишени для связывания gRNA. Двухнитевые донорные ДНК-матрицы содержали нокин-кассету с кодирующей последовательностью для GFP ("груз") в рамке считывания с кодон-оптимизированной версией части кодирующей последовательности конечного экзона *E2F4* (экзона 10) и ниже нее (с 3′-стороны от нее), а также последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид P2A ("P2A"), аналогично dsDNA-плазмиде, описанной в примере 2 для GAPDH. Последовательность *E2F4* в двухнитевых донорных ДНК-матрицах (PLA1626, PLA1627 или PLA1628; содержащих донорную матрицу под SEQ ID NO: 52-54) кодон-оптимизировали для предотвращения дополнительного связывания сопутствующей молекулой направляющей РНК (RSQ33505, RSQ33506 или RSQ33507; SEQ ID NO: 151-153). Нокин-кассета также содержала 3′-UTR и последовательности поли(A)-сигнала ниже последовательности груза. RNP, содержащий RSQ33505 (SEQ ID NO: 151), вводили с PLA1626 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 52); RSQ33506 (SEQ ID NO: 152) вводили с PLA1627 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 53); а RSQ33507 (SEQ ID NO: 153), вводили с PLA1628 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 54). Каждая конкретная dsDNA-плазмида (PLA) содержала донорную матрицу с плечами гомологии и нокин-кассету, разработанную таким образом, чтобы специфично охватывать и делать неэффективным конкретный сайт-мишень для gRNA после интеграции.

[0812] Проточную цитометрию проводили через 7 дней после нуклеофекции и использовали для определения степени успешной интеграции нокин-кассеты на основе плазмиды в соответствующий сайт-мишень *E2F4*. На фиг. 17A показано, что клетки, нуклеофицированные с помощью RNP, содержащего RSQ33505 (SEQ ID NO: 151), демонстрировали наивысшую степень экспрессии GFP по сравнению с клетками, подвергнутыми нуклеофекции с использованием других RNP, нацеленных на *E2F4*, что говорит о том, что нокин-кассета, кодирующая GFP, успешно интегрировалась во многие из этих клеток. Клетки, которые подвергали нуклеофекции с использованием RNP, содержащих RSQ33506 или RSQ33507 (SEQ ID NO: 152 и 153), демонстрировали гораздо более низкую экспрессию GFP, что указывает на то, что нокин-кассета не интегрировалась успешно в большинство этих клеток (фиг. 17A). На фиг. 17B показано, что применение RNP, содержащих RSQ33505 (SEQ ID NO: 151) или RSQ33506 (SEQ ID NO: 152), приводило к степеням редактирования, составляющим примерно 15% и примерно 20% соответственно, при измерении через 48 часов после трансфекции RNP. Относительно более низкая наблюдаемая степень редактирования для RSQ33505 (SEQ ID NO: 151) может неожиданно коррелировать с относительно высоким уровнем интеграции GFP в *E2F4* (как видно на фиг. 17A) и может частично быть результатом значительной гибели популяции подвергнутых редактированию клеток через 48 часов. Процент редактирования измеряли через два дня после трансфекции и определяли с помощью анализов ICE (как описано в Hsiau et al., August 2019). На фиг. 17C показана относительная интенсивность экспрессии интегрированного "груза" (GFP) в подвергнутых редактированию клетках.

Пример 10. Спасение от нокаута *G6PD* путем целенаправленной интеграции

[0813] Описанный в примере 2 подход к интеграции и отбору нокин использовали для нацеливания на ген *G6PD* в iPSC. Хотя iPSC тестировали для целей данного эксперимента, описанные способы могут быть применены к другим типам клеток. Ген *G6PD* кодирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Этот метаболический фермент играет ключевую роль в гликолизе и продуцировании NADPH. Направляющая РНК AsCpf1 (AsCas12a), которая нацеливается на концевые экзоны гена *G6PD*, представлена в таблице 13 ниже.

Таблица 13. Последовательности направляющих РНК

Название	**Сайт-мишень**	**Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)**	**Местоположение**	**Плазмида**
G6PD-1	RSQ33508 (SEQ ID NO: 154)	CAGUAUGAGGGCACCUACAAG	Экзон 13	PLA1618

[0814] RSQ33508 (SEQ ID NO: 154) определяли как высокоспецифичную в отношении *G6PD* и имеющую минимальное количество нецелевых сайтов в геноме (данные не показаны). Таким образом, ген *G6PD* считали хорошим геном-кандидатом в качестве мишени для способов интеграции и отбора груза, описанных в данном документе, по меньшей мере частично, потому что существуют gRNA, способные специфично нацеливаться на концевой экзон (экзон 13).

[0815] gRNA RSQ33508 (SEQ ID NO: 154) затем тестировали для определения возможности ее использования для нокина кассеты, содержащей часть *G6PD* и последовательность груза, кодирующую GFP, в концевой экзон локуса *G6PD* в клетках в процессе спасения от летального фенотипа, который в противном

случае возник бы в результате введения RNP-индуцированных вставок/делеций в кодирующую область этого существенного гена с высокой частотой. В частности, iPSC приводили в контакт с RNP, содержащим AsCas12a (SEQ ID NO: 62) и RSQ33508 (SEQ ID NO: 154), вместе с двухнитевой донорной ДНК-матрицей (dsDNA-плазмидой), предназначенной для опосредования HDR в сайте-мишени для связывания gRNA. Двухнитевые донорные ДНК-матрицы содержали нокин-кассету с кодирующей последовательностью для GFP ("груз") в рамке считывания с кодон-оптимизированной версией части кодирующей последовательности конечного экзона *G6PD* (экзона 13) и ниже нее (с 3′-стороны от нее), а также последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид P2A ("P2A"), аналогично dsDNA-плазмиде, описанной в примере 2 для GAPDH. Последовательность *G6PD* в двухнитевых донорных ДНК-матрицах (PLA1618; содержащих донорную матрицу под SEQ ID NO: 51) кодон-оптимизировали для предотвращения дополнительного связывания сопутствующей молекулой направляющей РНК (RSQ33508). Нокин-кассета также содержала 3′-UTR и последовательности поли(A)-сигнала ниже последовательности груза. RNP, содержащий RSQ33508 (SEQ ID NO: 154), вводили с PLA1618 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 51). dsDNA-плазмида (PLA) содержала донорную матрицу с плечами гомологии и нокин-кассету, разработанную таким образом, чтобы специфично охватывать и делать неэффективным сайт-мишень для сопутствующей gRNA после интеграции.

[0816] Проточную цитометрию проводили через 7 дней после нуклеофекции и использовали для определения степени успешной интеграции нокин-кассеты на основе плазмиды в сайт-мишень *G6PD*. На фиг. 17A показано, что клетки, нуклеофицированные с помощью RNP, содержащего RSQ33508 (SEQ ID NO: 154), демонстрировали экспрессию GFP в приблизительно 10% анализируемых клеток, что говорит о том, что нокин-кассета, кодирующая GFP, интегрировалась в эти клетки на относительно низком уровне. На фиг. 17C показана относительная интенсивность экспрессии интегрированного "груза" (GFP) в подвергнутых редактированию клетках.

Пример 11. Спасение от нокаута *KIF11* путем целенаправленной интеграции

[0817] Описанный в примере 2 подход к интеграции и отбору нокин использовали для нацеливания на ген *KIF11* в iPSC. Хотя iPSC тестировали для целей данного эксперимента, описанные способы могут быть применены к другим типам клеток. Ген *KIF11* кодирует представителя 11 семейства кинезинов. Этот фермент играет ключевую роль в движении везикул по внутриклеточным микротрубочкам и позиционировании хромосом во время митоза. Направляющие РНК AsCpf1 (AsCas12a), которые нацеливаются на концевые экзоны гена *KIF11*, представлены в таблице 14 ниже.

Таблица 14. Последовательности направляющих РНК

Название	**Сайт-мишень**	**Последовательность нацеливающего домена gRNA (РНК)**	**Местоположение**	**Плазмида**
KIF11-1	RSQ33509 (SEQ ID NO: 155)	CCGCCUUAAAUCCACAGCAUA	Интрон 21/экзон 22	PLA1629
KIF11-2	RSQ33510 (SEQ ID NO: 156)	UAACCAAGUGCUCUGUAGUUU	Экзон 22	PLA1630
KIF11-3	RSQ33511 (SEQ ID NO: 157)	GACCUCUCCAGUGUGUUAAUG	Экзон 22	PLA1631

[0818] Каждую из RSQ33509, RSQ33510 и RSQ33511 (SEQ ID NO: 155-157) определяли как высокоспецифичную в отношении *KIF11* и имеющую минимальное количество нецелевых сайтов в геноме (данные не показаны). Таким образом, ген *KIF11* считали хорошим геном-кандидатом в качестве мишени для способов интеграции и отбора груза, описанных в данном документе, по меньшей мере частично, потому что существуют gRNA, способные высокоспецифично нацеливаться на доступный концевой экзон (экзон 22). Однако для того, чтобы любая из этих gRNA была в высокой степени подходящей для описанных в данном документе способов, они должны быть высокоэффективными для введения вставок/делеций в таком местоположении в локусе *KIF11*, что приводило бы к нокауту или сильному снижению функции гена.

[0819] Затем каждую из этих gRNA тестировали для определения возможности ее использования для нокина кассеты, содержащей часть *KIF11* и последовательность груза, кодирующую GFP, в концевой экзон локуса *KIF11* в клетках в процессе спасения от летального фенотипа, который в противном случае возник бы в результате введения RNP-индуцированных вставок/делеций в кодирующую область этого существенного гена с высокой частотой. В частности, клетки iPSC приводили в контакт с RNP, содержащим AsCas12a (SEQ ID NO: 62), и RSQ33509, RSQ33510 или RSQ33511 (SEQ ID NO: 155-157) вместе с двухнитевой донорной ДНК-матрицей (dsDNA-плазмидой), предназначенной для опосредования HDR в каждом соответствующем сайте-мишени для связывания gRNA. Двухнитевые донорные ДНК-матрицы содержали нокин-кассету с кодирующей последовательностью для GFP ("груз") в рамке считывания с кодон-оптимизированной версией части кодирующей последовательности конечного экзона *KIF11* (экзона 22) и ниже нее (с 3′-стороны от нее), а также последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид P2A ("P2A"), аналогично dsDNA-плазмиде, описанной в примере 2 для GAPDH. Последовательность *KIF11* в двухнитевых донорных ДНК-матрицах (PLA1629, PLA1630 или PLA1631; содержащих донорную матрицу под SEQ ID NO: 55-57) кодон-оптимизировали для предотвращения дополнительного связывания сопутствующей молекулой направляющей РНК (RSQ33509, RSQ33510 или RSQ33511; SEQ ID NO: 155-157). Нокин-кассета также содержала 3′-UTR и последовательности поли(A)-сигнала ниже последовательности груза. RNP, содержащий RSQ33509 (SEQ ID NO: 155), вводили с плазмидой PLA1629 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 55); RSQ33510 (SEQ ID NO: 156) вводили с PLA1630 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 56); а RSQ33511 (SEQ ID NO: 157) вводили с PLA1631 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 57). Каждая конкретная dsDNA-плазмида (PLA) содержала донорную матрицу с плечами гомологии и нокин-кассету, разработанную таким образом, чтобы специфично охватывать и делать неэффективным конкретный сайт-мишень для gRNA после интеграции.

[0820] Проточную цитометрию проводили через 7 дней после нуклеофекции и использовали для определения степени успешной интеграции нокин-кассеты плазмиды в соответствующий сайт-мишень *KIF11*. На фиг. 17A показано, что клетки, нуклеофицированные с помощью RNP, содержащего RSQ33509 (SEQ ID NO: 155), демонстрировали наивысшую степень экспрессии GFP по сравнению с клетками, подвергнутыми нуклеофекции с использованием других RNP, нацеленных на *KIF11*, что говорит о том, что нокин-кассета, кодирующая GFP, успешно интегрировалась во многие из этих клеток. Клетки, которые подвергали нуклеофекции с использованием RNP, содержащих RSQ33510 или RSQ33511 (SEQ ID NO: 156 или 157), также демонстрировали некоторую экспрессию GFP (фиг. 17A). На фиг. 17B показано, что применение RNP, содержащих RSQ33509 (SEQ ID NO: 155), привело к приблизительно 40% редактированию через 48 часов после трансфекции (более низкий уровень, возможно, является результатом

значительной гибели клеток в популяции клеток в это время), что коррелирует с уровнями экспрессии GFP, показанными на фиг. 17A. Интересно, что на фиг. 17B показано, что применение RNP, содержащих RSQ33510 (SEQ ID NO: 156), привело к приблизительно 90% наблюдаемым степеням редактирования, тогда как RNP, содержащие RSQ33511 (SEQ ID NO: 157), привели к приблизительно 65% наблюдаемым степеням редактирования, однако экспрессия GFP в клетках, трансфицированных этими направляющими молекулами, была относительно низкой по сравнению с трансфицированными RSQ33509 (SEQ ID NO: 155) клетками. Эти результаты позволяют предположить, что направляющие молекулы RSQ33510 или RSQ33511 (SEQ ID NO: 156 или 157), возможно, не создавали достаточно вредоносных вставок/делеций в *KIF11*, что позволяло высокой доле клеток оставаться жизнеспособными, несмотря на высокие эффективности редактирования, так что трансфицированные клетки не погибали в достаточно больших количествах, обеспечивая эффективный отбор трансфицированных клеток с успешным нокином груза. Таким образом, хотя gRNA RSQ33510 и RSQ33511 (SEQ ID NO: 156 или 157) являются высокоспецифичными в отношении своих сайтов-мишеней *KIF11* (с минимальным количеством нецелевых сайтов) и демонстрируют высокие уровни редактирования, они все же могут оказаться неподходящими gRNA для описанных в данном документе механизмов отбора, поскольку они могут не вызывать токсичных вставок/делеций, приводящих к достаточному нарушению функции *KIF11*, что, в свою очередь, приведет к гибели клеток, если не произойдет гомологичная рекомбинация спасающей нокин-кассеты. Процент редактирования измеряли через два дня после трансфекции и определяли с помощью анализов ICE (как описано в Hsiau et al., August 2019).

Пример 12. Нокин груза в локусах существенных генов с использованием вирусного вектора

[0821] В настоящем примере описано применение описанных в данном документе способов редактирования генов, включающих трансдукцию популяции клеток вирусным вектором.

[0822] Клетки-мишени, описанные в данном документе, собирали у субъекта-донора или субъекта, нуждающегося в терапии (например, пациента). После соответствующего процесса сортировки, культивирования и/или дифференцировки клетки-мишени трансдуцировали по меньшей мере одним вектором на основе AAV, содержащим нуклеотидную последовательность, содержащую gRNA, подходящую нуклеазу и/или подходящую спасающую конструкцию. Клетки сортировали с использованием проточной цитометрии для определения успешных событий трансдукции, редактирования, интеграции и/или экспрессии.

[0823] Популяцию гемопоэтических стволовых клеток трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *GAPDH* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ22337 под SEQ ID NO: 95), и PLA1593 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 44). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции нокин-кассеты и/или экспрессии определяли с использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *GAPDH* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR. Популяцию гемопоэтических стволовых клеток трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *TBP* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ33503 под SEQ ID NO: 149) и PLA1616 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 49). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции и/или экспрессии определяли с

использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *TBP* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR.

[0824] Популяцию Т-клеток трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *GAPDH* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ22337 под SEQ ID NO: 95), и PLA1593 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 44). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции нокин-кассеты и/или экспрессии определяли с использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *GAPDH* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR. Популяцию Т-клеток трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *TBP* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ33503 под SEQ ID NO: 149) и PLA1616 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 49). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции и/или экспрессии определяли с использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *TBP* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR.

[0825] Популяцию NK-клеток трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *GAPDH* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ22337 под SEQ ID NO: 95), и PLA1593 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 44). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции нокин-кассеты и/или экспрессии определяли с использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *GAPDH* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR. Популяцию NK-клеток трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *TBP* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ33503 под SEQ ID NO: 149) и PLA1616 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 49). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции нокин-кассеты и/или экспрессии определяли с использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *TBP* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR.

[0826] Популяцию лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *GAPDH* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ22337 под SEQ ID NO: 95), и PLA1593 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 44). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции нокин-кассеты и/или экспрессии определяли с использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *GAPDH* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR. Популяцию лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *TBP* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ33503 под SEQ ID NO: 149) и PLA1616 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 49). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции нокин-кассеты и/или экспрессии определяли с использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *TBP* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR.

[0827] Популяцию нейронов трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *GAPDH* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ22337 под

SEQ ID NO: 95), и PLA1593 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 44). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции нокин-кассеты и/или экспрессии определяли с использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *GAPDH* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR. Популяцию нейронов трансдуцировали вектором на основе AAV (например, AAV6), содержащим RNP, нацеленный на *TBP* (содержащий Cas12a под SEQ ID NO: 62 и gRNA RSQ33503 под SEQ ID NO: 149) и PLA1616 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 49). Успешные события трансдукции, редактирования, интеграции нокин-кассеты и/или экспрессии определяли с использованием проточной цитометрии, как описано в данном документе. После трансдукции AAV большая доля клеток редактируется в локусе *TBP* с помощью RNP и интегрирует нокин-кассету посредством HDR.

Пример 13. Нокин груза в локусах существенных генов с использованием вирусного вектора

[0828] В настоящем примере описано редактирование генов популяций Т-клеток с использованием описанных в данном документе способов, включающих трансдукцию популяций Т-клеток вирусным вектором. Описанные в данном документе способы могут быть применены и к другим типам клеток, например, к другим иммунным клеткам.

[0829] Т-клетки размораживали в ванне с гранулами, как известно из уровня техники, и извлекали из ванны на второй день. На четвертый день после размораживания клетки подвергали электропорации, вкратце 250000 Т-клеток на лунку в 96-луночной кювете Lonza суспендировали в буфере P2 и подвергали электропорации с использованием импульсного кода CA-137 с различными концентрациями RNP, содержащих gRNA RSQ22337 (SEQ ID NO: 95) и Cas12a (SEQ ID NO: 62), нацеленных на ген *GAPDH* (4 мкМ RNP, 2 мкМ RNP, 1 мкМ RNP или 0,5 мкМ RNP). Сразу после электропорации к клеткам добавляли соответствующую среду, и клеткам давали восстановиться в течение 15 минут. Затем вирусные частицы AAV6, содержащие донорную плазмидную конструкцию, содержащую нокин-кассету с грузом GFP, добавляли в Т-клетки при различных концентрациях множественности заражения (MOI) (5E4, 2,5E4, 1,25E4, 6,25E3, 3,13E3, 1,56E3 или 7,81E2). Донорную плазмиду разрабатывали, как описано в примере 2, с кодон-оптимизированной кодирующей 5′-частью экзона 9 GAPDH, оптимизированной для предотвращения дополнительного связывания последовательности нацеливающего домена gRNA направляющей РНК (RSQ22337), находящейся в рамке последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид P2A ("P2A"), находящейся в рамке кодирующей последовательностью для GFP ("груза"), стоп-кодоном и последовательностью поли(A)-сигнала. Т-клетки разделяли через два дня, а затем каждые 48 часов до анализа методом проточной цитометрии. Через семь дней после электропорации Т-клетки сортировали с использованием проточной цитометрии для определения успешных событий трансдукции, трансформации, редактирования, интеграции нокин-кассеты и/или экспрессии (см. фиг. 20, фиг. 21, фиг. 22A и фиг. 22B). Как показано на фиг. 20, популяции Т-клеток трансдуцировали с помощью 4 мкМ RNP, 2 мкМ RNP, 1 мкМ RNP или 0,5 мкМ RNP при различной множественности заражения (MOI) AAV6 (5E4, 2,5E4, 1,25E4, 6,25E3, 3,13E3, 1,56E3 или 7,81E2). Высокие доли интеграции GFP в ген *GAPDH* наблюдали в популяциях Т-клеток, трансдуцированных/трансформированных всеми концентрациями RNP при MOI AAV6 5E4, а также наблюдали при концентрациях RNP более 1 мкМ, когда клетки трансдуцировали с помощью AAV6 с MOI 1,25E4 (см. фиг. 20 и 22A). Контрольные эксперименты без трансдукции AAV привели к получению популяций Т-клеток, в которых не наблюдали события интеграции GFP (см. фиг. 22B). Жизнеспособность

Т-клеток измеряли через четыре дня после трансформации клеток с помощью RNP и AAV6 при различных MOI (фиг. 21).

[0830] Кроме того, значения эффективности нокина с использованием описанных в данном документе способов сравнивали с оптимизированными версиями известных из уровня техники способов. Вкратце, популяции Т-клеток трансдуцировали вектором на основе AAV6, содержащим донорную матрицу, подходящую для нокина GFP в ген *GAPDH*, как описано в данном документе, и трансформировали с помощью gRNA RSQ22337 (SEQ ID NO: 95), и Cas12a (SEQ ID NO: 62), как описано выше; в качестве альтернативы популяции Т-клеток подвергали высокооптимизированному нокину GFP в локусе TRAC с использованием трансдукции вектором на основе AAV6 (см. например, Vakulskas et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. Nat Med. 2018;24(8):1216-1224). Использовали проточную цитометрию для измерения эффективности нокина (определяли по процентной доле популяции Т-клеток, экспрессирующих GFP, измеренной через 7 дней после электропорации). Показатели нокина в локусе TRAC были высокими (~ 50%) по сравнению с частотами интеграции, описанными в общедоступных источниках для аналогичных методик, однако эффективность нокина в гене *GAPDH* при использовании описанных в данном документе способов с помощью трансдукции AAV6 была значимо ($p = 0,0022$ с использованием непарного t-критерия) выше (~ 68%) (см. фиг. 23). В обоих экспериментах использовали одинаковые концентрацию RNP, MOI AAV6 и длины гомологичных плеч, при этом показаны усредненные результаты трех независимых биологических повторностей (см. фиг. 23). Таким образом, описанные в данном документе способы можно применять для выделения популяции модифицированных клеток, например, иммунных клеток, таких как Т-клетки, которые в высокой степени экспрессируют представляющий интерес ген, по сравнению с другими способами нокина генов.

Пример 14. iPSC с нокаутом CD16 дают начало подвергнутым редактированию iNK с улучшенной функцией

[0831] В настоящем примере описано применение описанных в данном документе способов редактирования генов для создания модифицированных иммунных клеток, пригодных для уничтожения раковых клеток.

[0832] В PSC редактирование осуществляли с использованием иллюстративной системы, показанной на фиг. 3A, 3B и 3C и описанной в примере 2. Вкратце, нацеливались на ген *GAPDH* в iPSC с использованием AsCpf1 (SEQ ID NO: 62) и направляющей РНК (RSQ22337) (SEQ ID NO: 95), что привело к двухнитевому разрыву в направлении 5′-конца последнего экзона *GAPDH* (экзона 9). Нуклеазу CRISPR/Cas и направляющую РНК вводили в клетки путем нуклеофекции (электропорации) рибонуклеопротеина (RNP) в соответствии с известными способами. Клетки также приводили в контакт с двухнитевой донорной ДНК-матрицей (dsDNA-плазмидой, содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 205), которая включала в себя донорную матрицу, содержащую в направлении 5′-3′ 5′-плечо гомологии длиной примерно 500 п. о. (содержащее 3′-часть экзона 8, интрон 8 и кодон-оптимизированную кодирующую 5′-часть экзона 9, оптимизированную для предотвращения дополнительного связывания последовательности нацеливающего домена gRNA направляющей РНК (RSQ22337)), находящуюся в рамке последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид P2A ("P2A"), находящуюся в рамке кодирующую последовательность для CD16 ("груза") (нерасщепляющегося CD16; SEQ ID NO: 165), стоп-кодон и последовательность поли(A)-сигнала, а также 3′-плечо гомологии длиной приблизительно 500 п. о. (содержащее кодирующую часть

экзона 9, включая стоп-кодон, некодирующую 3′-экзонную область экзона 9 и часть нижерасположенной межгенной последовательности) (как показано на фигуре 3B).

[0833] Ген груза CD16 был успешно интегрирован в ген *GAPDH* iPSC с высокими значениями эффективности с применением систем отбора, описанных в данном документе. На фиг. 24A показана эффективность интеграции "груза", кодирующего CD16, в ген *GAPDH* через 0 дней после электропорации и через 19 дней после электропорации в iPSC, трансформированных с помощью RNP при концентрации 4 мкМ и dsDNA-плазмиды, кодирующей CD16, или в "не подвергнутых редактированию клетках", которые не были трансформированы dsDNA-плазмидой. Нокин измеряли в подвергнутых массовому редактированию клетках CD16 KI с помощью ddPCR, нацеленной на 5′- или 3′-концевое положение "груза", используемого для нокина, с использованием праймера на 5′-конце сайта-мишени для gRNA или праймера на 3′-конце сайта в области поли(A), что повышает надежность результата. Как показано на фиг. 24A, CD16 был подвергнут стабильному нокину и присутствовал в популяциях подвергнутых массовому редактированию клеток более чем через две недели после электропорации и целенаправленной интеграции нокин-кассеты.

[0834] Из популяций подвергнутых массовому редактированию клеток отдельные клетки размножали для гомогенизации генотипов. На фиг. 24B показаны четыре популяции подвергнутых редактированию клеток: гомозиготный клон 1, гомозиготный клон 2, гетерозиготный клон 3 и гетерозиготный клон 4. Гомозиготные клоны содержали два аллеля гена *GAPDH*, которые содержали нокин CD16, а гетерозиготные клоны содержали один аллель гена *GAPDH*, который содержал нокин CD16 (согласно измерению с помощью ddPCR в 5'- и 3'-концевых положениях груза, используемого для нокина).

[0835] После подтверждения интеграции "груза", кодирующего CD16, в ген *GAPDH* гомогенизированные линии клеток подвергали дифференцировке в иммунные естественные клетки-киллеры (NK), используя способы центрифугирования эмбриоидных телец, известные в уровне техники. Вкратце, iPSC помещали в 96-луночный планшет со сверхнизким уровнем прикрепления при 5000-6000 клеток на лунку для формирования эмбриоидных телец (EB). В день 11 EB переносили в колбу, где они оставались до остальной части эксперимента (см. Ye Li et al., Cell Stem Cell. 2018 Aug 2; 23(2): 181-192.e5). В день 32 процесса дифференцировки клетки анализировали с использованием способов проточной цитометрии, известных из уровня техники. После стандартных контрольных экспериментов с гейтированием (см. Ye Li et al., Cell Stem Cell. 2018 Aug 2; 23(2): 181-192.e5) процесс дифференцировки анализировали с использованием экспрессии маркеров CD56 и CD45, после чего измеряли совместную экспрессию маркеров CD56 и CD16. Как показано на фиг. 25A-25D, как правило, клетки, положительные по экспрессии CD56, были также положительными по экспрессии CD16 (98%, 99%, 97,8% и 99,9% соответственно), что указывает на то, что как гомозиготные, так и гетерозиготные клоны TI имели стабильные и устойчивые уровни экспрессии CD16.

[0836] Затем эти дифференцированные iNK-клетки с нокином представляющего интерес гена (CD16) в гене *GAPDH* подвергали стимуляции различными линиями раковых клеток для определения их цитотоксической способности. Иллюстративный анализ уничтожения 3D-солидных опухолей показан на фиг. 26. Вкратце, сфероиды формировали путем высевания 5000 меченых NucLight Red клеток SK-OV-3 в 96-луночные планшеты со сверхнизким уровнем прикрепления. Сфероиды инкубировали при 37°C перед добавлением эффекторных клеток (при различных соотношениях E:T) и любых необязательных средств (например, цитокинов, антител и т. д.), затем получали изображение сфероидов каждые 2 часа с использованием системы Incucyte S3 в течение 600 часов. Показанные данные нормализованы к

интенсивности красных объектов во время добавления эффектора. При нормализации кривых сфероидов сохраняла те же паттерны эффективности, которые наблюдались с ненормализованными данными. С использованием этого анализа измеряли цитотоксичность iNK, дифференцированных из iPSC с нокином CD16 в гене *GAPDH*.

[0837] Как показано на фиг. 27A и 27B, обе гомозиготные подвергнутые редактированию линии iNK и обе гетерозиготные подвергнутые редактированию линии iNK с нокином CD16 в гене *GAPDH* были способны уменьшать размер сфероидов из SK-OV-3 более эффективно, чем не подвергнутые редактированию контрольные клетки iNK (PCS WT) или контрольные клетки с нокином GFP в гене *GAPDH* (GFP KI WT) (усредненные данные 2 анализов). Подвергнутые редактированию гомозиготные и гетерозиготные iNK-клетки, содержащие CD16 в *GAPDH*, также уменьшали размер сфероидов из SK-OV-3 более эффективно, чем контрольные клетки с нокином GFP в гене *GAPDH* (данные не показаны). Введение 10 мкг/мл антитела трастузумаба значительно усилило уничтожающую способность CD16 KI iNK по сравнению с контрольными клетками, вероятно, в результате усиления антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) вследствие повышения уровней экспрессии FcγRIII (CD16). Результаты ряда анализов по уничтожению солидных опухолей наносили на график в зависимости от уровней экспрессии CD16 в подвергнутых редактированию iNK CD16 KI (происходящих из подвергнутых массовому редактированию iPSC или подвергнутых одиночному редактированию iPSC). При соотношении E:T 3,16:1 наблюдается корреляция между процентной долей популяции клеток, экспрессирующих CD16, и величиной происходящего уничтожения клеток (см. фиг. 29).

[0838] Для дальнейшего выяснения функциональности подвергнутых редактированию iNK клетки подвергали повторному воздействию опухолевых клеток, и анализировали способность подвергнутых редактированию iNK уничтожать опухолевые мишени многократно на протяжении многодневного периода в анализе серийного уничтожения *in vitro*. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 28. В день 0 анализа 10 x 10^6 опухолевых клеток Raji (линии лимфобластоподобных клеток гемопоэтического происхождения) и 2 x 10^5 iNK помещали в каждую лунку 96-луночного планшета в присутствии или в отсутствие 0,1 мкг/мл антитела ритуксимаба. С интервалами примерно в 48 часов добавляли болюсную дозу из 5 x 10^3 опухолевых клеток Raji для повторной стимуляции популяции iNK. Как показано на фигуре 28, подвергнутые редактированию iNK-клетки (гетерозиготные или гомозиготные CD16 KI iNK) продолжали уничтожать клетки Raji после многократных стимулирований опухолевыми клетками Raji (до 598 часов), тогда как не подвергнутые редактированию iNK-клетки были ограничены в своем эффекте серийного уничтожения. Полученные данные показывают, что iNK-клетки, содержащие гомозиготный или гетерозиготный CD16 KI в *GAPDH,* приводят к длительному и усиленному уничтожению опухолевых клеток. Более того, эффективность гетерозиготных CD16 KI iNK подчеркивает потенциал биаллельной вставки двух разных нокин-кассет, например, содержащих CD16 в одном аллеле и другой представляющий интерес ген в другом аллеле подходящего существенного гена (например, *GAPDH*, *TBP, KIF11,* и т. д.).

Пример 15. Нокин иммунологически релевантных последовательностей в подходящем локусе существенного гена (моноцистронный или бицистронный)

[0839] Отмечали положительные события целенаправленной интеграции в гене *GAPDH* и клеточные фенотипы для интеграции GFP, CD47 или CD16, как описано выше в примере 2 и примере 15. Дополнительные или альтернативные последовательности груза могут быть включены в ген *GAPDH* или

другие подходящие существенные гены, как описано в данном документе, с высокими показателями интеграции. Нацеливались на существенный ген *GAPDH* в клетках iPSC с использованием RNP, содержащего AsCpf1 (SEQ ID NO: 62) и направляющую РНК (RSQ22337; SEQ ID NO: 95), что привело к двухнитевому разрыву в направлении 5′-конца последнего экзона *GAPDH* (экзона 9), как описано в примере 2. Донорную плазмиду, содержащую нокин-кассету с представляющим интерес грузом, также электропорировали с RNP. Как показано на фиг. 30A, показатели целенаправленной интеграции (TI) в гене *GAPDH* для таких грузов, как a) CD16, b) CAR, подходящий для экспрессии в NK-клетках, или c) биаллельный GFP/mCherry, превышали 40% при анализе в двух независимых клональных линиях iPSC при измерении с использованием ddPCR. Как показано на фиг. 30B, показатели целенаправленной TI в гене *GAPDH* для груза CXCR2 составляли по меньшей мере 29,2% в подвергнутых массовому редактированию iPSC (экспрессию определяли с использованием проточной цитометрии), тогда как поверхностная экспрессия CXCR2 наблюдалась в приблизительно 8,5% подвергнутых массовому редактированию iPSC (экспрессию определяли с использованием проточной цитометрии). В отличие от этого, в не подвергнутых редактированию iPSC наблюдались очень небольшие количества CXCR2 (приблизительно 1%) по данным проточной цитометрии (данные не показаны).

[0840] Следующий иллюстративный эксперимент ddPCR использовали для измерения показателей целенаправленной интеграции (TI). Вкратце, TI измеряли с использованием универсального набора праймеров, который захватывает как 5′-плечо гомологии, так и 3′-поли(A)-хвост для области концевого экзона *GAPDH* и может выявлять грузы независимо от конкретной последовательности конкретного груза. 5′-праймер CDN и 3′-праймер поли(A), а также зонды с флуорофором FAM получали в комбинации. Подходящим зондом для эталонного гена является зонд HEX для TTC5. Для проведения реакции зонды, геномную ДНК, мастер-микс BioRad и 2x контрольный буфер смешивали в соотношениях, соответствующих рекомендациям производителя. Сначала геномную ДНК помещали в 96-луночный планшет BioRad (9,2 мкл общей геномной ДНК + вода), затем добавляли мастер-микс с наборами праймеров и зондов (13,8 мкл на лунку). Водные контроли состояли из мастер-микса с набором 5′-праймеров и зондов в одной лунке и мастер-микса с набором 3′-праймеров и зондов в другой лунке. Для контроля с холостыми лунками добавляли 50/50 смеси 2x контрольного буфера и воды (всего 25 мкл). Затем готовили и запускали автоматический генератор капель. После образования капель планшеты для ddPCR запечатывали при 180°C, а затем помещали в термоциклер для амплификации. 5′-праймер CDN: CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTC (SEQ ID NO: 219), 3′-праймер поли(A): TGCCCACAGAATAGCTTCTTCC (SEQ ID NO: 220), зонд FAM: TCCCCTCCTCACAGTTGCCA (SEQ ID NO: 221), прямой праймер для эталонного гена TTC5: GGAGAAAGTGTCCAGGCATAAG (SEQ ID NO: 222), обратный праймер для эталонного гена TTC5: CTCCATCCCACTATGACCATTC, (SEQ ID NO: 223), зонд FAM для TTC5: AGTTTGTGTCAGGATGGGTGGT (SEQ ID NO: 224).

[0841] Далее описанные в данном документе способы интеграции и отбора груза тестировали с использованием ряда бицистронных нокин-кассет, содержащих CD16 и подходящий для NK CAR в разных направлениях 5′-3′ (например, CD16, затем CAR, или CAR, затем CD16) и разделенных последовательностью P2A или IRES. Нацеливались на существенный ген *GAPDH* в клетках iPSC с использованием RNP, содержащего AsCpf1 (AsCas12a, (SEQ ID NO: 62)) и направляющую РНК (RSQ22337; SEQ ID NO: 95), что привело к двухнитевому разрыву в направлении 5′-конца последнего экзона *GAPDH* (экзона 9), как описано в примере 2. Донорную плазмиду, содержащую каждую из нокин-кассет,

изображенных на фиг. 31, также электропорировали с RNP. Как показано на фиг. 31, показатели TI для бицистронных конструкций, содержащих CD16 и подходящий для NK CAR, составляли 20-70% при измерении в подвергнутых массовому редактированию клетках с использованием ddPCR в день 0 после трансформации. Кроме того, ген-груз мембраносвязанного IL-15 (mbIL-15) (продукт слияния, содержащий IL-15, связанный с доменом Sushi, и полноразмерный IL-15Rα, как показано на фиг. 32) также подвергали нокину в локусе *GAPDH* с использованием RNP, содержащих (RSQ22337) и Cas12a при концентрации 4 мкМ и dsDNA-плазмиды, кодирующей mbIL-15, при концентрации 5 мкг (PLA1632; содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 45), чтобы определить, могут ли дополнительные представляющие интерес гены быть интегрированы в существенный ген на высоких уровнях в популяции подвергнутых редактированию клеток. На фиг. 31 показано, что груз mbIL-15 подвергался нокину в локусе *GAPDH* при процентном значении TI более 50%, как измерено с помощью ddPCR (день 0 после трансформации). Таким образом, описанные в данном документе способы можно применять для выделения популяций подвергнутых редактированию клеток, таких как iPSC, которые имеют очень высокие уровни представляющего интерес гена, подвергнутого нокину в локусе существенного гена, такого как *GAPDH*.

Пример 16. iPSC с нокином IL-15 и/или IL-15/IL15-Rα дают начало подвергнутым редактированию iNK с улучшенной функцией

[0842] В настоящем примере описано применение описанных в данном документе способов редактирования генов для получения модифицированных иммунных клеток, пригодных для уничтожения раковых клеток.

[0843] В PSC редактирование осуществляли с использованием иллюстративной системы, показанной на фиг. 3A, 3B и 3C и описанной в примере 2. Вкратце, нацеливались на ген *GAPDH* в iPSC с использованием RNP, содержащих AsCpf1 (AsCas12a, SEQ ID NO: 62) и направляющую РНК (RSQ22337; SEQ ID NO: 95), что привело к двухнитевому разрыву в направлении 5′-конца последнего экзона *GAPDH* (экзона 9). Нуклеазу CRISPR/Cas и направляющую РНК вводили в клетки путем нуклеофекции (электропорации) рибонуклеопротеина (RNP) в соответствии с известными способами. Клетки также приводили в контакт с двухнитевой донорной ДНК-матрицей (dsDNA-плазмидой, PLA), которая включала в себя донорную матрицу, содержащую в направлении 5′-3′ 5′-плечо гомологии длиной примерно 500 п. о. (содержащее 3′-часть экзона 8, интрон 8 и кодон-оптимизированную кодирующую 5′-часть экзона 9, оптимизированную для предотвращения дополнительного связывания последовательности нацеливающего домена gRNA направляющей РНК (RSQ22337)), находящуюся в рамке последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид P2A ("P2A"), находящуюся в рамке кодирующую последовательность для mbIL-15, как показано на фиг. 32 ("груз") (SEQ ID NO: 172), стоп-кодон и последовательность поли(A)-сигнала, а также 3′-плечо гомологии длиной приблизительно 500 п. о. (содержащее кодирующую часть экзона 9, включая стоп-кодон, некодирующую 3′-экзонную область экзона 9 и часть нижерасположенной межгенной последовательности) (как показано на фигуре 3B). 5′- и 3′-плечи гомологии, фланкирующие кодирующую последовательность для груза в донорной матрице, разрабатывали так, чтобы они соответствовали последовательностям, расположенным по обе стороны от эндогенного стоп-кодона в геноме клетки.

[0844] Ген-груз mbIL-15 (как показано на фиг. 32) был успешно интегрирован в ген *GAPDH* в iPSC с высокими значениями эффективности с использованием систем отбора, описанных в данном документе

(см. пример 15). На фиг. 31 показана эффективность "груза", кодирующего mbIL-15, в *GAPDH* в день 0 после электропорации в iPSC, трансформированных с помощью RNP, содержащих (RSQ22337) и Cas12a при концентрации 4 мкМ и dsDNA-плазмиды, кодирующей mbIL-15, при 5 мкг (PLA1632; содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 45). Геномную ДНК экстрагировали через приблизительно семь дней после нуклеофекции. После экстракции геномной ДНК проводили ddPCR.

[0845] Затем две отдельные популяции подвергнутых массовому редактированию mbIL-15 KI клеток iPSC подвергали дифференцировке в iNK-клетки, и показатели TI измеряли с использованием ddPCR в день 28 процесса дифференцировки iNK. На фиг. 33 показано, что показатели интеграции TI для этих популяций подвергнутых редактированию iNK-клеток находились в диапазоне 10-15%. Хотя показатели TI в популяциях iNK снизились по сравнению с TI в день 0 после электропорации iPSC, уровни интеграции TI в этих популяциях клеток оставались значительными. В день 32 после начала дифференцировки проводили проточную цитометрию для определения доли клеток, экспрессирующих CD56 и экзогенный IL-15Rα, в этих популяциях подвергнутых редактированию iNK-клеток (см. фиг. 34A). Уровни совместной экспрессии CD56 и CD16 также определяли в этих популяциях подвергнутых редактированию iNK-клеток (см. фиг. 34B). Популяции подвергнутых массовому редактированию клеток с mbIL-15 KI также анализировали в отношении маркеров дифференцировки с помощью проточной цитометрии в день 32, день 39, день 42 и день 49 после начала дифференцировки (см. фиг. 34C).

[0846] В день 39 после начала дифференцировки из подвергнутых редактированию iPSC в iNK клетки подвергали стимуляции в анализе уничтожения 3D-сфероидов, как описано в примере 14 и показано на фиг. 26. С использованием этого анализа измеряли цитотоксичность iNK, дифференцированных из iPSC, содержащих нокин mbIL-15 в гене *GAPDH* (см. фиг. 36). Клетки тестировали в присутствии или в отсутствие 5 нг/мл экзогенного IL-15. Как показано в таблице 15 и на фиг. 36, iNK-клетки с mbIL-15 KI (популяции Mb IL-15 S1 и Mb IL-15 S2) демонстрировали более эффективное уничтожение опухолевых клеток по сравнению с неподвергнутыми редактированию исходными клетками, дифференцировавшимися в iNK (PCS "WT", 1 и 2). Следует отметить, что iNK-клетки с mbIL-15 KI демонстрировали более эффективное уничтожение опухолевых клеток в отсутствие экзогенного IL-15 по сравнению с iNK-клетками WT в отсутствие эндогенного IL-15 при более низких соотношениях E:T. Также iNK-клетки с mbIL-15 KI лучше уничтожали опухолевые клетки в присутствии низких концентраций экзогенного IL-15 (5 нг/мл) по сравнению с не подвергнутыми редактированию iNK-клетками WT в присутствии той же концентрации экзогенного IL-15.

[0847] Кроме того, iNK-клетки с mbIL-15 KI на более поздних стадиях дифференцировки (день 63 после начала дифференцировки для набора 1 (S1) и день 56 после начала дифференцировки для набора 2 (S2)) также подвергали стимуляции в анализах уничтожения 3D-сфероидов, как описано выше. Клетки тестировали в присутствии или в отсутствие 10 мкг/мл герцептина и/или 5 нг/мл экзогенного IL-15. Как показано в таблице 16 и на фиг. 37A-37D, iNK-клетки с mbIL-15 KI демонстрировали высокую эффективность уничтожения опухолевых клеток, особенно в сочетании с терапией антителами. В день 63 все iNK-клетки с mbIL-15 KI не экспрессировали выявляемые уровни IL-15Ra; в день 56 только одна линия iNK-клеток с mbIL-15 KI (Mb IL-15 S2 R2) экспрессировала выявляемые уровни IL-15Ra (данные не показаны).

[0848] Суммарные результаты некоторых анализов уничтожения 3D-сфероидов для iNK-клеток с mbIL-15 KI и контрольных iNK-клеток WT показаны на фиг. 38. Две независимые подвергнутые массовому

редактированию популяции iPSC (набор 1 (S1) и набор 2 (S2)), содержащие нокин mbIL-15 в гене *GAPDH*, дифференцировались в iNK-клетки (дни 39 и 49 дифференцировки iPSC для набора 1 и день 42 дифференцировки iPSC для набора 2). Эти iNK-клетки значительно уменьшали размер сфероидов из опухолевых клеток по сравнению с дифференцированными исходными iNK-клетками WT в отсутствие экзогенного IL-15 (P = 0,034, +/- стандартное отклонение, непарный t-критерий). Дифференцированные iNK-клетки с нокином mbIL-15 также характеризовались тенденцией к значительному уменьшению размера сфероидов из опухолевых клеток по сравнению с дифференцированными исходными клетками WT в присутствии 5 нг/мл экзогенного IL-15 (P = 0,052, +/- стандартное отклонение, непарный t-критерий). Эти результаты показывают, что популяции iNK-клеток, содержащих нокин mbIL-15 в локусе *GAPDH* при использовании описанных в данном документе способов, лучше уничтожают опухолевые клетки при отсутствии экзогенно добавленного IL-15 по сравнению с популяциями не подвергнутых редактированию iNK-клеток.

Таблица 15. Уничтожение 3D-сфероидов iNK-клетками mbIL-15 KI с IL-15

Линия клеток	**EC50 с 0 нг/мл IL-15**	**EC50 с 5 нг/мл IL-15**
Mb IL-15 S1	9,575	1,648
Mb-IL-15 S2	11,05	1,646
iNK WT (PCS) 1	20,71	4,378
iNK WT (PCS) 2	20,99	3,213

Таблица 16. Уничтожение 3D-сфероидов iNK-клетками mbIL-15 KI с герцептином и/или IL-15

Линия клеток	**EC50 с 0 мкг/мл герцептина**	**EC50 с 10 мкг/мл герцептина**	**EC50 с 5 нг/мл IL-15 и 0 мкг/мл герцептина**	**EC50 с 5 нг/мл IL-15 и 10 мкг/мл герцептина**
Mb IL-15, набор 1, повторность 1	2,055	0,6936	0,16515	0,1423
Mb IL-15, набор 1, повторность 2	1,701	0,5903	0,1794	0,1247
Mb IL-15, набор 1, повторность 2.1	1,848	0,9570	0,3187	0,1153
Mb IL-15, набор 2, повторность 1	1,291	1,589	0,2339	0,2096
Mb IL-15, набор 2, повторность 2	0,8026	0,3783	0,3605	0,2778

[0849] Кроме того, iNK-клетки с mbIL-15 KI на более поздних стадиях дифференцировки (день 63 после начала дифференцировки для набора 1 (S1) и день 56 после начала дифференцировки для набора 2 (S2)) также подвергали стимуляции гематологическими раковыми клетками (например, клетками Raji). Популяции NK-клеток с mbIL-15 KI (S1 и S2) тестировали в двух биологических повторностях в присутствии или в отсутствие 10 мкг/мл ритуксимаба. Как показано на фиг. 35, iNK-клетки с mbIL-15 KI демонстрировали высокую эффективность уничтожения опухолевых клеток, особенно в сочетании с терапией антителами. Такая способность этих клеток уничтожать является значительной, поскольку клетки

Raji в естественных условиях устойчивы к NK-клеткам, но iNK-клетки с mbIL-15 KI в сочетании с антителом были способны найти и уничтожить эти клетки.

Пример 17. Нокин полицистронных последовательностей CD16, IL-15 и/или IL-15Rα в подходящем локусе существенного гена

[0850] Как описано выше в примере 2, представляющие интерес гены (GOI) могут быть интегрированы в качестве последовательности груза в подходящие локусы существенных генов с использованием способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления несколько GOI могут быть объединены в бицистронную или мультицистронную последовательность груза, используемую для нокина. На фиг. 39A изображена часть PLA1829 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 208), содержащая бицистронную последовательность груза, используемого для нокина, которую использовали для целенаправленной интеграции в ген *GAPDH*, содержащую пептидную последовательность IL-15, пептидную последовательность IL-15Rα и пептидную последовательность GFP (SEQ ID NO: 187, 189 и 195 соответственно). Каждая из этих пептидных последовательностей была отделена последовательностью P2A. На фиг. 39B изображена часть PLA1832 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 209), содержащая полицистронную последовательность груза, используемого для нокина, которую использовали для целенаправленной интеграции в ген *GAPDH*, содержащую пептидную последовательность CD16, пептидную последовательность IL-15 и пептидную последовательность IL-15Rα (SEQ ID NO: 184, 187 и 189 соответственно). Каждая из этих пептидных последовательностей была отделена последовательностью P2A. На фиг. 39C изображена часть PLA1834 (содержащей донорную матрицу под SEQ ID NO: 212), содержащая бицистронную последовательность груза, используемого для нокина, которую использовали для целенаправленной интеграции в ген *GAPDH*, содержащую пептидную последовательность CD16, пептидную последовательность mbIL-15 (последовательность IL-15, слитую с последовательностью IL-15Rα, как показано на фиг. 32) (SEQ ID NO: 184 и 190 соответственно), разделенные последовательностью P2A.

[0851] Последовательности груза, используемого для нокина, описанные на фиг. 39A-39C, содержатся в плазмидах 1829, 1832 и 1834 соответственно (содержащих донорную матрицу под SEQ ID NO 208, 209 и 212). В PSC редактирование осуществляли с использованием иллюстративной системы, показанной на фиг. 3A, 3B и 3C и описанной в примере 2. Вкратце, нацеливались на ген *GAPDH* в iPSC с использованием AsCpf1 (AsCas12a (SEQ ID NO: 62)) и направляющей РНК (RSQ22337 (SEQ ID NO: 95)), что привело к двухнитевому разрыву в направлении 5′-конца последнего экзона *GAPDH* (экзона 9). Нуклеазу CRISPR/Cas и направляющую РНК вводили путем нуклеофекции (электропорации) рибонуклеопротеина (RNP) в соответствии с известными способами. Клетки также приводили в контакт с двухнитевой донорной ДНК-матрицей (dsDNA-плазмидой (PLA1829, PLA1832 или PLA1834 соответственно)), которая включала в себя донорную матрицу (SEQ ID NO: 208, 209 и 212), содержащую в направлении 5′-3′ 5′-плечо гомологии длиной приблизительно 500 п. о. (содержащее 3′-часть экзона 8, интрон 8 и кодон-оптимизированную кодирующую 5′-часть экзона 9, оптимизированную для предотвращения дополнительного связывания последовательности нацеливающего домена gRNA направляющей РНК (RSQ22337)), находящуюся в рамке считывания последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид P2A ("P2A"), находящуюся в рамке считывания кодирующую последовательность, описанную выше ("груз"), стоп-кодон и последовательность поли(A)-сигнала, а также

3′-плечо гомологии длиной приблизительно 500 п. о. (содержащее кодирующую часть экзона 9, в том числе стоп-кодон, некодирующую 3′-экзонную область экзона 9 и часть нижерасположенной межгенной последовательности) (как показано на фигуре 3B). Проводили четыре уникальные события нуклеофекции (соответствующие RNP и PLA1829, RNP и PLA1832, RNP и PLA1834, а также RNP с контролем без плазмиды), и клетки высевали при клональной плотности. Колонии размножали для анализа TI с использованием ddPCR.

[0852] После TI трансформированные iPSC (подвергнутые редактированию клоны) с KI последовательностей груза PLA1829, PLA1832 или PLA1834 или контрольные исходные клетки WT, трансформированные только RNP, анализировали с использованием проточной цитометрии через семь дней после трансформации (см. фиг. 40A и 40B). Измеряли уровни экспрессии GFP и IL-15Rα в популяциях подвергнутых массовому редактированию iPSC. Как показано на фиг. 40A, приблизительно 57% клеток, трансформированных с помощью PLA1829, экспрессировали как IL-15Rα, так и GFP, тогда как контрольные клетки характеризовались отсутствием экспрессии GFP и приблизительно 14,4% уровнями экспрессии IL-15Rα. Как показано на фиг. 40B, приблизительно 33,1% клеток, трансформированных с помощью PLA1832, и приблизительно 57,2% клеток, трансформированных с помощью PLA1834, экспрессировали IL-15Rα; при этом ни одна из этих популяций клеток не демонстрировала заметных уровней GFP, как и ожидалось, поскольку соответствующие донорные матрицы не содержали GFP. Экспрессия этих белков-грузов может быть использована в качестве косвенного показателя для определения успешной трансформации, редактирования и/или интеграции.

[0853] На фиг. 41A-41C показаны генотипы 24 колоний, трансформированных с помощью PLA1829, PLA1832 или PLA1834 (содержащих донорную матрицу под SEQ ID NO: 208, 209 и 212) соответственно и в сравнении с клетками дикого типа. При измерении с помощью ddPCR клетки с TI ~ 85-100% классифицируются как гомозиготные, с TI 40-60% классифицируются как гетерозиготные, а клетки с очень низким сигналом или его отсутствием классифицируются как дикий тип. Колонии размножали после трансформации, а популяции клеток затем подвергали дифференцировке в iNK-клетки с помощью способа центрифугирования эмбриоидных телец, известного из уровня техники. На фиг. 42A-42D показаны иллюстративные результаты измерения с помощью проточной цитометрии процентной доли клеток, экспрессирующих IL-15Rα и/или CD16, и медианной интенсивности флуоресценции (MFI) IL-15Rα и/или CD16 в день 32 процесса дифференцировки iNK. Как показано на фиг. 42A, трансформация с помощью PLA1829, PLA1832 или PLA1834 обеспечивала поверхностную экспрессию IL-15Rα в гетерозиготных или гомозиготных колониях в значительно более высоких долях, чем в iNK, дифференцировавшихся из контрольных исходных клеток WT. Как показано на фиг. 42B, трансформация с помощью PLA1832 или PLA1834 обеспечивала поверхностную экспрессию CD16 в гетерозиготных или гомозиготных колониях в значительно более высоких долях, чем в iNK, дифференцировавшихся из исходных клеток WT, поскольку клетки, трансформированные последовательностью груза PLA1829, не содержат последовательности груза CD16. Как показано на фиг. 42C, трансформация с помощью PLA1834 обеспечивала более высокую MFI IL-15Rα в гетерозиготных или гомозиготных колониях по сравнению с iNK, дифференцировавшихся из исходных клеток WT, или клеток, трансформированных с помощью PLA1829 или PLA1832. Как показано на фиг. 42D, трансформация с помощью PLA1832 или PLA1834 способствовала поверхностной экспрессии CD16 в гетерозиготных или гомозиготных колониях. Эти данные показывают, что описанные в данном документе способы можно применять для нокина полицистронного груза, содержащего множество

представляющих интерес генов, в существенном гене, таком как *GAPDH*, что приводит к экспрессии представляющих интерес генов в подвергнутых редактированию клетках. Эти данные также четко демонстрируют конститутивную природу экспрессии груза из локуса GAPDH.

Пример 18. Вычислительный скрининг направляющих РНК AsCpf1, подходящих для отбора путем нокина существенных генов

[0854] В настоящем примере описан способ вычислительного скрининга направляющих РНК (gRNA) AsCpf1 (AsCas12a; например, представленных под SEQ ID NO: 62), подходящих для описанных в данном документе способов, которые нацелены на ряд существенных генов домашнего хозяйства. Результаты этого скрининга обобщенно представлены в таблице 17, эти gRNA способствуют расщеплению Cas12a в пределах последних 500 п. о. кодирующих последовательностей ДНК перечисленных существенных генов.

[0855] Существенные гены в таблице 17, отобранные для этого анализа, идентифицировали в пуле существенных генов, составленном путем объединения существенных генов, описанных у Eisenberg et al. (см. например, Eisenberg and Levanon, Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genetics*, 2014), и генов, описанных у Yilmaz et al. (см., например, Yilmaz et al., Defining essential genes for human pluripotent stem cells by CRISPR-Cas9 screening in haploid cells. *Nature Cell Biology,* 2018). Вкратце, существенные гены, описанные у Yilmaz et al., с баллами CRISPR меньше 0 и FDR < 0,05 объединяли с существенными генами, описанными у Eisenberg & Levanon, чтобы создать перечень 4582 генов в целом. Затем эти гены сортировали по их среднему уровню экспрессии (среднее нормализованное значение экспрессии в различных тканях, см., например, консенсусные данные по экспрессии генов РНК в тканях, представленные на https://www.proteinatlas.org/download/rna_tissue_consensus.tsv.zip), и 100 генов с самыми высокими средними уровнями экспрессии в тканях отбирали для анализа. В этой группе генов присутствовал GAPDH. К этой группе добавляли *TBP, E2F4, G6PD* и *KIF11*, что в общей сложности составило 104 гена для дальнейшего анализа.

[0856] Потенциальные последовательности-мишени для gRNA каждого из представляющих интерес генов создавали путем поиска нуклеазоспецифических PAM с подходящими протоспейсерами, картированными на иллюстративную кодирующую область (мРНК-201). Транскрипты с названием, за которым следует "-201", отбирали в качестве иллюстративных для каждого гена (например, GAPDH-201). Информацию о гене (т. е. о кодирующей области) получали из файла аннотации генов GTF в GENCODE v.37. Потенциальные gRNA сначала искали в геномных областях генов-мишеней в эталонном геноме человека (hg38), и для дальнейшего анализа отбирали те идентифицированные gRNA, сайты разреза которых находились в пределах 500 п. о. от стоп-сайта иллюстративной кодирующей области. Затем gRNA-кандидаты сопоставляли с эталонным геномом человека (например, hg38) с помощью BWA Aln (максимальный допуск ошибок спаривания -n 2). Направляющие молекулы с потенциальными сайтами нецелевого связывания (т. е. сопоставление с несколькими геномными областями; качество картирования MAPQ < 30) отфильтровывали. Полученные в результате gRNA нацелены на существенные гены с высокой и/или обширной экспрессией в пределах 500 пар кодирующих оснований от иллюстративного стоп-кодона и не имеют идентичных сайтов нецелевого связывания, аннотированных в геноме человека. Таким образом, они являются отличными gRNA-кандидатами для описанных в данном документе способов отбора.

Таблица 17. Направляющие РНК AsCas12

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
225	*EIF4G2*	AGGCTTTGGCTGGTTCTTTAG	557	*CD63*	CCATCTTTCTGTCTCTTATCA
226	*EIF4G2*	GCTGGTTCTTTAGTCAGCTTC	558	*CD63*	CTCCTGCAGTTTGCCATCTTT
227	*EIF4G2*	GTCAGCTTCTTCCTCTGATTC	559	*CD63*	TGGGCTGCTGCGGGGCCTGCA
228	*EIF4G2*	TAACCAGGTTAGCCACTGATT	560	*RPS24*	TGTTTTCAGAACGACACCGTA
229	*EIF4G2*	ACAAAAGACTTACCTGGAACA	561	*RPS24*	AGAACGACACCGTAACTATCC
230	*EIF4G2*	CCGGAAACTCTTGGGTTATAT	562	*RPS24*	GGTCATTGATGTCCTTCACCC
231	*EIF4G2*	CAAGCCAAGAAAGCTTCTTCT	563	*RPS24*	TCATTCAGCATGGCCTGTATG
232	*EIF4G2*	CATGTCATAGAAGTGCACAAA	564	*RPS24*	CCTCTTCTTCTGGATTACAGA
233	*EIF4G2*	GGAAGTTGCTGTTATAGCAGT	565	*RPS24*	TAGTGCGGATAGTTACGGTGT
234	*EIF4G2*	TGCATTACTGGCTTGAAAGAT	566	*RPS24*	CTTAATGAACTATACCTTTTT
235	*EIF4G2*	CTGCTCTAACTGTTCTTTGGA	567	*RPS23*	GGGCTGTGCCCAAATGAGCTT
236	*EIF4G2*	GAAGGAGCAGAGGATGAATCT	568	*RPS23*	TTCCAGGAAAATGATGAAGTT
237	*EIF4G2*	ATCGCTGGGGGGGTTTACTTC	569	*RPS23*	TACCCAATGACGGTTGCTTGA
238	*EIF4G2*	CTTCACTAGAAATGTACTGTA	570	*RPS23*	AGAGGAGTTGAAGCCAAACAG
239	*EIF4G2*	TCTACATGAAGTTTGGGAGAG	571	*RPS23*	TATTTCAGAGGAGTTGAAGCC
240	*EIF4G2*	GGAGAGATGTTATCTTTAATC	572	*RPS23*	GGCAAGTGTCGTGGACTTCGT
241	*EIF4G2*	TATATGGTTTGAGGGGATGGA	573	*RPS23*	ATTTTTAGGCAAGTGTCGTGG
242	*EIF4G2*	AGGGGATGGATCCAACTTTAT	574	*EEF2*	TCCAGGAAGTTGTCCAGGGCA
243	*EIF4G2*	TAGGTGAATCAGTGGCTAACC	575	*EEF2*	AGGCCCTTGCGCTTGCGGGTC
244	*EIF4G2*	CAAATCTTAATTTATAGGTGA	576	*EEF2*	ACCACTGGCAGATCCTGCCCG
245	*EIF4G2*	ATTTACAAATCTTAATTTATA	577	*EEF2*	TGGTCAAGGCCTATCTGCCCG
246	*EIF4G2*	CGGGAAAAGGCAAGGCTTTGT	578	*EEF2*	AACAGGAAGCGGGGCCACGTG

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
247	*EIF4G2*	TTGGCTTGGAAAGAAGATATA	579	*EEF2*	CCTTCTGGCAGTGTCCAGAGC
248	*EIF4G2*	TGCACTTCTATGACATGGAAA	580	*EEF2*	TTTCCCTTCTGGCAGTGTCCA
249	*EIF4G2*	AGGCATGTTACTTCGCTTTTT	581	*CALR*	CTTCTCCCTTCTGCAGGGTGA
250	*EIF4G2*	TTCATGATCACGTTGATCTAC	582	*CALR*	GCGTGCTGGGCCTGGACCTCT
251	*EIF4G2*	AAGCCAGTAATGCAGAAATTT	583	*CALR*	ACAACTTCCTCATCACCAACG
252	*EIF4G2*	TAGTGAAGTAAACCCCCCCAG	584	*CALR*	GCAACGAGACGTGGGGCGTAA
253	*EIF4G2*	TGTCCAGCTTCTTACAGTACA	585	*CALR*	TGGGTGGATCCAAGTGCCCTT
254	*EIF4G2*	TGAACATCTTAATGACTAGGT	586	*CALR*	CTCCAAGTCTCACCTGCCAGA
255	*SKP1*	AAGACCTTACCTTTTTTAATA	587	*CALR*	TTACGCCCCACGTCTCGTTGC
256	*SKP1*	CAATGAACTTACCTTCCAACA	588	*CALR*	TCCTTCATTTGTTTCTCTGCT
257	*SKP1*	AGCAGGGCAGAATAAAAACCA	589	*CALR*	TTGTCTTCTTCCTCCTCCTTA
258	*SKP1*	TTCATAATTTCAGCAGGGCAG	590	*CALR*	TCCTCATCATCCTCCTTGTCC
259	*SKP1*	CTTTGTTCATAATTTCAGCAG	591	*RPL36AL*	TATGCCCAGGGAAGGAGGCGC
260	*SKP1*	CAGGCTGCAAACTACTTAGAC	592	*SRP14*	AGGCTTATTCAAACCTCCTTA
261	*SKP1*	TTGTTGTAGGTCATTCAGTGG	593	*SRP14*	AGGTGAGCTCCAAGGAAGTGA
262	*SKP1*	TTAGATTTGGGAATGGATGAT	594	*SRP14*	CTTCTTTTTCAGGTGAGCTCC
263	*SKP1*	TTCTGGTTTTCTTAGATTTGG	595	*SRP14*	CTTCAGATGACGGTCGAACCA
264	*SKP1*	GATGCCTTCAATTAAGTTGCA	596	*SRP14*	CAGAAGTGCCGGACGTCGGGC
265	*SKP1*	ATGTCCTTTTTTTTTAGATGC	597	*SRP14*	CAGTTCCTGACGGAGCTGACC
266	*RPS3*	AAGCTTTATGCTGAAAAGGTG	598	*GABARAP*	TTTCGGATCTTCTCGCCCTCA
267	*RPS3*	AAGGGCCTGCTATGGTGTGCT	599	*GABARAP*	GGATCTTCTCGCCCTCAGAGC
268	*RPS3*	AAGGAAGCAAGGGATATCCTG	600	*GABARAP*	TCTACATTGCCTACAGTGACG
269	*RPS3*	AGCATAAAGCTTTAAAGGAAG	601	*GABARAP*	ATCCCAGGAACACCATGAAGA

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
270	*RPS3*	CCAGACACCACAACCTCGCAG	602	*GABARAP*	TGCTTTCATCCCAGGAACACC
271	*RPS3*	CCAAGCACTCTCAGCTGCTCA	603	*GABARAP*	TCAACAATGTCATTCCACCCA
272	*RPS19*	TTCTTCCATCTTTTCCCACAG	604	*GABARAP*	TTTGTCAACAATGTCATTCCA
273	*RPS19*	CCACAGGTGGCAGCTGCCAAC	605	*GABARAP*	CAGTTGGTCAGTTCTACTTCT
274	*RPS19*	TCTGACGTCCCCCATAGATCT	606	*GABARAP*	TTGCATCTTGTATCTTTTGCA
275	*HMGB1*	AGCCCTCTTACCTTCCACCTC	607	*GABARAP*	TCAGGTGATAGTAGAAAAGGC
276	*HMGB1*	TGTTCATTTATTGAAGTTCTA	608	*GABARAP*	ATCTCTTTATCAGGTGATAGT
277	*HMGB1*	GTTCGGCCTTCTTCCTCTTCT	609	*RPSA*	ATAATCTGCCACTCTTGGCAG
278	*HMGB1*	TAGACCATGTCTGCTAAAGAG	610	*RPSA*	TAACCCAGATTGAAAAAGAAG
279	*HMGB1*	GAAAAATAACTAAACATGGGC	611	*RPSA*	GTATTCTCTTAACAGAAGACT
280	*RPL7*	CCCCAAATAGAACCTACCAAG	612	*RPSA*	GAGAAGCTTACCTCTTCAGGA
281	*RPL7*	ACTTCAGGTACCCCAATCTGA	613	*SET*	AATTATTTATTACAGTATTTT
282	*RPL7*	CTTTTTCACTTCAGGTACCCC	614	*SET*	TTACAGTATTTTGATGAAAAT
283	*RPL7*	TGTTTGCTTTTTCACTTCAGG	615	*SET*	GGATTTGACGAAACGTTCGAG
284	*RPL7*	ACCACAGTATCAATGGAGTGA	616	*SET*	ACGAAACGTTCGAGTCAAACG
285	*RPL7*	TGGTCCGTTTTCACCACAGTA	617	*SET*	AGGTTCCCGATATGGATGATG
286	*RPLP0*	AGGTCAAGGCCTTCTTGGCTG	618	*SET*	TTTCAGGAGGATGAAGGAGAA
287	*RPLP0*	ACCACTTCCCCCCTCCTTTCA	619	*SET*	AGGAGGATGAAGGAGAAGATG
288	*G6PD*	CTCACCTGCCATAAATATAGG	620	*SET*	TTTTACCTCTCCTTCCTCCCC
289	*G6PD*	CAGTATGAGGGCACCTACAAG	621	*SET*	GCCAAATTTTCTTTTACCTCT
290	*G6PD*	ACCCCACTGCTGCACCAGATT	622	*GAPDH*	CAGACCACAGTCCATGCCATC
291	*G6PD*	CGCCACGTAGGGGTGCCCTTC	623	*GAPDH*	ATCTTCTAGGTATGACAACGA
292	*RPL4*	GCTTGTAGTGCCGCTGCTGCA	624	*RPLP1*	TTTGTTGTAGGAGGATAAGAT

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
293	*RPL4*	CCGTGGTGCTCGAAGGGCTCT	625	*RPLP1*	TTGTAGGAGGATAAGATCAAT
294	*RPL4*	TTGCAGCACAAGCTCCGGGTG	626	*RPLP1*	TAGCTGAGGAGAAGAAAGTGG
295	*RPL4*	TGCCTAATTTGTTGCAGCACA	627	*RPLP1*	CCACCATCACCTTACCTTTGC
296	*RPL4*	TAGCAAGAAGATCCATCGCAG	628	*RPLP1*	CTACCTGGAGCAGCAGCAGTG
297	*RPL4*	AGTCTTCCCATGCACAAGATG	629	*CFL1*	CTCTTAAGGGGCGCAGACTCG
298	*RPL4*	CCTTTCAGTCTTCCCATGCAC	630	*CFL1*	TAGGGATCAAGCATGAATTGC
299	*EEF1G*	TCCCCAGCTGAGTCCAGATTG	631	*CFL1*	TTCTTTATAGGGATCAAGCAT
300	*EEF1G*	TTCCTCTTAGTACCTTTGTGT	632	*CFL1*	TGTCCAGGGCCCCCGAGTCTG
301	*RPL31*	GATGGCTCCCGCAAAGAAGGG	633	*RPS15*	CTCTTGGTCTCCCGCAGCCCG
302	*RPL31*	AATCGTAGGGGCTTCAAGAAG	634	*TPT1*	CATTATTTATTTTAACCCACT
303	*RPL31*	TTAGGAATGTGCCATACCGAA	635	*TPT1*	TTTTAACCCACTTCCTTGTAC
304	*RPL31*	CAGATCTACAGACAGTCAATG	636	*TPT1*	ACCCACTTCCTTGTACTTACA
305	*RPL31*	GCACCTTATTCCTTTGGCCCA	637	*TPT1*	CCTGGTAGTTTTTGAAATTAG
306	*RPL31*	TGGGATGGAGAACTTACTTTT	638	*TPT1*	GAAATGGAAAAATGTGTAAGT
307	*RPL31*	ATCTGACGATCAGCGATTAGT	639	*TPT1*	CTTCCCAAGTTCTTTATTGGT
308	*ITM2B*	ACTGTCTTTTTCATATTTTAG	640	*TPT1*	TTTGCTTCCCAAGTTCTTTAT
309	*ITM2B*	ATATTTTAGGACCCAGATGAT	641	*TPT1*	GAATCAAAGGGAAACTTGAAG
310	*ITM2B*	GGACCCAGATGATGTGGTACC	642	*TPT1*	TTAATGCAGATGGTCAGTAGG
311	*ITM2B*	GACTAGCATTTATGCTTGCAG	643	*RPL23*	CTACCTTTCATCTCGCCTTTA
312	*ITM2B*	TGCTTGCAGGTGTTATTCTAG	644	*RPL23*	TTGTTCACTATGACTCCTGCA
313	*ITM2B*	TGAATGTAGGCTGGAACCTAT	645	*RPL23*	CTCACCCTTTTTTCTGAGCTC
314	*ITM2B*	CCTCAGTCCTATCTGATTCAT	646	*RPL23*	ATGCAGGTTCTGCCATTACAG
315	*ITM2B*	TTTATTTATCGACTGTGTCAT	647	*RPL23*	TTTTTTTAATGCAGGTTCTGC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
316	*ITM2B*	TTTATCGACTGTGTCATGACA	648	*RPL23*	TTCTCTCAGTACATCCAGCAG
317	*ITM2B*	TCGACTGTGTCATGACAAGGA	649	*RPL34*	ACTTTCTAGGTCCCGAACCCC
318	*ITM2B*	CCTCTCCAACAGGTATTCAGA	650	*RPL34*	TAGGTCCCGAACCCCTGGTAA
319	*ITM2B*	GCAATTCGGCATTTTGAAAAC	651	*RPL34*	TTATGCAGGTTCGTGCTGTAA
320	*ITM2B*	AAAACAAATTTGCCGTGGAAA	652	*RPL34*	GTATTTTCCTTTCTAGGATCA
321	*ITM2B*	CCGTGGAAACTTTAATTTGTT	653	*RPL34*	CTTTCTAGGATCAAGCGTGCT
322	*ITM2B*	GCCAACTGGTACCACATCATC	654	*RPL34*	TAGGATCAAGCGTGCTTTCCT
323	*ITM2B*	TACAAGTATGCTCCTCCTAGA	655	*RPL34*	AGAAATACTTACAGCCTAGTT
324	*ITM2B*	CACTTACTTGAAGTGCAAAAT	656	*RPL34*	ACTTACCTGTCACGAACACAT
325	*ITM2B*	AATGCGATCAGTAATAACCAT	657	*RPL34*	AGCATTTAACTTACCTGTCAC
326	*ITM2B*	CTTGTCATGACACAGTCGATA	658	*COX4I1*	TCTTTCAGAATGTTGGCTACC
327	*ITM2B*	TAAGTTTCCTTGTCATGACAC	659	*COX4I1*	AGAATGTTGGCTACCAGGGTA
328	*ITM2B*	TCTGCGTTGCAGTTTGTAAGT	660	*COX4I1*	CACCTCTGTGTGTGTACGAGC
329	*ITM2B*	ATAGTTTCTCTGCGTTGCAGT	661	*COX4I1*	TTCAATATGTTTTTCAGAAAG
330	*ITM2B*	AAAAGTATTACCTTTAATAGT	662	*COX4I1*	AGAAAGTGTTGTGAAGAGCGA
331	*ITM2B*	ATATTTAAAAAGTATTACCTT	663	*COX4I1*	GCTCCCAGCTTATATGGATCG
332	*ITM2B*	AAAATGCCGAATTGCGAAACA	664	*COX4I1*	CTGAGATGAACAGGGGCTCGA
333	*ITM2B*	TTTTCAAAATGCCGAATTGCG	665	*COX4I1*	ACCGCGCTCGTTATCATGTGG
334	*ITM2B*	CACGGCAAATTTGTTTTCAAA	666	*COX4I1*	ACAAAGAGTGGGTGGCCAAGC
335	*ITM2B*	TTGACTGTTCAAGAACAAATT	667	*COX4I1*	TCAAAGCTTTGCGGGAGGGGG
336	*RPL23A*	CTTTTCTCCCAGCTCCTGCCC	668	*COX4I1*	GTAGTCCCACTTGGAGGCTAA
337	*RPL23A*	TCCCAGCTCCTGCCCCTCCTA	669	*RPL27*	TCCTTGCTCTCTGCAGAAATG
338	*RPL23A*	CCTCTCCCAGGCTTGACCACT	670	*RPL27*	GAACATTGATGATGGCACCTC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
339	*RPL23A*	TTTTTCAGATTGGGATCATCT	671	*RPL27*	TCCCCAGGTACTCTGTGGATA
340	*RPL23A*	TAGGAAGGAAACTTACTTTGT	672	*RPL27*	CCTTCTAGATACAAGACAGGC
341	*RPL27A*	GTCTGGGCTGCCAACATGGTA	673	*RPL27*	CGTCCGGAGTAGCGTCCAGCC
342	*RPL27A*	TATTCCTGCAGGCAAGCACCG	674	*RPL27*	TCTTTGATCTCTTGGCGATCT
343	*RPL27A*	TCTGTTCTTCTAGGGCTACTA	675	*RPL27*	ACAAAAGATTTTATCTTTGAT
344	*PCBP2*	CCCTCTGACTCTCTCCCAGTC	676	*EDF1*	GAGGCTTTGTGTTCATTTCGC
345	*PCBP2*	CTCCTTTTGTAGGCCTATACC	677	*EDF1*	TGTTCATTTCGCCCTAGGCCC
346	*PCBP2*	TAGGCCTATACCATTCAAGGA	678	*EDF1*	GCCCTAGGCCCCTTCTCGATG
347	*PCBP2*	CTCCTTGCAGTTGACCAAGCT	679	*EDF1*	CAATGTCCTTTCCCCGGAGCT
348	*PCBP2*	ACTTGTATCTTAACAGGCATT	680	*EDF1*	CCAAGCACCTGGTTATTGGGT
349	*PCBP2*	GCAGGTTTGGATGCATCTGCT	681	*EDF1*	TTGGAAGTCTCCACATCTTCT
350	*PCBP2*	TTTCTCCCTTAAGTTGATTGG	682	*EDF1*	GCCTGGGCGGCCGTAGGGCCC
351	*PCBP2*	TCCCTTAAGTTGATTGGCTGC	683	*EDF1*	AGGCCTCAAGCTCCGGGGAAA
352	*PCBP2*	TGTGTTACAGGCTTTCCTCGG	684	*EDF1*	GAAAATCAATGAGAAGCCACA
353	*PCBP2*	AGCATGAGCCTGAGGGCTTAC	685	*EDF1*	CCTCACACCGACTCCAGGGGC
354	*PCBP2*	TTACCTGACCACCTGCAAAGA	686	*EDF1*	TAGGCTATCTTAGCGGCACAG
355	*PCBP2*	ATCATTACCCCAATAGCCTTT	687	*EDF1*	TAATTTTCTAGGCTATCTTAG
356	*HSPA8*	TCTTCCTCAGACTGCTGAGAA	688	*TMEM59*	AAAGAAAAATGCTTAAATTTC
357	*HSPA8*	CTAGGCCGTTTGAGCAAGGAA	689	*TMEM59*	AGAATGAGCAAGATTCACTTT
358	*HSPA8*	TTTCCTAGGCCGTTTGAGCAA	690	*TMEM59*	TAGGTAGAGGCCCTGCTTCTT
359	*HNRNPK*	ATCAGCACTGAAACCAACCTG	691	*TMEM59*	GATCTAACAACCACAAGAGAA
360	*HNRNPK*	AGTTGGCTGGATCTATTATTG	692	*TMEM59*	GCTTTTGTTCATTCATAAACT
361	*HNRNPK*	AAAAATCTTTTCAGTTGGCTG	693	*TMEM59*	TTCATTCATAAACTCCAAGTC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
362	*HNRNPK*	AATCAGATTATTCCTATGCAG	694	*TMEM59*	CCTCAGAGGGAACATACTGCT
363	*HNRNPK*	TGTTTTTAGGGTGGCTCCGGA	695	*TMEM59*	TCCATCTTCAAGAAAATTCCT
364	*HNRNPK*	TTTCTGTTTTTAGGGTGGCTC	696	*TMEM59*	CTTAGAGATGATTCTCTCAAA
365	*HNRNPK*	TCTCTAACAGGTTGGTTTCAG	697	*TMEM59*	TAGGCTCCTGCTCCAAATGTG
366	*RPL5*	TCTCTTACTATAGATTGCTTA	698	*TMEM59*	CGTCATCGGCTTGAAGATAAA
367	*RPL5*	CATTGGTTTCTTGAATAGCTT	699	*TMEM59*	TGAATGAACAAAAGCTAAACA
368	*RPL5*	TTGAATAGCTTCTCAATAGGT	700	*TMEM59*	CAGAAGCTGAGTATCTATGGT
369	*UBL5*	TGTAGCTCCAGCTAGGATGAT	701	*TMEM59*	TTTTGCAGAAGCTGAGTATCT
370	*UBL5*	CCTTAACTGCTCTGCGCCCAG	702	*TMEM59*	TTGTGCAACTGTTGCTACAGC
371	*UBL5*	TTAGGTACACGATTTTTAAGG	703	*TMEM59*	GATTTGTTGTGCAACTGTTGC
372	*UBL5*	CTTCAGATGAAATCCACGATG	704	*TMEM59*	ACTACAACTCTTGTCCTCTCG
373	*CST3*	GACAAGGTCATTGTGCCCTGC	705	*TMEM59*	CAGTAACTCTGGGTGGATTTT
374	*CST3*	AGATGTGGCTGGTCATGGAAG	706	*TMEM59*	TTGAAGATGGAGAAAGTGATG
375	*CST3*	TTGTACTCGCCGACGGCAAAG	707	*TMEM59*	AGCAGATCTGCAAATGAGAAA
376	*CST3*	CAGATCTACGCTGTGCCTTGG	708	*TMEM59*	AGAGAATCATCTCTAAGCAAA
377	*CST3*	ACAGAAAGCATTCTGCTCTTT	709	*TMEM59*	GAGCAGGAGCCTACAAATTTG
378	*CST3*	CTTTCACAGAAAGCATTCTGC	710	*TMEM59*	GTCTAAGCCAGAAATCCAGTA
379	*CST3*	ACATGTGTAGATCGTAGCTGG	711	*TMEM59*	ATTATTATTTTAGTCTAAGCC
380	*CST3*	CCGTCGGCGAGTACAACAAAG	712	*TMEM59*	TCTTCAAGCCGATGACGGAAA
381	*RPS29*	TCACCAAGAGCGAGAACCCTG	713	*DYNLL1*	TCTTTTCCAGGAATTTGACAA
382	*RPS29*	TTACAGTCGTGTCTGTTCAAA	714	*DYNLL1*	CAGGAATTTGACAAGAAGTAC
383	*RPS10*	TACTGTACATGCTTCCTTTTT	715	*DYNLL1*	ATGTGTCACATAACTACCGAA
384	*RPS10*	CAAATGACATTATCTGAGAGC	716	*NME2*	TTTCTTAGGAACATCATTCAT

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
385	*RPS10*	CTCACGTGGCACAGCACTCCG	717	*NME2*	TTAGGAACATCATTCATGGCA
386	*RPS10*	TGTGGGAACCATACCTTTAGG	718	*TMBIM6*	GCTGATGGCAACACCTCATAG
387	*RPS10*	TAAAAAGGAAGCATGTACAGT	719	*TMBIM6*	TGTTTTCTAGGAGTTGGCCTG
388	*RPS10*	TCCTATGGCAGGTCCTCATAG	720	*TMBIM6*	TAGGAGTTGGCCTGGGCCCTG
389	*RPS10*	TAGCTGGTGCCGACAAGAAAG	721	*TMBIM6*	TATTGCTGTCAACCCCAGGTA
390	*RPS10*	ACTTTCTAGCTGGTGCCGACA	722	*TMBIM6*	TAACAGCATCCTTCCCACTGC
391	*RPS10*	CATAGGTCTGGAGGGTGAGCG	723	*TMBIM6*	ATGGGCACGGCAATGATCTTT
392	*RPS10*	ATTTACATAGGTCTGGAGGGT	724	*TMBIM6*	CCTGCTTCACCCTCAGTGCAC
393	*RPS10*	TGCCTTACAGTCTCTCAAGTC	725	*TMBIM6*	CTGTGTCTTATAGGTATCTTG
394	*RPL6*	TTACCAGTCACAAGTAATAAG	726	*TMBIM6*	TCTTCCCTGGGGAATGTTTTC
395	*RPL6*	GAAATATGAGATTACGGAGCA	727	*TMBIM6*	GATCCATTTGGCTTTTCCAGG
396	*RPL6*	TTTAGAAATATGAGATTACGG	728	*TMBIM6*	TTAGGCAAACCTGTATGTGGG
397	*RPL6*	TCTTTATTTAGAAATATGAGA	729	*TMBIM6*	ATACTCAACTCATTATTGAAA
398	*RPL6*	ATTTTCTCTTTATTTAGAAAT	730	*TMBIM6*	AGGCACTGCATTGATCTCTTC
399	*RPL6*	CCCCTTAGGACCTCTGGTCCT	731	*TMBIM6*	ATTACTGTCTTCAGAAAACTC
400	*RPL6*	ACTTACAGAGGGTGGTTTTCC	732	*TMBIM6*	TCCATTTCTAGGATAAGAAGA
401	*RPL6*	TTTTTAACTTACAGAGGGTGG	733	*TMBIM6*	TAGGATAAGAAGAAAGAGAAG
402	*RPLP2*	TGTAGGTATTGGCAAGCTTGC	734	*TMBIM6*	ATGGCTATGAGGTGTTGCCAT
403	*ARF1*	ACACTGGCTGCCCGGCAGGCC	735	*TMBIM6*	TGTTCAGTTTCATGGCTATGA
404	*RPL15*	TGTGTAGGTTACGTTATATAT	736	*TMBIM6*	CCAGTTCACACTTACCTCCCA
405	*RPL15*	CTATTCTAGGAGCGAGCTGGA	737	*TMBIM6*	AATAATGAGTTGAGTATCAAA
406	*RPL15*	CCTCTGCAACGGACTGAAGGC	738	*TMBIM6*	TGAAGACAGTAATGAAATCTA
407	*FAU*	CTGGCCGGTCACCTCGAAGGT	739	*TMBIM6*	ATTCATGGCCAGGATCATCAT

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
408	*FAU*	CCTGTAGGCTCATGTAGCCTC	740	*TMBIM6*	GGTTGTAGGCTAACTAACCTT
409	*FAU*	CTCAGTCGCCAATATGCAGCT	741	*RPS7*	TTTAGGAAATTGAAGTTGGTG
410	*FAU*	TTTACTCAGTCGCCAATATGC	742	*RPS7*	GGAAATTGAAGTTGGTGGTGG
411	*RPL36*	CCCCCTAGCGTCTGACCAAAC	743	*RPS7*	CCTTACAGAGGAGAATTCTGC
412	*RPL36*	CCCCGTACGAGCGGCGCGCCA	744	*RPS7*	AACTATTCTTTTAGCCGTACT
413	*NACA*	CTAGTATACCTCTTCCTCTTC	745	*RPS7*	GCCGTACTCTGACAGCTGTGC
414	*NACA*	CTCACCTTGGCTTCCCCAAAA	746	*RPS7*	TTTTCTTGTAGGTTGAAACTT
415	*NACA*	AAATCTTACCTTCCGTGCCTT	747	*RPS7*	TTGTAGGTTGAAACTTTTTCT
416	*NACA*	TCTGTTACAGGAATTAACAAT	748	*RPS7*	TGAAACTACTAAAATACTCAC
417	*NACA*	CCTCTCATCTCTCAGGTCGAT	749	*ACTB*	CTTCCCAGGGCGTGATGGTGG
418	*NACA*	TACCCTGTAGATCGAAGATTT	750	*NPM1*	ATTTGTAGTGATGATGATGAT
419	*NACA*	GGCTATGTCCAAACTGGGTCT	751	*NPM1*	TAATTGCAGTCTATACGAGAT
420	*NACA*	TCTTCTTTAGGCTATGTCCAA	752	*NPM1*	GAAATTCATTTCTTTTTCAGG
421	*NACA*	TCTTCTTAGCTGGCGGCAGCA	753	*NPM1*	TTTTTCAGGGACAAGAATCCT
422	*PRDX1*	GACATCAGGCTTGATGGTATC	754	*NPM1*	AGGGACAAGAATCCTTCAAGA
423	*PRDX1*	CCATGCTAGATGACAGAAGTG	755	*NPM1*	TCTTAATAGGGTGGTTCTCTT
424	*PRDX1*	TTAAATTCTTCTGCCCTATCA	756	*NPM1*	CAGGCTATTCAAGATCTCTGG
425	*PRDX1*	TCTTGCAGTGTGCCCAGCTGG	757	*NPM1*	TAAAATCATACTTACTCTTCA
426	*PRDX1*	TCATTGATGATAAGGGTATTC	758	*NPM1*	CTCACTTTTTCTATACTTGCT
427	*PRDX1*	CCAGGGGCCTTTTTATCATTG	759	*RPS6*	TTTTTCTTGGTACGCTGCTTC
428	*PRDX1*	ATCTCTTTTCCCAGGGGCCTT	760	*RPS6*	GGGCCCAGGCGGCGAGGCACT
429	*PRDX1*	CTTTCATCTCTTTTCCCAGGG	761	*RPS6*	GGAGGCTAAGGAGAAGCGCCA
430	*PRDX1*	GTATCAGACCCGAAGCGCACC	762	*RPS6*	TTTAGGAGGCTAAGGAGAAGC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
431	*PRDX1*	CCATAGGGTCAATACACCTAA	763	*RPS6*	TTTTGTTTAGGAGGCTAAGGA
432	*PRDX1*	CCTTTTGCCATAGGGTCAATA	764	*RPS6*	GGTAAGAAACCTAGGACCAAA
433	*PRDX1*	AGTGATAGGGCAGAAGAATTT	765	*RPS6*	AATTTTTAGGTAAGAAACCTA
434	*PRDX1*	CCCTCTTGACTTCACCTTTGT	766	*RPS6*	TTCTAAGGAGAGAAGGATATT
435	*PRDX1*	CCCCCAGGAAAATATGTTGTG	767	*RPL12*	CTTAAAGGAACCATTAAAGAG
436	*ALDOA*	CCTTCTCGGTCACATACTGGC	768	*RPL12*	TTTACTTAAAGGAACCATTAA
437	*NCL*	GCCCAGTCCAAGGTAACTTTA	769	*RPL12*	CTCTTCTGCAGTTAAACACAG
438	*NCL*	TTTCCATCAATTTCACCGTCT	770	*RPL12*	CTGTTTCCTCTTCTGCAGTTA
439	*NCL*	CATCAATTTCACCGTCTTCCA	771	*RPL12*	TAGTCTCCAAAAAAAGTTGGT
440	*NCL*	ACCGTCTTCCATGGCCTCCTT	772	*RPL12*	TTTCTAGTCTCCAAAAAAAGT
441	*NCL*	GCATCCTCCTCACTGTTGAAG	773	*RPL12*	CCCCAGTATACCTGAGGTGCA
442	*NCL*	GAGGACCCAGTTTCCCGGTCA	774	*CAPNS1*	AACCTGTTACCCACAGACCCT
443	*NCL*	CCGGTCAGTAACTATCCTTGC	775	*CAPNS1*	GCATTGACACATGTCGCAGCA
444	*NCL*	ATGTCTCTTCAGTGGTATCCT	776	*CAPNS1*	AGGAATTCAAGTACTTGTGGA
445	*NCL*	ACAAACAGAGTTTTGGATGGC	777	*CAPNS1*	CAGTAGTGAACTCCCAGGTGC
446	*NCL*	GTGGCAGAGGCCGGGGAGGCT	778	*CAPNS1*	ATGTTGTTCCACAAGTACTTG
447	*NCL*	GAGGACGAGGTGGTGGTAGAG	779	*CAPNS1*	TACACACCTGCCACCTTTTGA
448	*NCL*	TAGACTTCAACAGTGAGGAGG	780	*CAPNS1*	AGAGGTTTCTACACACCTGCC
449	*NCL*	GTTTTGTAGACTTCAACAGTG	781	*CAPNS1*	ATCTGAGTAGCGTCGGATGAT
450	*NCL*	GTGTTCTAGGTTTGGTTTTGT	782	*CAPNS1*	TCAAGAGATTTGAAGGCACCT
451	*NCL*	ATTTGGTGTTCTAGGTTTGGT	783	*CAPNS1*	TCCAGTGCCATCTTTGTCAAG
452	*NCL*	ACGGCTCCGTTCGGGCAAGGA	784	*RPL3*	CAGGGTGGCTTTGTCCACTAT
453	*NCL*	TCAAAGGCCTGTCTGAGGATA	785	*RPS13*	TTTATTAGCTTACCTTTCTGT

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
454	*NCL*	CTTCCCAGAGCCATCCAAAAC	786	*RPS13*	TTAGCTTACCTTTCTGTTCCT
455	*BTF3*	TAGATGAAAGAAACAATCATG	787	*RPS13*	AGTGAATCATCTACAGCCTCT
456	*BTF3*	CTCTTCTCCCTGACTTTAGGG	788	*RPS13*	TTTTTCAGTGAATCATCTACA
457	*BTF3*	GGGAACTGCTCGCAGAAAGAA	789	*RPS13*	CCCTTTTTTCTTTTTCAGTGA
458	*BTF3*	TTTTCTTAATAGGTGAATATG	790	*RPS13*	AGGTGTAATCCTGAGAGATTC
459	*BTF3*	TTAATAGGTGAATATGTTTAC	791	*RPS13*	TATTCCATAACAGTGGTTGAA
460	*BTF3*	CATTTTCCTTTCATAGCTGTG	792	*RPS21*	TCCACAGCTCCGCTAGCAATC
461	*BTF3*	CTTTCATAGCTGTGGATGGAA	793	*RPS21*	TGACCCTTCTTCTCTTTCTAG
462	*BTF3*	ATAGCTGTGGATGGAAAAGCA	794	*RPS21*	TAGGTTGACAAGGTCACAGGC
463	*BTF3*	TACTCTTTTCCTTTTCCTAGA	795	*RPS21*	TTAAGGGTGAGTCAGATGATT
464	*BTF3*	CTTTTCCTAGATCTTGTGGAG	796	*RPS21*	CCCTGGTTCTAGGAACTTTTG
465	*BTF3*	CTAGATCTTGTGGAGAATTTT	797	*RPS21*	AGACGATGCCATCGGCCTTGG
466	*BTF3*	ATACTTGCCTCTTCAATACCA	798	*SERF2*	ATTTTCTTTCCTTAGGCGGTA
467	*E2F4*	GGGGCTATCATTGTAGTGAGT	799	*SERF2*	TTTCCTTAGGCGGTAACCAGC
468	*E2F4*	AGCCCATCAAGGCAGACCCCA	800	*SERF2*	CTTAGGCGGTAACCAGCGTGA
469	*E2F4*	AGTTTTGGAACTCCCCAAAGA	801	*SERF2*	TGCTGCCGCCCGCAAGCAGAG
470	*E2F4*	GAACTCCCCAAAGAGCTGTCA	802	*SERF2*	ATATTCTTCTGGCGGGCGAGC
471	*E2F4*	CCCCTCTGCTTCGTCTTTCTC	803	*SERF2*	CCTTAACCGAGTCGCTCTGCT
472	*E2F4*	TCCACCCCCGGGAGACCACGA	804	*SERF2*	CCTCCCCTCCCTGGGGCTACC
473	*E2F4*	ATGTGCCTGTTCTCAACCTCT	805	*RPL7A*	TTTCCCCTCCTGCCTTTTAGG
474	*E2F4*	TGACAGCTCTTTGGGGAGTTC	806	*RPL7A*	CCCTCCTGCCTTTTAGGGAAG
475	*KIF11*	ACTAAGCTTAATTGCTTTCTG	807	*RPL7A*	GGGAAGACAAAGGCGCTTTGG
476	*KIF11*	TGGAACAGGATCTGAAACTGG	808	*RPL7A*	TCTTTTCAGATCCGCCGTCAC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
477	*KIF11*	TACCCATCAACACTGGTAAGA	809	*RPL7A*	AGATCCGCCGTCACTGGGGTG
478	*KIF11*	TTCTTTTAGGATGTGGATGTA	810	*RPL7A*	GGGCCAGGCTGTGTACTTACG
479	*KIF11*	GGATGTGGATGTAGAAGAGGC	811	*RPL7A*	GTGTAAAGCTGCCTCTTACCT
480	*KIF11*	CCGCCTTAAATCCACAGCATA	812	*HNRNPA2B1*	TAAATTACCTCCACCATATGG
481	*KIF11*	ATTAAGTTCTAGATTTTGTGC	813	*HNRNPA2B1*	CACTCTTCATTGGACCGTAGT
482	*KIF11*	TGGTTTCATTAAGTTCTAGAT	814	*HNRNPA2B1*	CAAAATCATTGTAATTTCCAC
483	*KIF11*	AGATCCTGTTCCAGAAAGCAA	815	*HNRNPA2B1*	TTACCTCCTCCATAGTTGTCA
484	*KIF11*	AAGTACCTGTTGGGATATCCA	816	*HNRNPA2B1*	CACCGCCACCACGTGAATCCC
485	*KIF11*	TCTTTTAAAGTACCTGTTGGG	817	*HNRNPA2B1*	GTGGTAGCAGGAACATGGGGG
486	*KIF11*	AGCTGATCAAGGAGATGTTCA	818	*HNRNPA2B1*	GAAATTATAACCAGCAACCTT
487	*KIF11*	CTTTTCAGCTGATCAAGGAGA	819	*HNRNPA2B1*	ATAGGAAATTATGGAAGTGGA
488	*KIF11*	GCATCATTAACAGCTCAGGCT	820	*HNRNPA2B1*	GAGGTAGCCCCGGTTATGGAG
489	*KIF11*	TGAACAGTTTAGCATCATTAA	821	*HNRNPA2B1*	TAATAGGTGGCAATTTTGGAG
490	*KIF11*	TTGTTTTCTGAACAGTTTAGC	822	*HNRNPA2B1*	GGGATGGCTATAATGGGTATG
491	*KIF11*	CCGGAATTGTCTCTTCTTTGT	823	*HNRNPA2B1*	GCCCCTAACAGATGGATATGG
492	*KIF11*	AATTTACCGGAATTGTCTCTT	824	*HNRNPA2B1*	GGACCAGGACCAGGAAGTAAC
493	*KIF11*	TCTTTTCCATGTGATTTTTTA	825	*HNRNPA2B1*	GGGATTCACGTGGTGGCGGTG
494	*KIF11*	TTTGTCTTTTCCATGTGATTT	826	*HNRNPA2B1*	GCTTTGGGGATTCACGTGGTG
495	*KIF11*	GACCTCTCCAGTGTGTTAATG	827	*HNRNPA2B1*	TTGTAGGCAACTTTGGCTTTG
496	*KIF11*	TTCCACTTTAGACCTCTCCAG	828	*HNRNPA2B1*	TCTAGACAAGAAATGCAGGAA
497	*KIF11*	TAACCAAGTGCTCTGTAGTTT	829	*RPL13A*	TCTAACAGAAAAAGCGGATGG
498	*RPL13*	TCTTCTAGGTCTATAAGAAGG	830	*RPL13A*	GCATAGCTCACCTTGTCGTAG
499	*RPL13*	AGTAAGTGTTCACTTACGTTC	831	*ENO1*	AGCAGGAGGCAGTTGCAGGAC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
500	*PFDN5*	CCTTAATTCTTGCTTCTCAGA	832	*ENO1*	TCCTTCCCAAGAATTGAAGAG
501	*PFDN5*	AGCTGAGCAATGGACGTGGAC	833	*ENO1*	CCTTTCTCCTTCCCAAGAATT
502	*PTMA*	AAGGACTTAAAGGAGAAGAAG	834	*ENO1*	TCCTAGATCAAGACTGGTGCC
503	*PTMA*	TGTCGAGGAGAATGAGGAAAA	835	*ENO1*	TTTTCTCCTAGATCAAGACTG
504	*PTMA*	ATTCTCTCCAGGTGAGGAAGA	836	*ENO1*	CTTAGTGGTGTCTATCGAAGA
505	*PTMA*	TCTGCTTAGGATGACGATGTC	837	*PPIA*	CTATATGTTGACAGGGTGGTG
506	*RPL11*	GCATCCGGAGAAATGAAAAGA	838	*PPIA*	AAGGTTGGATGGCAAGCATGT
507	*RPL11*	TCCACAGGTGCGGGAGTATGA	839	*CD81*	CCTGTGAGGTGGCCGCCGGCA
508	*RPL11*	AGCATCGCAGACAAGAAGCGC	840	*CD81*	ACCACCTCAGTGCTCAAGAAC
509	*RPL11*	AGTATGATGGGATCATCCTTC	841	*CD81*	TGTCCCTCGGGCAGCAACATC
510	*RPL11*	CGGATGCGAAGTTCCCGCATG	842	*RPL35*	TTGACAATGCGCCCCTCAGGC
511	*RPL11*	TCCGGATGCCAAAGGATCTGA	843	*RPL35*	TAGCCGAGTCGTCCGGAAATC
512	*RPL11*	ATTTCTCCGGATGCCAAAGGA	844	*DAD1*	TTCTGTGGGTTGATCTGTATT
513	*RPL11*	GACCCTTCTCCAAGATTTCTT	845	*DAD1*	CCAGCACCATCCTGCACCTTG
514	*RPL11*	TTAACTCATACTCCCGCACCT	846	*DAD1*	TCTTTGCCAGCACCATCCTGC
515	*RPL11*	CCTTCTGCTGGAACCAGCGCA	847	*DAD1*	CTGATTTTCTCTTTGCCAGCA
516	*COX7C*	TCTTTTTTTCCAACAGAATTT	848	*DAD1*	CAAGGCATCTCCCCAGAGCGA
517	*COX7C*	CAACAGAATTTGCCATTTTCA	849	*DAD1*	CCTGAGAATACAGATCAACCC
518	*RPL8*	TTGAGGCCCTCAGCACTAGTT	850	*DAD1*	CTTCTTGTGCAGTTTGCCTGA
519	*RPL8*	CGGCCAGCAGGGGCATCTCTG	851	*DAD1*	TGTTTTGCTTCTTGTGCAGTT
520	*RPL8*	TGGGTTACTTACATTCATGGC	852	*DAD1*	TCTCGGGCTTCATCTCTTGTG
521	*RPL8*	TCTGCCTGCAGCCTGTGGAGC	853	*DAD1*	GCGGTTCTTAGAAGAGTACTT
522	*RPL10*	TTCTCCCTACCTAGCCCTGGA	854	*UBA52*	TGAAGACCCTCACTGGCAAAA

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
523	*RPL10*	CATTGCTCCTTAGATCCACAT	855	*UBA52*	CCAGTGAGGGTCTTCACAAAG
524	*RPL32*	CCTCCCCAAAAGGAAGAGTTC	856	*UBA52*	TGGGCAAGCTGGCGGAGAGAA
525	*TBP*	CTGCGGTAATCATGAGGATAA	857	*UBA52*	ACCTTCTTCTTGGGACGCAGG
526	*TBP*	AGTTCTGGGAAAATGGTGTGC	858	*RPL30*	TAGGTGAAAAGGTTTACTTTT
527	*TBP*	CTTTCCCTAGTGAAGAACAGT	859	*RPL30*	TGATTTAAAAAGCATACCTGG
528	*TBP*	CCTAGTGAAGAACAGTCCAGA	860	*RPL30*	AAAAGCATACCTGGATCAATG
529	*TBP*	CAGCTAAGTTCTTGGACTTCA	861	*RPL30*	GGTGACTCTGACATCATTAGA
530	*TBP*	CTATAAGGTTAGAAGGCCTTG	862	*RPL30*	TTTTTTAGGTGACTCTGACAT
531	*TBP*	CAATTTTCCTTCTAGTTATGA	863	*RPL30*	TTTTTATTTTTTAGGTGACTC
532	*TBP*	CTTCTAGTTATGAGCCAGAGT	864	*RPL30*	GTTCCCAAAGGAAATCTGAAA
533	*TBP*	CTGGTTTAATCTACAGAATGA	865	*RPL30*	CCCATTTTGGTTCCCAAAGGA
534	*TBP*	ATCTACAGAATGATCAAACCC	866	*RPL30*	TAGAAAAAGTCGCTGGAGTCG
535	*TBP*	TTTCTGGAAAAGTTGTATTAA	867	*RPL30*	CTTTGTAGAAAAAGTCGCTGG
536	*TBP*	TGGAAAAGTTGTATTAACAGG	868	*RPL30*	ATGTTTGCTTTGTAGAAAAAG
537	*TBP*	GGTCAAGTTTACAACCAAGAT	869	*RNASEK*	CGCCTGCCGCCCCCGGATGGG
538	*TBP*	GGGCACGAAGTGCAATGGTCT	870	*RNASEK*	TCCCACCGCTTTCCGAGCCCG
539	*TBP*	CCAGAACTGAAAATCAGTGCC	871	*RNASEK*	CGAGCCCGCTTGCACCTCGGC
540	*TBP*	TTACGGCTACCTCTTGGCTCC	872	*RNASEK*	TGGCGTCGCTCCTGTGCTGTG
541	*TBP*	TTGCTGCCAGTCTGGACTGTT	873	*RPL38*	TGTTGCAGCCTCGGAAAATTG
542	*TBP*	AGACTTACCTACTAAATTGTT	874	*RPL38*	TCTCTTTCCCTCTAGGTTTGG
543	*TBP*	ATCATTCTGTAGATTAAACCA	875	*RPL38*	CCTCTAGGTTTGGCAGTGAAG
544	*TBP*	CAGAAACAAAAATAAGGAGAA	876	*RPL38*	GTCGGGCTGTGAGCAGGAAGT
545	*TBP*	AAATGCTTCATAAATTTCTGC	877	*MYL12B*	TTCTTTCTATTGTCTTCCAGG

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
546	*CD63*	CTCAGCCAGCCCCCAATCTTC	878	*MYL12B*	TATTGTCTTCCAGGCACCATT
547	*CD63*	TCCCAATCTGTGTAGTTAGCA	879	*MYL12B*	GCTAAAGTTCTTTCAGTCATC
548	*CD63*	GGGTAATTCTCCATCTGCTGC	880	*PFN1*	CCCATCAGCAGGACTAGCGCT
549	*CD63*	GGAATTGTCTTTGCCTGCTGC	881	*PFN1*	CTCCTCCTCCAGCGCTAGTCC
550	*CD63*	CTTCTAGGTTTTGGGAATTGT	882	*PFN1*	TCTTTCCTCCTCCTCCAGCGC
551	*CD63*	TGCCTGCCACCTTCAGGGCTG	883	*PFN1*	GCATGGATCTTCGTACCAAGA
552	*CD63*	AACGAGAAGGCGATCCATAAG	884	*RPS11*	TCCTCATAATCTGTAGACTGA
553	*CD63*	AGTGCTGTGGGGCTGCTAACT	885	*RPS11*	TCTTTCCTATCCTTTCAGGCT
554	*CD63*	TTCCCTCCCCCAGTTTAAGTG	886	*RPS11*	CTATCCTTTCAGGCTATTGAG
555	*CD63*	ATAACAACTTCCGGCAGCAGA	887	*RPS11*	AGGCTATTGAGGGCACCTACA
556	*CD63*	TGTCTCTTATCATGTTGGTGG	888	*RPS11*	TTCTGAGGTTCCCCGCACCTC

Пример 19. Вычислительный скрининг направляющих РНК для отбора путем нокина существенных генов

[0857] В настоящем примере описан способ вычислительного скрининга gRNA, которые с большей вероятностью могут подходить для применения в нацеливании на существенные гены с использованием описанных в данном документе способов отбора, подходящих для различных РНК-направляемых нуклеаз и их вариантов (например, вариантов Cas12a, таких как Mad7), при условии, что РНК-направляемые нуклеазы демонстрируют высокую эффективность разрезания. Для этого анализа отбирали gRNA Cas12b, Cas12e, Cas-Phi, Mad7 и SpyCas9, нацеленные на существенные гены, описанные в предыдущих примерах (GAPDH, TBP, E2F4, G6PD и KIF11), но подобный процесс может быть применен для идентификации gRNA для этих РНК-направляемых нуклеаз и в других существенных генах. Результаты этого скрининга обобщенно представлены в таблицах 18-22, эти gRNA способствуют расщеплению DNA в пределах последних 500 п. о. кодирующих последовательностей перечисленных существенных генов.

[0858] Потенциальные последовательности-мишени каждого из существенных генов в этом анализе (GAPDH, TBP, E2F4, G6PD и KIF11) создавали путем поиска нуклеазоспецифических PAM (ATTN, TTCN, TTN, TTN и NGG для Cas12b, Cas12e, CasΦ, Mad7 и SpyCas9 соответственно) с подходящими протоспейсерами, картированными на иллюстративную кодирующую область (мРНК-201). Транскрипты с названием, за которым следует "-201", отбирали в качестве иллюстративных для каждого гена (например, GAPDH-201). Информацию о гене (т. е. о кодирующей области) получали из файла аннотации генов GTF в GENCODE v.37. Потенциальные gRNA сначала искали в геномных областях генов-мишеней в эталонном геноме человека (hg38), и для дальнейшего анализа отбирали те идентифицированные gRNA, сайты разреза которых находились в пределах 500 п. о. от стоп-сайта иллюстративной кодирующей области. Затем gRNA-кандидаты сопоставляли с эталонным геномом человека (например, hg38) с помощью BWA Aln (максимальный допуск ошибок спаривания -n 2). Направляющие молекулы с потенциальными сайтами нецелевого связывания (т. е. сопоставление с несколькими геномными областями; качество картирования MAPQ < 30) отфильтровывали. Полученные в результате gRNA нацелены на существенные гены в пределах 500 пар кодирующих оснований от иллюстративного стоп-кодона и не имеют идентичных сайтов нецелевого связывания, аннотированных в геноме человека. Таким образом, gRNA в таблицах 18-22, соответствующие SEQ ID NO: 889-1885, являются отличными gRNA-кандидатами для применения описанных в данном документе способов отбора к GAPDH, TBP, E2F4, G6PD и KIF11.

Таблица 18. Направляющие РНК Cas12b

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
889	*GAPDH*	CCCAGCTCTCATACCATGAGTCC	917	*E2F4*	CCAGAGTGCATGAGCTCGGAGCT
890	*TBP*	TATCCACAGTGAATCTTGGTTGT	918	*E2F4*	TATCTACAACCTGGACGAGAGTG
891	*TBP*	CACTTCGTGCCCGAAACGCCGAA	919	*E2F4*	CCTGGACTTCTGCACTGCCAGGG
892	*TBP*	TCTCTGACCATTGTAGCGGTTTG	920	*E2F4*	CTGACAGCTCTTTGGGGAGTTCC
893	*TBP*	TAGCGGTTTGCTGCGGTAATCAT	921	*G6PD*	AGCTGGAGAAGCCCAAGCCCATC
894	*TBP*	TCAGTTCTGGGAAAATGGTGTGC	922	*G6PD*	TCACCCCACTGCTGCACCAGATT
895	*TBP*	AGAATATGGTGGGGAGCTGTGAT	923	*KIF11*	ATGAAGATAAATTGATAGCACAA
896	*TBP*	TCCTTCTAGTTATGAGCCAGAGT	924	*KIF11*	ATAGCACAAAATCTAGAACTTAA
897	*TBP*	CCTGGTTTAATCTACAGAATGAT	925	*KIF11*	GTTTGACTAAGCTTAATTGCTTT
898	*TBP*	TTCTCCTTATTTTTGTTTCTGGA	926	*KIF11*	CTTTCTGGAACAGGATCTGAAAC
899	*TBP*	TTGTTTCTGGAAAAGTTGTATTA	927	*KIF11*	ATACCCATCAACACTGGTAAGAA
900	*TBP*	ATGAAGCATTTGAAAACATCTAC	928	*KIF11*	TTCATCAATTGGCGGGGTTCCAT
901	*TBP*	TAAAGGGATTCAGGAAGACGACG	929	*KIF11*	GCGGGGTTCCATTTTTCCAGGTA
902	*TBP*	GGCGTTTCGGGCACGAAGTGCAA	930	*KIF11*	TCCCGCCTTAAATCCACAGCATA
903	*TBP*	TATTCGGCGTTTCGGGCACGAAG	931	*KIF11*	ACACACTGGAGAGGTCTAAAGTG
904	*TBP*	AAATAGATCTAACCTTGGGATTA	932	*KIF11*	CCTCTGCGAGCCCAGATCAACCT
905	*TBP*	TCCCAGAACTGAAAATCAGTGCC	933	*KIF11*	AGTTCTAGATTTTGTGCTATCAA
906	*TBP*	CTTACGGCTACCTCTTGGCTCCT	934	*KIF11*	TTATGGTTTCATTAAGTTCTAGA
907	*TBP*	TCTTGCTGCCAGTCTGGACTGTT	935	*KIF11*	AGCTTAGTCAAACCAATTTTTAT
908	*TBP*	TGAATCTTGAAGTCCAAGAACTT	936	*KIF11*	CTCTTTTAAAGTACCTGTTGGGA
909	*TBP*	TTGGTGGGTGAGCACAAGGCCTT	937	*KIF11*	TATTTCTCTTTTAAAGTACCTGT
910	*TBP*	CAGACTTACCTACTAAATTGTTG	938	*KIF11*	ACAGCTCAGGCTGTTTCCTTTTC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
911	*TBP*	AACCAGGAAATAACTCTGGCTCA	939	*KIF11*	TCTCTTCTTTGTTGTTTTCTGAA
912	*TBP*	TGTAGATTAAACCAGGAAATAAC	940	*KIF11*	ACCGGAATTGTCTCTTCTTTGTT
913	*TBP*	TGGGTTTGATCATTCTGTAGATT	941	*KIF11*	ATGAACAATCCACACCAGCATCT
914	*TBP*	CTGCTCTGACTTTAGCACCTAAG	942	*KIF11*	AAGGTTGATCTGGGCTCGCAGAG
915	*TBP*	CGTCGTCTTCCTGAATCCCTTTA	943	*KIF11*	CCAACCCCCAAGTGAATTAAAGG
916	*E2F4*	TAGTGAGTGGCGGCCCTGGGACT	-	-	-

Таблица 19. Направляющие РНК Cas12e

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
944	*GAPDH*	TCTTCTAGGTATGACAACGAA	993	*E2F4*	CTGGACTTCTGCACTGCCAGG
945	*GAPDH*	CCAGCTCTCATACCATGAGTC	994	*E2F4*	GACAGCTCTTTGGGGAGTTCC
946	*TBP*	TGCCCGAAACGCCGAATATAA	995	*E2F4*	GAGGACATCAACTCCTCCAGC
947	*TBP*	CTCTGACCATTGTAGCGGTTT	996	*E2F4*	AGGGCCACCCACCTTCTGAGG
948	*TBP*	GTTCTGGGAAAATGGTGTGCA	997	*E2F4*	CTCTCGTCCAGGTTGTAGATA
949	*TBP*	GGGAAAATGGTGTGCACAGGA	998	*G6PD*	CCCACTTGTAGGTGCCCTCAT
950	*TBP*	TTTCCCTAGTGAAGAACAGTC	999	*G6PD*	TCAGCTCGTCTGCCTCCGTGG
951	*TBP*	CTAGTGAAGAACAGTCCAGAC	1000	*G6PD*	TCACCTGCCATAAATATAGGG
952	*TBP*	AGCTAAGTTCTTGGACTTCAA	1001	*G6PD*	CCAGCTCAATCTGGTGCAGCA
953	*TBP*	TGGACTTCAAGATTCAGAATA	1002	*G6PD*	CTGTAGGGCACCTTGTATCTG
954	*TBP*	AGATTCAGAATATGGTGGGGA	1003	*G6PD*	TGGTCATCATCTTGGTGTACA
955	*TBP*	GAATATGGTGGGGAGCTGTGA	1004	*G6PD*	GGGCCTTGCCGCAGCGCAGGA
956	*TBP*	TATAAGGTTAGAAGGCCTTGT	1005	*G6PD*	AGTATGAGGGCACCTACAAGT
957	*TBP*	TTCTAGTTATGAGCCAGAGTT	1006	*G6PD*	CCCCACTGCTGCACCAGATTG
958	*TBP*	AGTTATGAGCCAGAGTTATTT	1007	*G6PD*	GCGGGAGCCAGATGCACTTCG
959	*TBP*	TGGTTTAATCTACAGAATGAT	1008	*G6PD*	ACCCCGAGGAGTCGGAGCTGG
960	*TBP*	CCTTATTTTTGTTTCTGGAAA	1009	*G6PD*	TCAACCCCGAGGAGTCGGAGC
961	*TBP*	GGAAAAGTTGTATTAACAGGT	1010	*G6PD*	ACCAGCAGTGCAAGCGCAACG
962	*TBP*	TAGGTGCTAAAGTCAGAGCAG	1011	*G6PD*	ATGATGTGGCCGGCGACATCT
963	*TBP*	AAAGGGATTCAGGAAGACGAC	1012	*G6PD*	TCCTGCGCTGCGGCAAGGCCC
964	*TBP*	GGCACGAAGTGCAATGGTCTT	1013	*G6PD*	GCCACGTAGGGGTGCCCTTCA
965	*TBP*	GCGTTTCGGGCACGAAGTGCA	1014	*KIF11*	GGAACAGGATCTGAAACTGGA

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
966	*TBP*	TGGCTCTCTTATCCTCATGAT	1015	*KIF11*	GAAAACAACAAAGAAGAGACA
967	*TBP*	CAGAACTGAAAATCAGTGCCG	1016	*KIF11*	TCTTTTAGGATGTGGATGTAG
968	*TBP*	TACGGCTACCTCTTGGCTCCT	1017	*KIF11*	TTTAGGATGTGGATGTAGAAG
969	*TBP*	TGCTGCCAGTCTGGACTGTTC	1018	*KIF11*	GGGGCAGTATACTGAAGAACC
970	*TBP*	GTACAACTCTAGCATATTTTC	1019	*KIF11*	TCAATTGGCGGGGTTCCATTT
971	*TBP*	GAATCTTGAAGTCCAAGAACT	1020	*KIF11*	CGCCTTAAATCCACAGCATAA
972	*TBP*	CATCACAGCTCCCCACCATAT	1021	*KIF11*	AGATTTTGTGCTATCAATTTA
973	*TBP*	AACCTTATAGGAAACTTCACA	1022	*KIF11*	TTAAGTTCTAGATTTTGTGCT
974	*TBP*	GACTTACCTACTAAATTGTTG	1023	*KIF11*	AGAAAGCAATTAAGCTTAGTC
975	*TBP*	GTAGATTAAACCAGGAAATAA	1024	*KIF11*	GATCCTGTTCCAGAAAGCAAT
976	*TBP*	GGGTTTGATCATTCTGTAGAT	1025	*KIF11*	CTTTTAAAGTACCTGTTGGGA
977	*TBP*	AGAAACAAAAATAAGGAGAAC	1026	*KIF11*	ATTTCTCTTTTAAAGTACCTG
978	*TBP*	TGTTACAACTTACCTGTTAAT	1027	*KIF11*	TCTGTGGTGTCGTACCTTTAA
979	*TBP*	GCTCTGACTTTAGCACCTAAG	1028	*KIF11*	TACCAGTGTTGATGGGTATAA
980	*TBP*	TAAATTTCTGCTCTGACTTTA	1029	*KIF11*	GTTCTTACCAGTGTTGATGGG
981	*TBP*	AATGCTTCATAAATTTCTGCT	1030	*KIF11*	CGTGGTTCAGTTCTTACCAGT
982	*TBP*	TGAATCCCTTTAGAATAGGGT	1031	*KIF11*	GCTGATCAAGGAGATGTTCAC
983	*E2F4*	CTCCCACTGGGCCCAACAACA	1032	*KIF11*	TTTTCAGCTGATCAAGGAGAT
984	*E2F4*	GCCCTGCTGGACAGCAGCAGC	1033	*KIF11*	GAACAGTTTAGCATCATTAAC
985	*E2F4*	TCCGGACCCAACCCTTCTACC	1034	*KIF11*	TTGTTGTTTTCTGAACAGTTT
986	*E2F4*	ACCTCCTTTGAGCCCATCAAG	1035	*KIF11*	GTATACTGCCCCAGAACTGCC
987	*E2F4*	TGTTTTTCAGTTTTGGAACTC	1036	*KIF11*	TCAGTATACTGCCCCAGAACT
988	*E2F4*	GTTTTGGAACTCCCCAAAGAG	1037	*KIF11*	ATGTGATTTTTTATGCTGTGG

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
989	*E2F4*	CAGAGTGCATGAGCTCGGAGC	1038	*KIF11*	TTGTCTTTTCCATGTGATTTT
990	*E2F4*	TCTTTCTCCACCCCCGGGAGA	1039	*KIF11*	ACTTTAGACCTCTCCAGTGTG
991	*E2F4*	CCACCCCCGGGAGACCACGAT	1040	*KIF11*	TCCACTTTAGACCTCTCCAGT
992	*E2F4*	GCACTGCCAGGGACAGCAGTG	-	-	-

Таблица 20. Направляющие РНК Cas-Phi

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1041	*GAPDH*	TGCAGACCACAGTCCATGCCA	1192	*E2F4*	ATGGGCTCAAAGGAGGTAGAA
1042	*GAPDH*	GCAGACCACAGTCCATGCCAT	1193	*E2F4*	TGACAGCTCTTTGGGGAGTTC
1043	*GAPDH*	CAGACCACAGTCCATGCCATC	1194	*E2F4*	CTGACAGCTCTTTGGGGAGTT
1044	*GAPDH*	TCATCTTCTAGGTATGACAAC	1195	*E2F4*	TGAGGACATCAACTCCTCCAG
1045	*GAPDH*	CATCTTCTAGGTATGACAACG	1196	*E2F4*	CAGGGCCACCCACCTTCTGAG
1046	*GAPDH*	ATCTTCTAGGTATGACAACGA	1197	*E2F4*	TAGATATAATCGTGGTCTCCC
1047	*GAPDH*	TAGGTATGACAACGAATTTGG	1198	*E2F4*	ACTCTCGTCCAGGTTGTAGAT
1048	*GAPDH*	CCCAGCTCTCATACCATGAGT	1199	*G6PD*	TGGGGGTTCACCCACTTGTAG
1049	*TBP*	TATCCACAGTGAATCTTGGTT	1200	*G6PD*	ACCCACTTGTAGGTGCCCTCA
1050	*TBP*	GTTGTAAACTTGACCTAAAGA	1201	*G6PD*	TAGGTGCCCTCATACTGGAAA
1051	*TBP*	TAAACTTGACCTAAAGACCAT	1202	*G6PD*	ATCAGCTCGTCTGCCTCCGTG
1052	*TBP*	ACCTAAAGACCATTGCACTTC	1203	*G6PD*	CCTCACCTGCCATAAATATAG
1053	*TBP*	CACTTCGTGCCCGAAACGCCG	1204	*G6PD*	CTCACCTGCCATAAATATAGG
1054	*TBP*	GTGCCCGAAACGCCGAATATA	1205	*G6PD*	GGCTTCTCCAGCTCAATCTGG
1055	*TBP*	TCTCTGACCATTGTAGCGGTT	1206	*G6PD*	TCCAGCTCAATCTGGTGCAGC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1056	*TBP*	TAGCGGTTTGCTGCGGTAATC	1207	*G6PD*	TCTGTAGGGCACCTTGTATCT
1057	*TBP*	GCTGCGGTAATCATGAGGATA	1208	*G6PD*	TATCTGTTGCCGTAGGTCAGG
1058	*TBP*	CTGCGGTAATCATGAGGATAA	1209	*G6PD*	CCGTAGGTCAGGTCCAGCTCC
1059	*TBP*	TCAGTTCTGGGAAAATGGTGT	1210	*G6PD*	AAGAACATGCCCGGCTTCTTG
1060	*TBP*	CAGTTCTGGGAAAATGGTGTG	1211	*G6PD*	TTGGTCATCATCTTGGTGTAC
1061	*TBP*	AGTTCTGGGAAAATGGTGTGC	1212	*G6PD*	GTCATCATCTTGGTGTACACG
1062	*TBP*	TGGGAAAATGGTGTGCACAGG	1213	*G6PD*	GTGTACACGGCCTCGTTGGGC
1063	*TBP*	TTTCCTTTCCCTAGTGAAGAA	1214	*G6PD*	GGCTGCACGCGGATCACCAGC
1064	*TBP*	TTCCTTTCCCTAGTGAAGAAC	1215	*G6PD*	CGCTTGCACTGCTGGTGGAAG
1065	*TBP*	TCCTTTCCCTAGTGAAGAACA	1216	*G6PD*	CACTGCTGGTGGAAGATGTCG
1066	*TBP*	CCTTTCCCTAGTGAAGAACAG	1217	*G6PD*	CGCTCGTTCAGGGCCTTGCCG
1067	*TBP*	CTTTCCCTAGTGAAGAACAGT	1218	*G6PD*	AGGGCCTTGCCGCAGCGCAGG
1068	*TBP*	CCCTAGTGAAGAACAGTCCAG	1219	*G6PD*	CCGCAGCGCAGGATGAAGGGC
1069	*TBP*	CCTAGTGAAGAACAGTCCAGA	1220	*G6PD*	CAGTATGAGGGCACCTACAAG
1070	*TBP*	TACAGAAGTTGGGTTTTCCAG	1221	*G6PD*	CCAGTATGAGGGCACCTACAA
1071	*TBP*	GGTTTTCCAGCTAAGTTCTTG	1222	*G6PD*	AGCTGGAGAAGCCCAAGCCCA
1072	*TBP*	TCCAGCTAAGTTCTTGGACTT	1223	*G6PD*	ACCCCACTGCTGCACCAGATT
1073	*TBP*	CCAGCTAAGTTCTTGGACTTC	1224	*G6PD*	CACCCCACTGCTGCACCAGAT
1074	*TBP*	CAGCTAAGTTCTTGGACTTCA	1225	*G6PD*	TCACCCCACTGCTGCACCAGA
1075	*TBP*	TTGGACTTCAAGATTCAGAAT	1226	*G6PD*	TGCGGGAGCCAGATGCACTTC
1076	*TBP*	GACTTCAAGATTCAGAATATG	1227	*G6PD*	AACCCCGAGGAGTCGGAGCTG
1077	*TBP*	AAGATTCAGAATATGGTGGGG	1228	*G6PD*	TTCAACCCCGAGGAGTCGGAG
1078	*TBP*	AGAATATGGTGGGGAGCTGTG	1229	*G6PD*	CACCAGCAGTGCAAGCGCAAC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1079	*TBP*	CCTATAAGGTTAGAAGGCCTT	1230	*G6PD*	CATGATGTGGCCGGCGACATC
1080	*TBP*	CTATAAGGTTAGAAGGCCTTG	1231	*G6PD*	ATCCTGCGCTGCGGCAAGGCC
1081	*TBP*	TGCTCACCCACCAACAATTTA	1232	*G6PD*	CGCCACGTAGGGGTGCCCTTC
1082	*TBP*	TTGCAATTTTCCTTCTAGTTA	1233	*G6PD*	CCGCCACGTAGGGGTGCCCTT
1083	*TBP*	TGCAATTTTCCTTCTAGTTAT	1234	*KIF11*	ATGAAGATAAATTGATAGCAC
1084	*TBP*	GCAATTTTCCTTCTAGTTATG	1235	*KIF11*	ATAGCACAAAATCTAGAACTT
1085	*TBP*	CAATTTTCCTTCTAGTTATGA	1236	*KIF11*	ATGAAACCATAAAAATTGGTT
1086	*TBP*	TCCTTCTAGTTATGAGCCAGA	1237	*KIF11*	GTTTGACTAAGCTTAATTGCT
1087	*TBP*	CCTTCTAGTTATGAGCCAGAG	1238	*KIF11*	GACTAAGCTTAATTGCTTTCT
1088	*TBP*	CTTCTAGTTATGAGCCAGAGT	1239	*KIF11*	ACTAAGCTTAATTGCTTTCTG
1089	*TBP*	TAGTTATGAGCCAGAGTTATT	1240	*KIF11*	ATTGCTTTCTGGAACAGGATC
1090	*TBP*	TGAGCCAGAGTTATTTCCTGG	1241	*KIF11*	CTTTCTGGAACAGGATCTGAA
1091	*TBP*	CCTGGTTTAATCTACAGAATG	1242	*KIF11*	CTGGAACAGGATCTGAAACTG
1092	*TBP*	CTGGTTTAATCTACAGAATGA	1243	*KIF11*	TGGAACAGGATCTGAAACTGG
1093	*TBP*	AATCTACAGAATGATCAAACC	1244	*KIF11*	TCTAATGTCCGTTAAAGGTAC
1094	*TBP*	ATCTACAGAATGATCAAACCC	1245	*KIF11*	AAGGTACGACACCACAGAGGA
1095	*TBP*	TTCTCCTTATTTTTGTTTCTG	1246	*KIF11*	TTTATACCCATCAACACTGGT
1096	*TBP*	TCCTTATTTTTGTTTCTGGAA	1247	*KIF11*	ATACCCATCAACACTGGTAAG
1097	*TBP*	TTTTTGTTTCTGGAAAAGTTG	1248	*KIF11*	TACCCATCAACACTGGTAAGA
1098	*TBP*	TTGTTTCTGGAAAAGTTGTAT	1249	*KIF11*	ATCAGCTGAAAAGGAAACAGC
1099	*TBP*	TGTTTCTGGAAAAGTTGTATT	1250	*KIF11*	ATGATGCTAAACTGTTCAGAA
1100	*TBP*	GTTTCTGGAAAAGTTGTATTA	1251	*KIF11*	AGAAAACAACAAAGAAGAGAC
1101	*TBP*	TTTCTGGAAAAGTTGTATTAA	1252	*KIF11*	CTTCTTTTAGGATGTGGATGT

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1102	*TBP*	CTGGAAAAGTTGTATTAACAG	1253	*KIF11*	TTCTTTTAGGATGTGGATGTA
1103	*TBP*	TGGAAAAGTTGTATTAACAGG	1254	*KIF11*	TTTTAGGATGTGGATGTAGAA
1104	*TBP*	TCTTCTTAGGTGCTAAAGTCA	1255	*KIF11*	TAGGATGTGGATGTAGAAGAG
1105	*TBP*	TTAGGTGCTAAAGTCAGAGCA	1256	*KIF11*	AGGATGTGGATGTAGAAGAGG
1106	*TBP*	GGTGCTAAAGTCAGAGCAGAA	1257	*KIF11*	GGATGTGGATGTAGAAGAGGC
1107	*TBP*	TAAAGGGATTCAGGAAGACGA	1258	*KIF11*	TGGGGCAGTATACTGAAGAAC
1108	*TBP*	GGTCAAGTTTACAACCAAGAT	1259	*KIF11*	TTCATCAATTGGCGGGGTTCC
1109	*TBP*	AGGTCAAGTTTACAACCAAGA	1260	*KIF11*	ATCAATTGGCGGGGTTCCATT
1110	*TBP*	GGGCACGAAGTGCAATGGTCT	1261	*KIF11*	GCGGGGTTCCATTTTTCCAGG
1111	*TBP*	CGGGCACGAAGTGCAATGGTC	1262	*KIF11*	TCCCGCCTTAAATCCACAGCA
1112	*TBP*	GGCGTTTCGGGCACGAAGTGC	1263	*KIF11*	CCCGCCTTAAATCCACAGCAT
1113	*TBP*	TATTCGGCGTTTCGGGCACGA	1264	*KIF11*	CCGCCTTAAATCCACAGCATA
1114	*TBP*	GGATTATATTCGGCGTTTCGG	1265	*KIF11*	AATCCACAGCATAAAAAATCA
1115	*TBP*	AAATAGATCTAACCTTGGGAT	1266	*KIF11*	ACACACTGGAGAGGTCTAAAG
1116	*TBP*	TCCTCATGATTACCGCAGCAA	1267	*KIF11*	GTTACAAAGAGCAGATTACCT
1117	*TBP*	GTGGCTCTCTTATCCTCATGA	1268	*KIF11*	CAAAGAGCAGATTACCTCTGC
1118	*TBP*	CCAGAACTGAAAATCAGTGCC	1269	*KIF11*	CCTCTGCGAGCCCAGATCAAC
1119	*TBP*	CCCAGAACTGAAAATCAGTGC	1270	*KIF11*	TAGATTTTGTGCTATCAATTT
1120	*TBP*	TCCCAGAACTGAAAATCAGTG	1271	*KIF11*	AGTTCTAGATTTTGTGCTATC
1121	*TBP*	GCTCCTGTGCACACCATTTTC	1272	*KIF11*	ATTAAGTTCTAGATTTTGTGC
1122	*TBP*	CGGCTACCTCTTGGCTCCTGT	1273	*KIF11*	CATTAAGTTCTAGATTTTGTG
1123	*TBP*	TTACGGCTACCTCTTGGCTCC	1274	*KIF11*	TGGTTTCATTAAGTTCTAGAT
1124	*TBP*	CTTACGGCTACCTCTTGGCTC	1275	*KIF11*	ATGGTTTCATTAAGTTCTAGA

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1125	*TBP*	CTGCCAGTCTGGACTGTTCTT	1276	*KIF11*	TATGGTTTCATTAAGTTCTAG
1126	*TBP*	TTGCTGCCAGTCTGGACTGTT	1277	*KIF11*	TTATGGTTTCATTAAGTTCTA
1127	*TBP*	CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT	1278	*KIF11*	GTCAAACCAATTTTTATGGTT
1128	*TBP*	TCTTGCTGCCAGTCTGGACTG	1279	*KIF11*	AGCTTAGTCAAACCAATTTTT
1129	*TBP*	TGTACAACTCTAGCATATTTT	1280	*KIF11*	CAGAAAGCAATTAAGCTTAGT
1130	*TBP*	GCTGGAAAACCCAACTTCTGT	1281	*KIF11*	AGATCCTGTTCCAGAAAGCAA
1131	*TBP*	AAGTCCAAGAACTTAGCTGGA	1282	*KIF11*	CAGATCCTGTTCCAGAAAGCA
1132	*TBP*	TGAATCTTGAAGTCCAAGAAC	1283	*KIF11*	GGATATCCAGTTTCAGATCCT
1133	*TBP*	ACATCACAGCTCCCCACCATA	1284	*KIF11*	AAGTACCTGTTGGGATATCCA
1134	*TBP*	TAACCTTATAGGAAACTTCAC	1285	*KIF11*	AAAGTACCTGTTGGGATATCC
1135	*TBP*	GTGGGTGAGCACAAGGCCTTC	1286	*KIF11*	TAAAGTACCTGTTGGGATATC
1136	*TBP*	TTGGTGGGTGAGCACAAGGCC	1287	*KIF11*	TCTTTTAAAGTACCTGTTGGG
1137	*TBP*	CCTACTAAATTGTTGGTGGGT	1288	*KIF11*	CTCTTTTAAAGTACCTGTTGG
1138	*TBP*	AGACTTACCTACTAAATTGTT	1289	*KIF11*	TATTTCTCTTTTAAAGTACCT
1139	*TBP*	CAGACTTACCTACTAAATTGT	1290	*KIF11*	CTCTGTGGTGTCGTACCTTTA
1140	*TBP*	AACCAGGAAATAACTCTGGCT	1291	*KIF11*	CCTCTGTGGTGTCGTACCTTT
1141	*TBP*	TGTAGATTAAACCAGGAAATA	1292	*KIF11*	TCCTCTGTGGTGTCGTACCTT
1142	*TBP*	ATCATTCTGTAGATTAAACCA	1293	*KIF11*	ATGGGTATAAATAACTTTTCC
1143	*TBP*	GATCATTCTGTAGATTAAACC	1294	*KIF11*	CCAGTGTTGATGGGTATAAAT
1144	*TBP*	TGGGTTTGATCATTCTGTAGA	1295	*KIF11*	TTACCAGTGTTGATGGGTATA
1145	*TBP*	CAGAAACAAAAATAAGGAGAA	1296	*KIF11*	AGTTCTTACCAGTGTTGATGG
1146	*TBP*	CCAGAAACAAAAATAAGGAGA	1297	*KIF11*	ACGTGGTTCAGTTCTTACCAG
1147	*TBP*	TCCAGAAACAAAAATAAGGAG	1298	*KIF11*	AGCTGATCAAGGAGATGTTCA

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1148	*TBP*	ATACAACTTTTCCAGAAACAA	1299	*KIF11*	CAGCTGATCAAGGAGATGTTC
1149	*TBP*	CCTGTTAATACAACTTTTCCA	1300	*KIF11*	TCAGCTGATCAAGGAGATGTT
1150	*TBP*	CAACTTACCTGTTAATACAAC	1301	*KIF11*	CTTTTCAGCTGATCAAGGAGA
1151	*TBP*	CTGTTACAACTTACCTGTTAA	1302	*KIF11*	CCTTTTCAGCTGATCAAGGAG
1152	*TBP*	TGCTCTGACTTTAGCACCTAA	1303	*KIF11*	ACAGCTCAGGCTGTTTCCTTT
1153	*TBP*	CTGCTCTGACTTTAGCACCTA	1304	*KIF11*	GCATCATTAACAGCTCAGGCT
1154	*TBP*	ATAAATTTCTGCTCTGACTTT	1305	*KIF11*	AGCATCATTAACAGCTCAGGC
1155	*TBP*	AAATGCTTCATAAATTTCTGC	1306	*KIF11*	TGAACAGTTTAGCATCATTAA
1156	*TBP*	CAAATGCTTCATAAATTTCTG	1307	*KIF11*	CTGAACAGTTTAGCATCATTA
1157	*TBP*	TCAAATGCTTCATAAATTTCT	1308	*KIF11*	TCTGAACAGTTTAGCATCATT
1158	*TBP*	CTGAATCCCTTTAGAATAGGG	1309	*KIF11*	TTTTCTGAACAGTTTAGCATC
1159	*TBP*	CGTCGTCTTCCTGAATCCCTT	1310	*KIF11*	TTGTTTTCTGAACAGTTTAGC
1160	*E2F4*	GGGGGCTATCATTGTAGTGAG	1311	*KIF11*	TTTGTTGTTTTCTGAACAGTT
1161	*E2F4*	GGGGCTATCATTGTAGTGAGT	1312	*KIF11*	TCTCTTCTTTGTTGTTTTCTG
1162	*E2F4*	TAGTGAGTGGCGGCCCTGGGA	1313	*KIF11*	CCGGAATTGTCTCTTCTTTGT
1163	*E2F4*	ACTCCCACTGGGCCCAACAAC	1314	*KIF11*	ACCGGAATTGTCTCTTCTTTG
1164	*E2F4*	TGCCCTGCTGGACAGCAGCAG	1315	*KIF11*	AATTTACCGGAATTGTCTCTT
1165	*E2F4*	GTCCGGACCCAACCCTTCTAC	1316	*KIF11*	AAATTTACCGGAATTGTCTCT
1166	*E2F4*	TACCTCCTTTGAGCCCATCAA	1317	*KIF11*	AGTATACTGCCCCAGAACTGC
1167	*E2F4*	GAGCCCATCAAGGCAGACCCC	1318	*KIF11*	TTCAGTATACTGCCCCAGAAC
1168	*E2F4*	AGCCCATCAAGGCAGACCCCA	1319	*KIF11*	GAGGTTCTTCAGTATACTGCC
1169	*E2F4*	CTTGTTTTTCAGTTTTGGAAC	1320	*KIF11*	ACTTAGAGGTTCTTCAGTATA
1170	*E2F4*	TTTTTCAGTTTTGGAACTCCC	1321	*KIF11*	ATGAACAATCCACACCAGCAT

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1171	*E2F4*	TTCAGTTTTGGAACTCCCCAA	1322	*KIF11*	TCTGATATGACATACCTGGAA
1172	*E2F4*	TCAGTTTTGGAACTCCCCAAA	1323	*KIF11*	CATGTGATTTTTTATGCTGTG
1173	*E2F4*	CAGTTTTGGAACTCCCCAAAG	1324	*KIF11*	CCATGTGATTTTTTATGCTGT
1174	*E2F4*	AGTTTTGGAACTCCCCAAAGA	1325	*KIF11*	TCCATGTGATTTTTTATGCTG
1175	*E2F4*	TGGAACTCCCCAAAGAGCTGT	1326	*KIF11*	TCTTTTCCATGTGATTTTTTA
1176	*E2F4*	GGAACTCCCCAAAGAGCTGTC	1327	*KIF11*	GTCTTTTCCATGTGATTTTTT
1177	*E2F4*	CCAGAGTGCATGAGCTCGGAG	1328	*KIF11*	TTTGTCTTTTCCATGTGATTT
1178	*E2F4*	GCCCCTCTGCTTCGTCTTTCT	1329	*KIF11*	CTTTGTCTTTTCCATGTGATT
1179	*E2F4*	CCCCTCTGCTTCGTCTTTCTC	1330	*KIF11*	TCTTTGTCTTTTCCATGTGAT
1180	*E2F4*	GTCTTTCTCCACCCCCGGGAG	1331	*KIF11*	ATGCCTCTGTTTTCTTTGTCT
1181	*E2F4*	CTCCACCCCCGGGAGACCACG	1332	*KIF11*	GACCTCTCCAGTGTGTTAATG
1182	*E2F4*	TCCACCCCCGGGAGACCACGA	1333	*KIF11*	AGACCTCTCCAGTGTGTTAAT
1183	*E2F4*	TATCTACAACCTGGACGAGAG	1334	*KIF11*	CACTTTAGACCTCTCCAGTGT
1184	*E2F4*	GATGTGCCTGTTCTCAACCTC	1335	*KIF11*	TTCCACTTTAGACCTCTCCAG
1185	*E2F4*	ATGTGCCTGTTCTCAACCTCT	1336	*KIF11*	CTTCCACTTTAGACCTCTCCA
1186	*E2F4*	TGCACTGCCAGGGACAGCAGT	1337	*KIF11*	TAACCAAGTGCTCTGTAGTTT
1187	*E2F4*	CCTGGACTTCTGCACTGCCAG	1338	*KIF11*	GTAACCAAGTGCTCTGTAGTT
1188	*E2F4*	CTATCAGTCCCAGGGCCGCCA	1339	*KIF11*	ATCTGGGCTCGCAGAGGTAAT
1189	*E2F4*	GGCCCAGTGGGAGTGAACTGA	1340	*KIF11*	AAGGTTGATCTGGGCTCGCAG
1190	*E2F4*	TTGGGCCCAGTGGGAGTGAAC	1341	*KIF11*	CCAACCCCCAAGTGAATTAAA
1191	*E2F4*	GGTCCGGACGAACTGCTGCTG	-	-	-

Таблица 21. Направляющие РНК Mad7

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1342	*GAPDH*	TGCAGACCACAGTCCATGCCA	1489	*E2F4*	TTGGGCCCAGTGGGAGTGAAC
1343	*GAPDH*	GCAGACCACAGTCCATGCCAT	1490	*E2F4*	GGTCCGGACGAACTGCTGCTG
1344	*GAPDH*	CAGACCACAGTCCATGCCATC	1491	*E2F4*	ATGGGCTCAAAGGAGGTAGAA
1345	*GAPDH*	TCATCTTCTAGGTATGACAAC	1492	*E2F4*	TGACAGCTCTTTGGGGAGTTC
1346	*GAPDH*	CATCTTCTAGGTATGACAACG	1493	*E2F4*	CTGACAGCTCTTTGGGGAGTT
1347	*GAPDH*	ATCTTCTAGGTATGACAACGA	1494	*E2F4*	TGAGGACATCAACTCCTCCAG
1348	*GAPDH*	TAGGTATGACAACGAATTTGG	1495	*E2F4*	CAGGGCCACCCACCTTCTGAG
1349	*GAPDH*	CCCAGCTCTCATACCATGAGT	1496	*E2F4*	TAGATATAATCGTGGTCTCCC
1350	*TBP*	TATCCACAGTGAATCTTGGTT	1497	*E2F4*	ACTCTCGTCCAGGTTGTAGAT
1351	*TBP*	GTTGTAAACTTGACCTAAAGA	1498	*G6PD*	TGGGGGTTCACCCACTTGTAG
1352	*TBP*	TAAACTTGACCTAAAGACCAT	1499	*G6PD*	ACCCACTTGTAGGTGCCCTCA
1353	*TBP*	ACCTAAAGACCATTGCACTTC	1500	*G6PD*	TAGGTGCCCTCATACTGGAAA
1354	*TBP*	CACTTCGTGCCCGAAACGCCG	1501	*G6PD*	ATCAGCTCGTCTGCCTCCGTG
1355	*TBP*	GTGCCCGAAACGCCGAATATA	1502	*G6PD*	CCTCACCTGCCATAAATATAG
1356	*TBP*	TCTCTGACCATTGTAGCGGTT	1503	*G6PD*	CTCACCTGCCATAAATATAGG
1357	*TBP*	TAGCGGTTTGCTGCGGTAATC	1504	*G6PD*	GGCTTCTCCAGCTCAATCTGG
1358	*TBP*	GCTGCGGTAATCATGAGGATA	1505	*G6PD*	TCCAGCTCAATCTGGTGCAGC
1359	*TBP*	CTGCGGTAATCATGAGGATAA	1506	*G6PD*	TCTGTAGGGCACCTTGTATCT
1360	*TBP*	TCAGTTCTGGGAAAATGGTGT	1507	*G6PD*	TATCTGTTGCCGTAGGTCAGG
1361	*TBP*	CAGTTCTGGGAAAATGGTGTG	1508	*G6PD*	CCGTAGGTCAGGTCCAGCTCC
1362	*TBP*	AGTTCTGGGAAAATGGTGTGC	1509	*G6PD*	AAGAACATGCCCGGCTTCTTG
1363	*TBP*	TGGGAAAATGGTGTGCACAGG	1510	*G6PD*	TTGGTCATCATCTTGGTGTAC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1364	*TBP*	TTTCCTTTCCCTAGTGAAGAA	1511	*G6PD*	GTCATCATCTTGGTGTACACG
1365	*TBP*	TTCCTTTCCCTAGTGAAGAAC	1512	*G6PD*	GTGTACACGGCCTCGTTGGGC
1366	*TBP*	TCCTTTCCCTAGTGAAGAACA	1513	*G6PD*	GGCTGCACGCGGATCACCAGC
1367	*TBP*	CCTTTCCCTAGTGAAGAACAG	1514	*G6PD*	CGCTTGCACTGCTGGTGGAAG
1368	*TBP*	CTTTCCCTAGTGAAGAACAGT	1515	*G6PD*	CACTGCTGGTGGAAGATGTCG
1369	*TBP*	CCCTAGTGAAGAACAGTCCAG	1516	*G6PD*	CGCTCGTTCAGGGCCTTGCCG
1370	*TBP*	CCTAGTGAAGAACAGTCCAGA	1517	*G6PD*	AGGGCCTTGCCGCAGCGCAGG
1371	*TBP*	TACAGAAGTTGGGTTTTCCAG	1518	*G6PD*	CCGCAGCGCAGGATGAAGGGC
1372	*TBP*	GGTTTTCCAGCTAAGTTCTTG	1519	*G6PD*	CAGTATGAGGGCACCTACAAG
1373	*TBP*	TCCAGCTAAGTTCTTGGACTT	1520	*G6PD*	CCAGTATGAGGGCACCTACAA
1374	*TBP*	CCAGCTAAGTTCTTGGACTTC	1521	*G6PD*	AGCTGGAGAAGCCCAAGCCCA
1375	*TBP*	CAGCTAAGTTCTTGGACTTCA	1522	*G6PD*	ACCCCACTGCTGCACCAGATT
1376	*TBP*	TTGGACTTCAAGATTCAGAAT	1523	*G6PD*	CACCCCACTGCTGCACCAGAT
1377	*TBP*	GACTTCAAGATTCAGAATATG	1524	*G6PD*	TCACCCCACTGCTGCACCAGA
1378	*TBP*	AAGATTCAGAATATGGTGGGG	1525	*G6PD*	TGCGGGAGCCAGATGCACTTC
1379	*TBP*	AGAATATGGTGGGGAGCTGTG	1526	*G6PD*	AACCCCGAGGAGTCGGAGCTG
1380	*TBP*	CCTATAAGGTTAGAAGGCCTT	1527	*G6PD*	TTCAACCCCGAGGAGTCGGAG
1381	*TBP*	CTATAAGGTTAGAAGGCCTTG	1528	*G6PD*	CACCAGCAGTGCAAGCGCAAC
1382	*TBP*	TGCTCACCCACCAACAATTTA	1529	*G6PD*	CATGATGTGGCCGGCGACATC
1383	*TBP*	TTGCAATTTTCCTTCTAGTTA	1530	*G6PD*	ATCCTGCGCTGCGGCAAGGCC
1384	*TBP*	TGCAATTTTCCTTCTAGTTAT	1531	*G6PD*	CGCCACGTAGGGGTGCCCTTC
1385	*TBP*	GCAATTTTCCTTCTAGTTATG	1532	*G6PD*	CCGCCACGTAGGGGTGCCCTT
1386	*TBP*	CAATTTTCCTTCTAGTTATGA	1533	*KIF11*	ATGAAGATAAATTGATAGCAC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1387	*TBP*	TCCTTCTAGTTATGAGCCAGA	1534	*KIF11*	ATAGCACAAAATCTAGAACTT
1388	*TBP*	CCTTCTAGTTATGAGCCAGAG	1535	*KIF11*	ATGAAACCATAAAAATTGGTT
1389	*TBP*	CTTCTAGTTATGAGCCAGAGT	1536	*KIF11*	GTTTGACTAAGCTTAATTGCT
1390	*TBP*	TAGTTATGAGCCAGAGTTATT	1537	*KIF11*	GACTAAGCTTAATTGCTTTCT
1391	*TBP*	TGAGCCAGAGTTATTTCCTGG	1538	*KIF11*	ACTAAGCTTAATTGCTTTCTG
1392	*TBP*	CCTGGTTTAATCTACAGAATG	1539	*KIF11*	ATTGCTTTCTGGAACAGGATC
1393	*TBP*	CTGGTTTAATCTACAGAATGA	1540	*KIF11*	CTTTCTGGAACAGGATCTGAA
1394	*TBP*	AATCTACAGAATGATCAAACC	1541	*KIF11*	CTGGAACAGGATCTGAAACTG
1395	*TBP*	ATCTACAGAATGATCAAACCC	1542	*KIF11*	TGGAACAGGATCTGAAACTGG
1396	*TBP*	TTCTCCTTATTTTTGTTTCTG	1543	*KIF11*	TCTAATGTCCGTTAAAGGTAC
1397	*TBP*	TCCTTATTTTTGTTTCTGGAA	1544	*KIF11*	AAGGTACGACACCACAGAGGA
1398	*TBP*	TTTTTGTTTCTGGAAAAGTTG	1545	*KIF11*	TTTATACCCATCAACACTGGT
1399	*TBP*	TTGTTTCTGGAAAAGTTGTAT	1546	*KIF11*	ATACCCATCAACACTGGTAAG
1400	*TBP*	TGTTTCTGGAAAAGTTGTATT	1547	*KIF11*	TACCCATCAACACTGGTAAGA
1401	*TBP*	GTTTCTGGAAAAGTTGTATTA	1548	*KIF11*	ATCAGCTGAAAAGGAAACAGC
1402	*TBP*	TTTCTGGAAAAGTTGTATTAA	1549	*KIF11*	ATGATGCTAAACTGTTCAGAA
1403	*TBP*	CTGGAAAAGTTGTATTAACAG	1550	*KIF11*	AGAAAACAACAAAGAAGAGAC
1404	*TBP*	TGGAAAAGTTGTATTAACAGG	1551	*KIF11*	CTTCTTTTAGGATGTGGATGT
1405	*TBP*	TCTTCTTAGGTGCTAAAGTCA	1552	*KIF11*	TTCTTTTAGGATGTGGATGTA
1406	*TBP*	TTAGGTGCTAAAGTCAGAGCA	1553	*KIF11*	TTTTAGGATGTGGATGTAGAA
1407	*TBP*	GGTGCTAAAGTCAGAGCAGAA	1554	*KIF11*	TAGGATGTGGATGTAGAAGAG
1408	*TBP*	TAAAGGGATTCAGGAAGACGA	1555	*KIF11*	AGGATGTGGATGTAGAAGAGG
1409	*TBP*	GGTCAAGTTTACAACCAAGAT	1556	*KIF11*	GGATGTGGATGTAGAAGAGGC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1410	*TBP*	AGGTCAAGTTTACAACCAAGA	1557	*KIF11*	TGGGGCAGTATACTGAAGAAC
1411	*TBP*	GGGCACGAAGTGCAATGGTCT	1558	*KIF11*	TTCATCAATTGGCGGGGTTCC
1412	*TBP*	CGGGCACGAAGTGCAATGGTC	1559	*KIF11*	ATCAATTGGCGGGGTTCCATT
1413	*TBP*	GGCGTTTCGGGCACGAAGTGC	1560	*KIF11*	GCGGGGTTCCATTTTTCCAGG
1414	*TBP*	TATTCGGCGTTTCGGGCACGA	1561	*KIF11*	TCCCGCCTTAAATCCACAGCA
1415	*TBP*	GGATTATATTCGGCGTTTCGG	1562	*KIF11*	CCCGCCTTAAATCCACAGCAT
1416	*TBP*	AAATAGATCTAACCTTGGGAT	1563	*KIF11*	CCGCCTTAAATCCACAGCATA
1417	*TBP*	TCCTCATGATTACCGCAGCAA	1564	*KIF11*	AATCCACAGCATAAAAAATCA
1418	*TBP*	GTGGCTCTCTTATCCTCATGA	1565	*KIF11*	ACACACTGGAGAGGTCTAAAG
1419	*TBP*	CCAGAACTGAAAATCAGTGCC	1566	*KIF11*	GTTACAAAGAGCAGATTACCT
1420	*TBP*	CCCAGAACTGAAAATCAGTGC	1567	*KIF11*	CAAAGAGCAGATTACCTCTGC
1421	*TBP*	TCCCAGAACTGAAAATCAGTG	1568	*KIF11*	CCTCTGCGAGCCCAGATCAAC
1422	*TBP*	GCTCCTGTGCACACCATTTTC	1569	*KIF11*	TAGATTTTGTGCTATCAATTT
1423	*TBP*	CGGCTACCTCTTGGCTCCTGT	1570	*KIF11*	AGTTCTAGATTTTGTGCTATC
1424	*TBP*	TTACGGCTACCTCTTGGCTCC	1571	*KIF11*	ATTAAGTTCTAGATTTTGTGC
1425	*TBP*	CTTACGGCTACCTCTTGGCTC	1572	*KIF11*	CATTAAGTTCTAGATTTTGTG
1426	*TBP*	CTGCCAGTCTGGACTGTTCTT	1573	*KIF11*	TGGTTTCATTAAGTTCTAGAT
1427	*TBP*	TTGCTGCCAGTCTGGACTGTT	1574	*KIF11*	ATGGTTTCATTAAGTTCTAGA
1428	*TBP*	CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT	1575	*KIF11*	TATGGTTTCATTAAGTTCTAG
1429	*TBP*	TCTTGCTGCCAGTCTGGACTG	1576	*KIF11*	TTATGGTTTCATTAAGTTCTA
1430	*TBP*	TGTACAACTCTAGCATATTTT	1577	*KIF11*	GTCAAACCAATTTTTATGGTT
1431	*TBP*	GCTGGAAAACCCAACTTCTGT	1578	*KIF11*	AGCTTAGTCAAACCAATTTTT
1432	*TBP*	AAGTCCAAGAACTTAGCTGGA	1579	*KIF11*	CAGAAAGCAATTAAGCTTAGT

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1433	*TBP*	TGAATCTTGAAGTCCAAGAAC	1580	*KIF11*	AGATCCTGTTCCAGAAAGCAA
1434	*TBP*	ACATCACAGCTCCCCACCATA	1581	*KIF11*	CAGATCCTGTTCCAGAAAGCA
1435	*TBP*	TAACCTTATAGGAAACTTCAC	1582	*KIF11*	GGATATCCAGTTTCAGATCCT
1436	*TBP*	GTGGGTGAGCACAAGGCCTTC	1583	*KIF11*	AAGTACCTGTTGGGATATCCA
1437	*TBP*	TTGGTGGGTGAGCACAAGGCC	1584	*KIF11*	AAAGTACCTGTTGGGATATCC
1438	*TBP*	CCTACTAAATTGTTGGTGGGT	1585	*KIF11*	TAAAGTACCTGTTGGGATATC
1439	*TBP*	AGACTTACCTACTAAATTGTT	1586	*KIF11*	TCTTTTAAAGTACCTGTTGGG
1440	*TBP*	CAGACTTACCTACTAAATTGT	1587	*KIF11*	CTCTTTTAAAGTACCTGTTGG
1441	*TBP*	AACCAGGAAATAACTCTGGCT	1588	*KIF11*	TATTTCTCTTTTAAAGTACCT
1442	*TBP*	TGTAGATTAAACCAGGAAATA	1589	*KIF11*	ATGGGTATAAATAACTTTTCC
1443	*TBP*	ATCATTCTGTAGATTAAACCA	1590	*KIF11*	CCAGTGTTGATGGGTATAAAT
1444	*TBP*	GATCATTCTGTAGATTAAACC	1591	*KIF11*	TTACCAGTGTTGATGGGTATA
1445	*TBP*	TGGGTTTGATCATTCTGTAGA	1592	*KIF11*	AGTTCTTACCAGTGTTGATGG
1446	*TBP*	CAGAAACAAAAATAAGGAGAA	1593	*KIF11*	ACGTGGTTCAGTTCTTACCAG
1447	*TBP*	CCAGAAACAAAAATAAGGAGA	1594	*KIF11*	AGCTGATCAAGGAGATGTTCA
1448	*TBP*	TCCAGAAACAAAAATAAGGAG	1595	*KIF11*	CAGCTGATCAAGGAGATGTTC
1449	*TBP*	ATACAACTTTTCCAGAAACAA	1596	*KIF11*	TCAGCTGATCAAGGAGATGTT
1450	*TBP*	CCTGTTAATACAACTTTTCCA	1597	*KIF11*	CTTTTCAGCTGATCAAGGAGA
1451	*TBP*	CAACTTACCTGTTAATACAAC	1598	*KIF11*	CCTTTTCAGCTGATCAAGGAG
1452	*TBP*	CTGTTACAACTTACCTGTTAA	1599	*KIF11*	ACAGCTCAGGCTGTTTCCTTT
1453	*TBP*	ATAAATTTCTGCTCTGACTTT	1600	*KIF11*	GCATCATTAACAGCTCAGGCT
1454	*TBP*	AAATGCTTCATAAATTTCTGC	1601	*KIF11*	AGCATCATTAACAGCTCAGGC
1455	*TBP*	CAAATGCTTCATAAATTTCTG	1602	*KIF11*	TGAACAGTTTAGCATCATTAA

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1456	*TBP*	TCAAATGCTTCATAAATTTCT	1603	*KIF11*	CTGAACAGTTTAGCATCATTA
1457	*TBP*	CTGAATCCCTTTAGAATAGGG	1604	*KIF11*	TCTGAACAGTTTAGCATCATT
1458	*TBP*	CGTCGTCTTCCTGAATCCCTT	1605	*KIF11*	TTTTCTGAACAGTTTAGCATC
1459	*E2F4*	GGGGGCTATCATTGTAGTGAG	1606	*KIF11*	TTGTTTTCTGAACAGTTTAGC
1460	*E2F4*	GGGGCTATCATTGTAGTGAGT	1607	*KIF11*	TTTGTTGTTTTCTGAACAGTT
1461	*E2F4*	TAGTGAGTGGCGGCCCTGGGA	1608	*KIF11*	TCTCTTCTTTGTTGTTTTCTG
1462	*E2F4*	ACTCCCACTGGGCCCAACAAC	1609	*KIF11*	CCGGAATTGTCTCTTCTTTGT
1463	*E2F4*	TGCCCTGCTGGACAGCAGCAG	1610	*KIF11*	ACCGGAATTGTCTCTTCTTTG
1464	*E2F4*	GTCCGGACCCAACCCTTCTAC	1611	*KIF11*	AATTTACCGGAATTGTCTCTT
1465	*E2F4*	TACCTCCTTTGAGCCCATCAA	1612	*KIF11*	AAATTTACCGGAATTGTCTCT
1466	*E2F4*	GAGCCCATCAAGGCAGACCCC	1613	*KIF11*	AGTATACTGCCCCAGAACTGC
1467	*E2F4*	AGCCCATCAAGGCAGACCCCA	1614	*KIF11*	TTCAGTATACTGCCCCAGAAC
1468	*E2F4*	CTTGTTTTTCAGTTTTGGAAC	1615	*KIF11*	GAGGTTCTTCAGTATACTGCC
1469	*E2F4*	TTTTTCAGTTTTGGAACTCCC	1616	*KIF11*	ACTTAGAGGTTCTTCAGTATA
1470	*E2F4*	TTCAGTTTTGGAACTCCCCAA	1617	*KIF11*	ATGAACAATCCACACCAGCAT
1471	*E2F4*	TCAGTTTTGGAACTCCCCAAA	1618	*KIF11*	TCTGATATGACATACCTGGAA
1472	*E2F4*	CAGTTTTGGAACTCCCCAAAG	1619	*KIF11*	TCTTTTCCATGTGATTTTTTA
1473	*E2F4*	AGTTTTGGAACTCCCCAAAGA	1620	*KIF11*	GTCTTTTCCATGTGATTTTTT
1474	*E2F4*	TGGAACTCCCCAAAGAGCTGT	1621	*KIF11*	TTTGTCTTTTCCATGTGATTT
1475	*E2F4*	GGAACTCCCCAAAGAGCTGTC	1622	*KIF11*	CTTTGTCTTTTCCATGTGATT
1476	*E2F4*	CCAGAGTGCATGAGCTCGGAG	1623	*KIF11*	TCTTTGTCTTTTCCATGTGAT
1477	*E2F4*	GCCCCTCTGCTTCGTCTTTCT	1624	*KIF11*	ATGCCTCTGTTTTCTTTGTCT
1478	*E2F4*	CCCCTCTGCTTCGTCTTTCTC	1625	*KIF11*	GACCTCTCCAGTGTGTTAATG

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1479	*E2F4*	GTCTTTCTCCACCCCCGGGAG	1626	*KIF11*	AGACCTCTCCAGTGTGTTAAT
1480	*E2F4*	CTCCACCCCCGGGAGACCACG	1627	*KIF11*	CACTTTAGACCTCTCCAGTGT
1481	*E2F4*	TCCACCCCCGGGAGACCACGA	1628	*KIF11*	TTCCACTTTAGACCTCTCCAG
1482	*E2F4*	TATCTACAACCTGGACGAGAG	1629	*KIF11*	CTTCCACTTTAGACCTCTCCA
1483	*E2F4*	GATGTGCCTGTTCTCAACCTC	1630	*KIF11*	TAACCAAGTGCTCTGTAGTTT
1484	*E2F4*	ATGTGCCTGTTCTCAACCTCT	1631	*KIF11*	GTAACCAAGTGCTCTGTAGTT
1485	*E2F4*	TGCACTGCCAGGGACAGCAGT	1632	*KIF11*	ATCTGGGCTCGCAGAGGTAAT
1486	*E2F4*	CCTGGACTTCTGCACTGCCAG	1633	*KIF11*	AAGGTTGATCTGGGCTCGCAG
1487	*E2F4*	CTATCAGTCCCAGGGCCGCCA	1634	*KIF11*	CCAACCCCCAAGTGAATTAAA
1488	*E2F4*	GGCCCAGTGGGAGTGAACTGA	-	-	-

Таблица 22. Направляющие РНК SpyCas9

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1635	*GAPDH*	TCTAGGTATGACAACGAATT	1761	*G6PD*	GTGGGGGTTCACCCACTTGT
1636	*GAPDH*	AGCCCCAGCGTCAAAGGTGG	1762	*G6PD*	ACTTGTAGGTGCCCTCATAC
1637	*TBP*	ATTGTATCCACAGTGAATCT	1763	*G6PD*	CATCAGCTCGTCTGCCTCCG
1638	*TBP*	AAACGCCGAATATAATCCCA	1764	*G6PD*	ATCAGCTCGTCTGCCTCCGT
1639	*TBP*	ACCATTGTAGCGGTTTGCTG	1765	*G6PD*	TCAGCTCGTCTGCCTCCGTG
1640	*TBP*	GGTTTGCTGCGGTAATCATG	1766	*G6PD*	CGTCTGCCTCCGTGGGGCCT
1641	*TBP*	GATAAGAGAGCCACGAACCA	1767	*G6PD*	TGCCTCCGTGGGGCCTCGGC
1642	*TBP*	ACGGCACTGATTTTCAGTTC	1768	*G6PD*	TCCTCACCTGCCATAAATAT
1643	*TBP*	CGGCACTGATTTTCAGTTCT	1769	*G6PD*	CCTCACCTGCCATAAATATA
1644	*TBP*	GATTTTCAGTTCTGGGAAAA	1770	*G6PD*	CTCACCTGCCATAAATATAG
1645	*TBP*	TCTGGGAAAATGGTGTGCAC	1771	*G6PD*	CCTGCCATAAATATAGGGGA
1646	*TBP*	TGGTGTGCACAGGAGCCAAG	1772	*G6PD*	CTGCCATAAATATAGGGGAT
1647	*TBP*	TAGTGAAGAACAGTCCAGAC	1773	*G6PD*	ATAAATATAGGGGATGGGCT
1648	*TBP*	TGCTAGAGTTGTACAGAAGT	1774	*G6PD*	TAAATATAGGGGATGGGCTT
1649	*TBP*	GCTAGAGTTGTACAGAAGTT	1775	*G6PD*	TGGGCTTCTCCAGCTCAATC
1650	*TBP*	GGGTTTTCCAGCTAAGTTCT	1776	*G6PD*	AGCTCAATCTGGTGCAGCAG
1651	*TBP*	GGACTTCAAGATTCAGAATA	1777	*G6PD*	GCTCAATCTGGTGCAGCAGT
1652	*TBP*	CTTCAAGATTCAGAATATGG	1778	*G6PD*	CTCAATCTGGTGCAGCAGTG
1653	*TBP*	TTCAAGATTCAGAATATGGT	1779	*G6PD*	CAGTGGGGTGAAAATACGCC
1654	*TBP*	TCAAGATTCAGAATATGGTG	1780	*G6PD*	TGAAAATACGCCAGGCCTCA
1655	*TBP*	GTGATGTGAAGTTTCCTATA	1781	*G6PD*	CCTCACGGAGCTCGTCGCTG
1656	*TBP*	AAGTTTCCTATAAGGTTAGA	1782	*G6PD*	ACCTGCGCACGAAGTGCATC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1657	*TBP*	TCACCCACCAACAATTTAGT	1783	*G6PD*	GGCTCCCGCAGAAGACGTCC
1658	*TBP*	TATGAGCCAGAGTTATTTCC	1784	*G6PD*	CGCAGAAGACGTCCAGGATG
1659	*TBP*	GTTCTCCTTATTTTTGTTTC	1785	*G6PD*	GTCCAGGATGAGGCGCTCAT
1660	*TBP*	TCTGGAAAAGTTGTATTAAC	1786	*G6PD*	ATGAGGCGCTCATAGGCGTC
1661	*TBP*	AAACATCTACCCTATTCTAA	1787	*G6PD*	TGAGGCGCTCATAGGCGTCA
1662	*TBP*	ACCCTATTCTAAAGGGATTC	1788	*G6PD*	CACCTTGTATCTGTTGCCGT
1663	*TBP*	GATTCAGGAAGACGACGTAA	1789	*G6PD*	TGTATCTGTTGCCGTAGGTC
1664	*TBP*	CACGAAGTGCAATGGTCTTT	1790	*G6PD*	CAGGTCCAGCTCCGACTCCT
1665	*TBP*	GTTTCGGGCACGAAGTGCAA	1791	*G6PD*	AGGTCCAGCTCCGACTCCTC
1666	*TBP*	GGGATTATATTCGGCGTTTC	1792	*G6PD*	GGTCCAGCTCCGACTCCTCG
1667	*TBP*	TGGGATTATATTCGGCGTTT	1793	*G6PD*	TCGGGGTTGAAGAACATGCC
1668	*TBP*	TCTAACCTTGGGATTATATT	1794	*G6PD*	GAAGAACATGCCCGGCTTCT
1669	*TBP*	ATTAAAATAGATCTAACCTT	1795	*G6PD*	CGGCTTCTTGGTCATCATCT
1670	*TBP*	AAAATCAGTGCCGTGGTTCG	1796	*G6PD*	GGTCATCATCTTGGTGTACA
1671	*TBP*	AGAACTGAAAATCAGTGCCG	1797	*G6PD*	CTTGGTGTACACGGCCTCGT
1672	*TBP*	AATTTCTTACGGCTACCTCT	1798	*G6PD*	TTGGTGTACACGGCCTCGTT
1673	*TBP*	AGTCTGGACTGTTCTTCACT	1799	*G6PD*	CGGCCTCGTTGGGCTGCACG
1674	*TBP*	ATATTTTCTTGCTGCCAGTC	1800	*G6PD*	GCTCGTTGCGCTTGCACTGC
1675	*TBP*	TTGAAGTCCAAGAACTTAGC	1801	*G6PD*	CGTTGCGCTTGCACTGCTGG
1676	*TBP*	ACAAGGCCTTCTAACCTTAT	1802	*G6PD*	CTGCTGGTGGAAGATGTCGC
1677	*TBP*	ATTGTTGGTGGGTGAGCACA	1803	*G6PD*	AGATGTCGCCGGCCACATCA
1678	*TBP*	TTACCTACTAAATTGTTGGT	1804	*G6PD*	ATGGAACTGCAGCCTCACCT
1679	*TBP*	CTTACCTACTAAATTGTTGG	1805	*G6PD*	CCTCGGCCTTGCGCTCGTTC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1680	*TBP*	AGACTTACCTACTAAATTGT	1806	*G6PD*	CTCGGCCTTGCGCTCGTTCA
1681	*TBP*	ATTAAACCAGGAAATAACTC	1807	*G6PD*	TCAGGGCCTTGCCGCAGCGC
1682	*TBP*	ATCATTCTGTAGATTAAACC	1808	*G6PD*	CTTGCCGCAGCGCAGGATGA
1683	*TBP*	AAAATAAGGAGAACAATTCT	1809	*G6PD*	TTGCCGCAGCGCAGGATGAA
1684	*TBP*	CTTTTCCAGAAACAAAAATA	1810	*G6PD*	GTATGAGGGCACCTACAAGT
1685	*TBP*	TCCTGAATCCCTTTAGAATA	1811	*G6PD*	AGTATGAGGGCACCTACAAG
1686	*TBP*	TTCCTGAATCCCTTTAGAAT	1812	*G6PD*	AGAGTGGGTTTCCAGTATGA
1687	*E2F4*	CTCACTCCCACTGCTGTCCC	1813	*G6PD*	GAGAGTGGGTTTCCAGTATG
1688	*E2F4*	CCCTGGCAGTGCAGAAGTCC	1814	*G6PD*	GACGAGCTGATGAAGAGAGT
1689	*E2F4*	CCTGGCAGTGCAGAAGTCCA	1815	*G6PD*	AGACGAGCTGATGAAGAGAG
1690	*E2F4*	CAGTGCAGAAGTCCAGGGAA	1816	*G6PD*	CTCCAGCCGAGGCCCCACGG
1691	*E2F4*	GCAGAAGTCCAGGGAATGGC	1817	*G6PD*	CACCCGTCACTCTCCAGCCG
1692	*E2F4*	GGCCCAGCAGCTGAGATCAC	1818	*G6PD*	CCATCCCCTATATTTATGGC
1693	*E2F4*	GGGGCTATCATTGTAGTGAG	1819	*G6PD*	AAGCCCATCCCCTATATTTA
1694	*E2F4*	GCTATCATTGTAGTGAGTGG	1820	*G6PD*	ACTGCTGCACCAGATTGAGC
1695	*E2F4*	ATTGTAGTGAGTGGCGGCCC	1821	*G6PD*	GCGACGAGCTCCGTGAGGCC
1696	*E2F4*	TTGTAGTGAGTGGCGGCCCT	1822	*G6PD*	CCTCAGCGACGAGCTCCGTG
1697	*E2F4*	CGGCCCTGGGACTGATAGCA	1823	*G6PD*	GCCAGATGCACTTCGTGCGC
1698	*E2F4*	GGGACTGATAGCAAGGACAG	1824	*G6PD*	TCATCCTGGACGTCTTCTGC
1699	*E2F4*	TGAGCTCAGTTCACTCCCAC	1825	*G6PD*	CTCATCCTGGACGTCTTCTG
1700	*E2F4*	GAGCTCAGTTCACTCCCACT	1826	*G6PD*	CGCCTATGAGCGCCTCATCC
1701	*E2F4*	CCCACTGGGCCCAACAACAC	1827	*G6PD*	GACCTACGGCAACAGATACA
1702	*E2F4*	GCCCAACAACACTGGACACC	1828	*G6PD*	TCGGAGCTGGACCTGACCTA

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1703	*E2F4*	ACTGCAGTCTTCTGCCCTGC	1829	*G6PD*	CAACCCCGAGGAGTCGGAGC
1704	*E2F4*	AGTAACAGCAGCAGTTCGTC	1830	*G6PD*	GTTCTTCAACCCCGAGGAGT
1705	*E2F4*	TACCTCCTTTGAGCCCATCA	1831	*G6PD*	GGGCATGTTCTTCAACCCCG
1706	*E2F4*	CCCATCAAGGCAGACCCCAC	1832	*G6PD*	AAGATGATGACCAAGAAGCC
1707	*E2F4*	ATCAAGGCAGACCCCACAGG	1833	*G6PD*	CAAGATGATGACCAAGAAGC
1708	*E2F4*	GAAATCTTTGATCCCACACG	1834	*G6PD*	GATCCGCGTGCAGCCCAACG
1709	*E2F4*	TCTTTGATCCCACACGAGGT	1835	*G6PD*	GCAGTGCAAGCGCAACGAGC
1710	*E2F4*	ATTCCCAGAGTGCATGAGCT	1836	*G6PD*	CTGCAGTTCCATGATGTGGC
1711	*E2F4*	GTGCATGAGCTCGGAGCTGC	1837	*G6PD*	GAGGCTGCAGTTCCATGATG
1712	*E2F4*	GAGGAGTTGATGTCCTCAGA	1838	*G6PD*	ACGAGCGCAAGGCCGAGGTG
1713	*E2F4*	GAGTTGATGTCCTCAGAAGG	1839	*G6PD*	CCTGAACGAGCGCAAGGCCG
1714	*E2F4*	AGTTGATGTCCTCAGAAGGT	1840	*G6PD*	CAAGGCCCTGAACGAGCGCA
1715	*E2F4*	GCTTCGTCTTTCTCCACCCC	1841	*G6PD*	CTTCATCCTGCGCTGCGGCA
1716	*E2F4*	CTTCGTCTTTCTCCACCCCC	1842	*G6PD*	GTGCCCTTCATCCTGCGCTG
1717	*E2F4*	CCACGATTATATCTACAACC	1843	*G6PD*	AGAATGAGAGGTGGGATGGT
1718	*E2F4*	TACAACCTGGACGAGAGTGA	1844	*G6PD*	GTGGAGAATGAGAGGTGGGA
1719	*E2F4*	GCACTGCCAGGGACAGCAGT	1845	*KIF11*	CTTAATGAAACCATAAAAAT
1720	*E2F4*	TGCACTGCCAGGGACAGCAG	1846	*KIF11*	GACTAAGCTTAATTGCTTTC
1721	*E2F4*	CCTGGACTTCTGCACTGCCA	1847	*KIF11*	GCTTAATTGCTTTCTGGAAC
1722	*E2F4*	CCCTGGACTTCTGCACTGCC	1848	*KIF11*	TCTGGAACAGGATCTGAAAC
1723	*E2F4*	CTGCTGGGCCAGCCATTCCC	1849	*KIF11*	CTGAAACTGGATATCCCAAC
1724	*E2F4*	TGTCCTTGCTATCAGTCCCA	1850	*KIF11*	TTAAAGGTACGACACCACAG
1725	*E2F4*	CTGTCCTTGCTATCAGTCCC	1851	*KIF11*	TTATTTATACCCATCAACAC

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1726	*E2F4*	CCAGTGTTGTTGGGCCCAGT	1852	*KIF11*	ATCTCCTTGATCAGCTGAAA
1727	*E2F4*	TCCAGTGTTGTTGGGCCCAG	1853	*KIF11*	CAACAAAGAAGAGACAATTC
1728	*E2F4*	GCCGGGTGTCCAGTGTTGTT	1854	*KIF11*	TTAGGATGTGGATGTAGAAG
1729	*E2F4*	GGCCGGGTGTCCAGTGTTGT	1855	*KIF11*	GGATGTAGAAGAGGCAGTTC
1730	*E2F4*	AGCAGGGCAGAAGACTGCAG	1856	*KIF11*	GATGTAGAAGAGGCAGTTCT
1731	*E2F4*	GCTGCTGCTGCTGTCCAGCA	1857	*KIF11*	ATGTAGAAGAGGCAGTTCTG
1732	*E2F4*	GGAGGTAGAAGGGTTGGGTC	1858	*KIF11*	CAAGAGCCATCTGTAGATGC
1733	*E2F4*	TGGGCTCAAAGGAGGTAGAA	1859	*KIF11*	GCCATCTGTAGATGCTGGTG
1734	*E2F4*	ATGGGCTCAAAGGAGGTAGA	1860	*KIF11*	GGTGTGGATTGTTCATCAAT
1735	*E2F4*	TGCCTTGATGGGCTCAAAGG	1861	*KIF11*	GTGGATTGTTCATCAATTGG
1736	*E2F4*	GTCTGCCTTGATGGGCTCAA	1862	*KIF11*	TGGATTGTTCATCAATTGGC
1737	*E2F4*	CCTGTGGGGTCTGCCTTGAT	1863	*KIF11*	GGATTGTTCATCAATTGGCG
1738	*E2F4*	ACCTGTGGGGTCTGCCTTGA	1864	*KIF11*	TGGCGGGGTTCCATTTTTCC
1739	*E2F4*	GCAGGTACTCACCACCTGTG	1865	*KIF11*	CCACAGCATAAAAAATCACA
1740	*E2F4*	GGCAGGTACTCACCACCTGT	1866	*KIF11*	GGAAAAGACAAAGAAAACAG
1741	*E2F4*	GGGCAGGTACTCACCACCTG	1867	*KIF11*	AAACAGAGGCATTAACACAC
1742	*E2F4*	AGATTTCTGACAGCTCTTTG	1868	*KIF11*	GAGGCATTAACACACTGGAG
1743	*E2F4*	AAGATTTCTGACAGCTCTTT	1869	*KIF11*	CACACTGGAGAGGTCTAAAG
1744	*E2F4*	AAAGATTTCTGACAGCTCTT	1870	*KIF11*	GGAAGAAACTACAGAGCACT
1745	*E2F4*	TGCAGCAGCCTACCTCGTGT	1871	*KIF11*	CTTAGTCAAACCAATTTTTA
1746	*E2F4*	ATGCAGCAGCCTACCTCGTG	1872	*KIF11*	TCTCTTTTAAAGTACCTGTT
1747	*E2F4*	GCTCCGAGCTCATGCACTCT	1873	*KIF11*	TTCTCTTTTAAAGTACCTGT
1748	*E2F4*	AGCTCCGAGCTCATGCACTC	1874	*KIF11*	TATAAATAACTTTTCCTCTG

SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)	SEQ ID NO	Ген	Последовательность нацеливающего домена (ДНК)
1749	*E2F4*	CCAGGGCCACCCACCTTCTG	1875	*KIF11*	CAGTTCTTACCAGTGTTGAT
1750	*E2F4*	TGGAGAAAGACGAAGCAGAG	1876	*KIF11*	TCAGTTCTTACCAGTGTTGA
1751	*E2F4*	GTGGAGAAAGACGAAGCAGA	1877	*KIF11*	TGATCAAGGAGATGTTCACG
1752	*E2F4*	GGTGGAGAAAGACGAAGCAG	1878	*KIF11*	GTTTCCTTTTCAGCTGATCA
1753	*E2F4*	TAATCGTGGTCTCCCGGGGG	1879	*KIF11*	TTTAGCATCATTAACAGCTC
1754	*E2F4*	ATATAATCGTGGTCTCCCGG	1880	*KIF11*	ACAGATGGCTCTTGACTTAG
1755	*E2F4*	GATATAATCGTGGTCTCCCG	1881	*KIF11*	TCCACACCAGCATCTACAGA
1756	*E2F4*	AGATATAATCGTGGTCTCCC	1882	*KIF11*	ATATGACATACCTGGAAAAA
1757	*E2F4*	TAGATATAATCGTGGTCTCC	1883	*KIF11*	AGGTTGATCTGGGCTCGCAG
1758	*E2F4*	CCAGGTTGTAGATATAATCG	1884	*KIF11*	AGTGAATTAAAGGTTGATCT
1759	*E2F4*	AGACACCTTCACTCTCGTCC	1885	*KIF11*	AAGTGAATTAAAGGTTGATC
1760	*E2F4*	TGAGAACAGGCACATCAAAG	-	-	-

Пример 20. Второй цикл редактирования с помощью RNP и донорных матриц или только RNP позволяет дополнительно обогатить iPSC трансгенами, нацеленными на локус гена *GAPDH*

[0859] Настоящий пример относится к введению двух иммунологически релевантных генов, вставленных биаллельно и бицистронным образом в ген *GAPDH*. Две различные донорные матрицы (например, донорные конструкции на основе нуклеиновой кислоты), одна из которых содержит последовательности генов для иммунорегуляторной молекулы PDL1 и переключатель безопасности в качестве своей генетической нагрузки, а другая донорная матрица содержит иммунорегуляторную молекулу CD47 и такой же переключатель безопасности в качестве своей генетической нагрузки, были нацелены на локус *GAPDH* **(фиг. 43A)**. После первого цикла редактирования с помощью системы редактирования генов на основе рибонуклеопротеинового комплекса (RNP) нуклеазы Cpf1 и направляющей РНК, донорных матриц на основе PDL1 и на основе CD47 получали ~ 8,1% положительных по PDL1, ~ 2,2% положительных по CD47 и ~ 2,4% дважды положительных по PDL1/CD47 клеток. Это указывает на то, что донорные конструкции на основе нуклеиновой кислоты с их фланкирующими плечами гомологии правильно интегрировались в локус *GAPDH*, восстанавливая нарушение, вызванное разрезанием экзона *GAPDH* нуклеазой. Этот результат был неожиданным, поскольку дважды положительный результат значительно превосходил ожидаемые и ранее полученные результаты (например, описанные в уровне техники). Следует отметить, что эффективность одиночного нокина для CD47 была ниже, чем двойного нокина, возможно, потому что включение PD-L1 было более эффективным и способствовало более высоким показателям биаллельного включения.

[0860] Для дальнейшего обогащения популяцией подвергнутых редактированию клеток клетки размножали, а затем подвергали повторному редактированию путем предоставления пулу выживших клеток вновь RNP и обеих донорных матриц (например, донорных конструкций на основе нуклеиновой кислоты) либо RNP в отдельности. В образце, подвергнутом повторному редактированию с помощью RNP и обеих донорных матриц (например, донорных конструкций на основе нуклеиновой кислоты), популяция положительных по PDL1 клеток увеличилась до ~ 63,8%, популяция положительных по CD47 клеток увеличилась до ~ 6,5%, а популяция дважды положительных по PDL1/CD47 клеток увеличилась до ~ 18,9%. В образце, подвергнутом повторному редактированию с помощью RNP в отдельности, популяция положительных по PDL1 клеток увеличилась до ~ 59,0%, популяция положительных по CD47 клеток увеличилась до ~ 10,4%, а популяция дважды положительных по PDL1/CD47 клеток увеличилась до ~ 13,4%. Наблюдалось снижение количества не подвергнутых редактированию клеток с 87,4% до 10,8% при использовании RNP и донорных матриц или до 17,3% при использовании RNP в отдельности. В любом случае, обеспечение второго цикла RNP позволило селективно удалить не подвергающиеся нацеливанию клетки посредством вырезания экзона *GAPDH* и, следовательно, осуществить дополнительное обогащение клетками, подвергающимися нацеливанию одной или обеими донорными матрицами на основе PDL1 и на основе CD47 (например, конструкциями на основе нуклеиновой кислоты).

[0861] В отдельном исследовании использовали ту же донорную матрицу на основе PDL1 для нацеливания PDL1 на локус *GAPDH* **(фиг. 43B)**. После первого цикла редактирования с помощью RNP и донорной матрицы на основе PDL1 получали ~ 0,8% положительных по PDL1 клеток. Для дополнительного обогащения популяцией подвергнутых редактированию клеток клетки размножали, а затем подвергали повторному редактированию путем предоставления выжившей популяции клеток RNP в отдельности. В образце, подвергнутом повторному редактированию с помощью RNP в отдельности, популяция положительных по PDL1 клеток увеличилась до 64,7%. Эти данные показывают, что редактирование с

помощью второго цикла RNP позволило селективно удалить не подвергающиеся нацеливанию клетки посредством вырезания экзона *GAPDH* и, следовательно, осуществить дополнительное обогащение клетками, подвергающимися нацеливанию донорной матрицей на основе PDL1.

Пример 21. Редактирование в PSC с помощью двух разных донорных матриц, содержащих компоненты "суицидального" переключателя, и RNP, нацеленных на кодирующую область гена *GAPDH*, позволяет осуществить обогащение подвергнутыми биаллельному редактированию клетками и, следовательно, димеризацию компонентов "суицидального" переключателя

[0862] Настоящий пример относится к введению двух нокин-кассет, каждая из которых кодирует несколько представляющих интерес продуктов генов в качестве их генетических нагрузок. Две разные донорных матрицы (например, конструкции на основе нуклеиновой кислоты), содержащие иммунорегуляторные молекулы PDL1 или CD47, нацеливали на ген *GAPDH* (фиг. 44). Донорная матрица на основе PDL1 состояла из кодирующей последовательности для FRB (фрагмента домена, связывающего комплекс FKBP12-рапамицин, мишени рапамицина млекопитающих (mTOR)), связанной через GS-линкер с кодирующей последовательностью усеченного гена каспазы 9 (dCasp9), которая была связана через саморасщепляющийся пептид P2A с кодирующей последовательностью гена PDL1. Донорная матрица на основе CD47 состояла из кодирующей последовательности для FKBP12 (пептидилпролил-цис-транс-изомеразы FKBP12, кодирующей FK506-связывающий белок размером 12 кДа), связанной через GS-линкер с кодирующей последовательностью усеченного гена каспазы 9 (dCasp9), которая была связана через саморасщепляющийся пептид P2A с кодирующей последовательностью гена PDL1. Последовательности FRB-dCasp9 и FKBP12-dCasp9 образуют два необходимых компонента рапамицин-индуцируемого уничтожающего переключателя на основе каспазы 9 (rapaCasp9). В присутствии рапамицина домены FRB и FKBP12 гетеродимеризуются, вызывая гомодимеризацию усеченных белков каспазы 9, что в свою очередь активирует нижележащие эффекторные каспазы для запуска апоптоза в подвергнутых биаллельному редактированию с помощью rapaCasp9 клетках.

[0863] После редактирования PSC с помощью RNP, нацеленного на *GAPDH*, и донорных матриц на основе PDL1 и на основе CD47 обеспечивали восстановление и размножение выживших клеток, и через неделю проводили анализ методом проточной цитометрии популяции PSC, окрашенных антителами к PDL-1 и к CD47. После цитометрического анализа выжившим клеткам предоставляли нацеленные на *GAPDH* RNP и две разные донорные матрицы (например, донорные конструкции на основе нуклеиновой кислоты) вместе (FRB-dCasp9-PDL1 и FKBP12-dCasp9-CD47), что давало положительные по PDL1 PSC (~ 11,9%), положительные по CD47 PSC (~ 9,8%) и клетки, которые были дважды положительными по PDL1 и CD47 (~ 3,5%), что указывает на то, что в некоторые клетки биаллельно интегрировались две генетические нагрузки: трансген FRB-dCasp9-PDL1 и трансген FKBP12-dCasp9-CD47, нацеленные на ген *GAPDH*, которые восстанавливали нарушение, вызванное разрезанием экзона *GAPDH* нуклеазой (например, в кодирующей области). Эти результаты поразительны, поскольку клетки, подвергнутые биаллельному редактированию с помощью двух различных крупных донорных конструкций в одном генном локусе, обычно являются очень редкими событиями при проведении экспериментов по гомологичной рекомбинации в PSC.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0864] Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано в сочетании с подробным описанием, предшествующее описание предназначено для иллюстрации настоящего изобретения и не

ограничивает его объем, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИ

1. Способ редактирования генома клетки, при этом способ включает приведение клетки в контакт с:

(i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и

(ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого клетки с отредактированным геномом, которая экспрессирует:

(a) представляющий интерес продукт гена и

(b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

2. Способ по п. 1, где в случае, если нокин-кассета не интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, клетка больше не экспрессирует продукт гена, кодируемый существенным геном, или его функциональный вариант.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где разрыв расположен в пределах последних 1000, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

5. Способ по любому из пп. 1-3, где разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas.

7. Способ по любому из пп. 1-5, где нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой.

9. Способ по п. 8, где донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты.

11. Способ по п. 10, где плечи гомологии соответствуют последовательностям, расположенным по обе стороны от разрыва в геноме клетки.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов

генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

13. Способ по п. 12, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

14. Способ по п. 13, где элемент 2A представляет собой элемент T2A (EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP).

15. Способ по п. 13 или п. 14, где нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A.

16. Способ по п. 15, где линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном.

19. Способ по п. 18, где С-концевой фрагмент имеет длину менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.

20. Способ по п. 18 или п. 19, где С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке.

22. Способ по п. 21, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью, для уменьшения вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки и/или для увеличения экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

24. Способ по любому из пп. 1-22, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

25. Способ по п. 24, где клетки, происходящие из iPS, представляют собой NK-клетки, происходящие из iPS, или Т-клетки, происходящие из iPS.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин (например, интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант), человеческий лейкоцитарный антиген (например, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E)), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

28. Генетически модифицированная клетка, содержащая геном с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки.

29. Сконструированная клетка, содержащая геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в геноме клетки, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей продукт гена из существенного гена или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где клетка экспрессирует представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, необязательно экспрессируются из эндогенного промотора существенного гена.

30. Клетка по п. 28 или п. 29, где геном клетки содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

31. Клетка по п. 30, где геном клетки содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

32. Клетка по любому из пп. 28-31, где геном клетки содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

33. Клетка по любому из пп. 28-32, где кодирующая последовательность существенного гена менее чем на 100% идентична эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

34. Клетка по любому из пп. 28-33, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

35. Клетка по любому из пп. 28-33, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

36. Клетка по п. 35, где клетки, происходящие из iPS, представляют собой NK-клетки, происходящие из iPS, или T-клетки, происходящие из iPS.

37. Клетка по любому из пп. 28-36, где геном клетки не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

38. Клетка по любому из пп. 28-37, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

39. Клетка по любому из пп. 28-38 для применения в качестве лекарственного препарата.

40. Клетка по любому из пп. 28-38 для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, рака.

41. Клетка или популяция клеток, полученные посредством способа по любому из пп. 1-27, или их потомство.

42. Система для редактирования генома клетки, при этом система содержит клетку (или популяцию клеток), нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее).

43. Система по п. 42, где разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

44. Система по п. 42 или п. 43, где разрыв расположен в пределах последних 1000, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности существенного гена.

45. Система по любому из пп. 42-44, где разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена.

46. Система по любому из пп. 42-45, где нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и система дополнительно содержит направляющую молекулу для нуклеазы CRISPR/Cas.

47. Система по любому из пп. 42-45, где нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу.

48. Система по любому из пп. 42-47, где донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой.

49. Система по п. 48, где донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

50. Система по любому из пп. 42-49, где донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты.

51. Система по п. 50, где плечи гомологии соответствуют последовательностям, расположенным по обе стороны от разрыва в геноме клетки.

52. Система по любому из пп. 42-51, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

53. Система по п. 52, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

54. Система по любому из пп. 42-53, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

55. Система по любому из пп. 42-54, где экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном.

56. Система по п. 55, где С-концевой фрагмент имеет длину менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.

57. Система по п. 55 или п. 56, где С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

58. Система по любому из пп. 42-57, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке.

59. Система по п. 58, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью, для уменьшения вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или для увеличения экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

60. Система по п. 59, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете не содержит сайт-мишень для нуклеазы.

61. Система по любому из пп. 42-60, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

62. Система по любому из пп. 42-61, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

63. Система по п. 62, где клетки, происходящие из iPS, представляют собой NK-клетки, происходящие из iPS, или T-клетки, происходящие из iPS.

64. Система по любому из пп. 42-63, где донорная ДНК-матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

65. Система по любому из пп. 42-64, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

66. Донорная матрица, содержащая нокин-кассету с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки.

67. Донорная матрица по п. 66 для применения при редактировании генома клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR).

68. Донорная матрица по п. 66 или п. 67, где донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой.

69. Донорная матрица по п. 68, где донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

70. Донорная матрица по любому из пп. 66-69, где донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты.

71. Донорная матрица по любому из пп. 66-70, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

72. Донорная матрица по п. 71, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

73. Донорная матрица по любому из пп. 66-72, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

74. Донорная матрица по любому из пп. 66-73, где экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого эндогенной кодирующей последовательностью существенного гена.

75. Донорная матрица по п. 74, где С-концевой фрагмент имеет длину менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.

76. Донорная матрица по любому из пп. 66-75, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

77. Донорная матрица по п. 76, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью, для уменьшения вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или для увеличения экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

78. Донорная матрица по п. 77, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете не содержит сайт-мишень для нуклеазы.

79. Донорная матрица по любому из пп. 66-78, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

80. Донорная матрица по любому из пп. 66-79, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

81. Донорная матрица по любому из пп. 66-80, где донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

82. Донорная матрица по любому из пп. 66-81, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

83. Способ получения генетически модифицированных клеток млекопитающих, содержащих переключатель безопасности, включающий:

получение по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, содержащей генетическую нагрузку, содержащую по меньшей мере один необходимый компонент переключателя безопасности,

где указанная генетическая нагрузка фланкирована первой гомологичной областью (HR) и второй HR, где первая и вторая HR по существу гомологичны первой геномной области (GR) и второй GR соответственно, где первая GR и вторая GR прилегают к заранее определенному геномному положению в экзоне существенного гена в клетке млекопитающего и фланкируют его,

получение системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение, и

добавление по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты и системы редактирования генов в популяцию клеток млекопитающих, где во множество клеток млекопитающих включается генетическая нагрузка в заранее определенном геномном положении,

где разрушение последовательности существенного гена, вызванное нуклеазой, восстанавливается после интеграции HR и генетической нагрузки.

84. Способ по п. 83, где каждая донорная конструкция на основе нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один необходимый компонент переключателя безопасности.

85. Способ по любому из п. 83 или п. 84, где каждая донорная конструкция на основе нуклеиновой кислоты содержит все необходимые компоненты переключателя безопасности.

86. Способ по любому из пп. 83-85, где комбинация донорных конструкций на основе нуклеиновой кислоты содержит все необходимые компоненты функционального переключателя безопасности.

87. Способ по любому из пп. 83-86, где необходимые компоненты переключателя безопасности димеризуются с получением функционального переключателя безопасности.

88. Способ по любому из пп. 83-87, где генетическая нагрузка из первой донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты включается в состав первого аллеля существенного гена, а генетическая нагрузка из второй донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты включается в состав второго аллеля существенного гена.

89. Способ по любому из пп. 83–88, где один или несколько необходимых компонентов переключателя безопасности включаются в состав первого аллеля существенного гена, а остальные необходимые компоненты переключателя безопасности включаются в состав второго аллеля существенного гена.

90. Способ по любому из пп. 83-89, где активация переключателя безопасности запускается клеточным событием, событием окружающей среды или химическим средством.

91. Способ по любому из пп. 83-90, где активация переключателя безопасности индуцирует апоптоз.

92. Способ по любому из пп. 83-91, где активация переключателя безопасности подавляет рост клеток, в которые были включены все необходимые компоненты переключателя безопасности.

93. Популяция клеток, полученная посредством способа по любому из пп. 83-92.

94. Популяция клеток по п. 93, где клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки (PSC).

95. Популяция клеток по п. 93, где клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC).

96. Клетка из популяции клеток по любому из пп. 93-95, где клетка дифференцируется в дифференцированную клетку.

97. Дифференцированная клетка по п. 96, где дифференцированная клетка выбрана из:

клетки иммунной системы, необязательно выбранной из Т-клетки, Т-клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), супрессивной Т-клетки, миелоидной клетки, дендритной клетки и макрофага;

клетки нервной системы, необязательно выбранной из дофаминергического нейрона, микроглиальной клетки, олигодендроцита, астроцита, кортикального нейрона, спинномозгового нейрона

или нейрона глазодвигательного нерва, энтерального нейрона, клетки, происходящей из плакоды, шванновской клетки и нейрона тройничного нерва или чувствительного нейрона;

клетки глазной системы, необязательно выбранной из клетки пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторной колбочковой клетки, фоторецепторной палочковой клетки, биполярной клетки и ганглиозной клетки;

клетки сердечно-сосудистой системы, необязательно выбранной из кардиомиоцита, эндотелиальной клетки и клетки лимфатического узла; или

клетки метаболической системы, необязательно выбранной из гепатоцита, холангиоцита и бета-клетки поджелудочной железы.

98. Способ увеличения процентной доли клеток в популяции клеток по пп. 93-97, в которые включена генетическая нагрузка в заранее определенном геномном положении, включающий:

образование первой популяции клеток млекопитающих, содержащей клетки по любому из пп. 93–97, путем предоставления по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, содержащей специфическую генетическую нагрузку, фланкированную первой гомологичной областью (HR) и второй HR, где первая и вторая HR по существу гомологичны первой геномной области (GR) и второй GR соответственно, где первая GR и вторая GR прилегают к заранее определенному геномному положению в экзоне существенного гена в клетке млекопитающего и фланкируют его,

получение системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение,

предоставление по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты и системы редактирования генов первой популяции клеток млекопитающих,

культивирование первой популяции клеток млекопитающих и

определение процентной доли выживших клеток, которые содержат специфическую генетическую нагрузку,

образование второй популяции клеток млекопитающих путем размножения выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих путем предоставления выжившим клеткам из первой популяции клеток млекопитающих системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение;

необязательно повторное введение по меньшей мере одной донорной конструкции;

культивирование второй популяции клеток млекопитающих и

определение процентной доли выживших клеток, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку,

где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку, является более высокой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку.

99. Способ по п. 98, где множество выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, уничтожается в ходе образования второй популяции клеток млекопитающих.

100. Способ по п. 98 или п. 99, где во множество выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, включаются специфические генетические нагрузки в ходе образования второй популяции клеток млекопитающих.

101. Способ по любому из пп. 98-100, где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфические генетические нагрузки, является в по меньшей мере три раза более высокой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфические генетические нагрузки.

102. Способ по любому из предыдущих пп. 98-101, где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, является в по меньшей мере пять (5) раз более низкой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки.

103. Способ по любому из пп. 98-102, где по меньшей мере одна из донорных конструкций на основе нуклеиновой кислоты имеет генетическую нагрузку, отличную от таковой у по меньшей мере одной другой донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, и в по меньшей мере множество клеток из второй популяции клеток млекопитающих включается каждая из разных генетических нагрузок.

104. Способ по любому из пп. 98-103, где по меньшей мере одна из HR-областей содержит по меньшей мере одну мутацию, которая предотвращает разрезание генетической нагрузки в сайте разрезания нуклеазой.

105. Способ по пп. 98-104, где определение процентной доли выживших клеток осуществляют посредством проточной цитометрии.

106. Сконструированная iPSC, содержащая геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в геноме iPSC, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для переключателя безопасности в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей GAPDH или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где iPSC экспрессирует представляющий интерес продукт гена и GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена и GAPDH необязательно экспрессируются из эндогенного промотора гена GAPDH.

107. iPSC по п. 106, где геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

108. iPSC по п. 107, где геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

109. iPSC по любому из пп. 106-108, где геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

110. iPSC по любому из пп. 106-109, где кодирующая последовательность гена GAPDH менее чем на 100% идентична эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH.

111. iPSC по любому из пп. 106-110, где геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

112. iPSC по любому из пп. 106-111 для применения в качестве лекарственного препарата.

113. iPSC по любому из пп. 106-112 для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, рака.

114. Система для редактирования генома iPSC в популяции iPSC, при этом система содержит популяцию iPSC, нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую переключатель безопасности в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее).

115. Система по п. 114, где разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

116. Система по любому из пп. 114-115, где разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

117. Система по любому из пп. 114-116, где нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и система дополнительно содержит направляющую молекулу для нуклеазы CRISPR/Cas.

118. Система по любому из пп. 114-116, где нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу.

119. Система по любому из пп. 114-118, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

120. Система по п. 119, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

121. Система по любому из пп. 114-120, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

122. Система по любому из пп. 114-121, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC.

123. Система по п. 122, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для ДНК-нуклеазы и/или с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

124. Система по п. 123, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете не содержит сайт-мишень для нуклеазы.

125. Способ увеличения процентной доли генетически модифицированных клеток млекопитающих с желаемой генетической нагрузкой в популяции клеток млекопитающих, включающий:

образование первой популяции клеток млекопитающих путем предоставления по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, содержащей специфическую генетическую нагрузку, фланкированную первой гомологичной областью (HR) и второй HR, где первая и вторая HR по

существу гомологичны первой геномной области (GR) и второй GR соответственно, где первая GR и вторая GR прилегают к заранее определенному геномному положению в экзоне существенного гена в клетке млекопитающего и фланкируют его,

получение системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение,

предоставление по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты и системы редактирования генов первой популяции клеток млекопитающих,

культивирование первой популяции клеток млекопитающих и

определение процентной доли выживших клеток, которые содержат специфическую генетическую нагрузку,

образование второй популяции клеток млекопитающих путем предоставления выжившим клеткам из первой популяции клеток млекопитающих системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение;

необязательно повторное введение по меньшей мере одной донорной конструкции;

культивирование второй популяции клеток млекопитающих и

определение процентной доли выживших клеток, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку,

где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку, является более высокой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку.

126. Способ по п. 125, где множество выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, уничтожается в ходе образования второй популяции клеток млекопитающих.

127. Способ по любому из пп. 125-126, где во множество выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, включаются специфические генетические нагрузки в ходе образования второй популяции клеток млекопитающих.

128. Способ по любому из пп. 125-127, где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфические генетические нагрузки, является в по меньшей мере три (3) раза более высокой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфические генетические нагрузки.

129. Способ по любому из пп. 125-128, где по меньшей мере одна из донорных конструкций на основе нуклеиновой кислоты имеет генетическую нагрузку, отличную от таковой у по меньшей мере одной другой донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, и в по меньшей мере множество клеток из второй популяции клеток млекопитающих включается каждая из разных генетических нагрузок.

130. Способ по любому из пп. 125-129, где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, является в по меньшей мере пять (5) раз более низкой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки.

131. Способ по любому из пп. 125-130, где по меньшей мере одна из HR-областей содержит по меньшей мере одну мутацию, которая предотвращает разрезание генетической нагрузки в сайте разрезания нуклеазой.

132. Способ по любому из пп. 125-131, где определение процентной доли выживших клеток осуществляют посредством проточной цитометрии.

133. Популяция клеток, полученная посредством способа по любому из пп. 125-132.

134. Популяция клеток по п. 133, где клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки (PSC).

135. Популяция клеток по п. 133, где клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC).

136. Клетка из популяции клеток по любому из пп. 133-135, где клетка дифференцируется в дифференцированную клетку.

137. Дифференцированная клетка по п. 136, где дифференцированная клетка выбрана из:

клетки иммунной системы, необязательно выбранной из Т-клетки, Т-клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), супрессивной Т-клетки, миелоидной клетки, дендритной клетки и макрофага;

клетки нервной системы, необязательно выбранной из дофаминергического нейрона, микроглиальной клетки, олигодендроцита, астроцита, кортикального нейрона, спинномозгового нейрона или нейрона глазодвигательного нерва, энтерального нейрона, клетки, происходящей из плакоды, шванновской клетки и нейрона тройничного нерва или чувствительного нейрона;

клетки глазной системы, необязательно выбранной из клетки пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторной колбочковой клетки, фоторецепторной палочковой клетки, биполярной клетки и ганглиозной клетки;

клетки сердечно-сосудистой системы, необязательно выбранной из кардиомиоцита, эндотелиальной клетки и клетки лимфатического узла; или

клетки метаболической системы, необязательно выбранной из гепатоцита, холангиоцита и бета-клетки поджелудочной железы.

138. iPSC по п. 135, где геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

139. iPSC по п. 138, где геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

140. iPSC по любому из пп. 138-139, где геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

141. iPSC по любому из пп. 138-140, где кодирующая последовательность гена GAPDH менее чем на 100% идентична эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH.

142. iPSC по любому из пп. 138-141, где геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

143. iPSC по любому из пп. 138-142 для применения в качестве лекарственного препарата.

144. iPSC по любому из пп. 138-143 для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, рака.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ст. 34 Инструкции к Договору о Патентной Кооперации

1. Способ редактирования генома клетки, при этом способ включает приведение клетки в контакт с:

(i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и

(ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого клетки с отредактированным геномом, которая экспрессирует:

(a) представляющий интерес продукт гена и

(b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

2. Способ по п. 1, где в случае, если нокин-кассета не интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, клетка больше не экспрессирует продукт гена, кодируемый существенным геном, или его функциональный вариант.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где разрыв расположен в пределах последних 1000, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

5. Способ по любому из пп. 1-3, где разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas.

7. Способ по любому из пп. 1-5, где нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой.

9. Способ по п. 8, где донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты.

11. Способ по п. 10, где плечи гомологии соответствуют последовательностям, расположенным по обе стороны от разрыва в геноме клетки.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов

генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

13. Способ по п. 12, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

14. Способ по п. 13, где элемент 2A представляет собой элемент T2A (EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP).

15. Способ по п. 13 или п. 14, где нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A.

16. Способ по п. 15, где линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном.

19. Способ по п. 18, где С-концевой фрагмент имеет длину менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.

20. Способ по п. 18 или п. 19, где С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке.

22. Способ по п. 21, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью, для уменьшения вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки и/или для увеличения экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

24. Способ по любому из пп. 1-22, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

25. Способ по п. 24, где клетки, происходящие из iPS, представляют собой NK-клетки, происходящие из iPS, или Т-клетки, происходящие из iPS.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин (например, интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант), человеческий лейкоцитарный антиген (например, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E)), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

28. Генетически модифицированная клетка, содержащая геном с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки.

29. Сконструированная клетка, содержащая геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в геноме клетки, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей продукт гена из существенного гена или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где клетка экспрессирует представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, необязательно экспрессируются из эндогенного промотора существенного гена.

30. Клетка по п. 28 или п. 29, где геном клетки содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

31. Клетка по п. 30, где геном клетки содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

32. Клетка по любому из пп. 28-31, где геном клетки содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

33. Клетка по любому из пп. 28-32, где кодирующая последовательность существенного гена менее чем на 100% идентична эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

34. Клетка по любому из пп. 28-33, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

35. Клетка по любому из пп. 28-33, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

36. Клетка по п. 35, где клетки, происходящие из iPS, представляют собой NK-клетки, происходящие из iPS, или T-клетки, происходящие из iPS.

37. Клетка по любому из пп. 28-36, где геном клетки не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

38. Клетка по любому из пп. 28-37, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

39. Клетка по любому из пп. 28-38 для применения в качестве лекарственного препарата.

40. Клетка по любому из пп. 28-38 для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, рака.

41. Клетка или популяция клеток, полученные посредством способа по любому из пп. 1-27, или их потомство.

42. Система для редактирования генома клетки, при этом система содержит клетку (или популяцию клеток), нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее).

43. Система по п. 42, где разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

44. Система по п. 42 или п. 43, где разрыв расположен в пределах последних 1000, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности существенного гена.

45. Система по любому из пп. 42-44, где разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена.

46. Система по любому из пп. 42-45, где нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и система дополнительно содержит направляющую молекулу для нуклеазы CRISPR/Cas.

47. Система по любому из пп. 42-45, где нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу.

48. Система по любому из пп. 42-47, где донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой.

49. Система по п. 48, где донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

50. Система по любому из пп. 42-49, где донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты.

51. Система по п. 50, где плечи гомологии соответствуют последовательностям, расположенным по обе стороны от разрыва в геноме клетки.

52. Система по любому из пп. 42-51, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

53. Система по п. 52, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

54. Система по любому из пп. 42-53, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

55. Система по любому из пп. 42-54, где экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном.

56. Система по п. 55, где С-концевой фрагмент имеет длину менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.

57. Система по п. 55 или п. 56, где С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

58. Система по любому из пп. 42-57, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке.

59. Система по п. 58, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью, для уменьшения вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или для увеличения экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

60. Система по п. 59, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете не содержит сайт-мишень для нуклеазы.

61. Система по любому из пп. 42-60, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

62. Система по любому из пп. 42-61, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

63. Система по п. 62, где клетки, происходящие из iPS, представляют собой NK-клетки, происходящие из iPS, или T-клетки, происходящие из iPS.

64. Система по любому из пп. 42-63, где донорная ДНК-матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

65. Система по любому из пп. 42-64, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

66. Донорная матрица, содержащая нокин-кассету с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки.

67. Донорная матрица по п. 66 для применения при редактировании генома клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR).

68. Донорная матрица по п. 66 или п. 67, где донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой.

69. Донорная матрица по п. 68, где донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

70. Донорная матрица по любому из пп. 66-69, где донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты.

71. Донорная матрица по любому из пп. 66-70, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

72. Донорная матрица по п. 71, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

73. Донорная матрица по любому из пп. 66-72, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

74. Донорная матрица по любому из пп. 66-73, где экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого эндогенной кодирующей последовательностью существенного гена.

75. Донорная матрица по п. 74, где С-концевой фрагмент имеет длину менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.

76. Донорная матрица по любому из пп. 66-75, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

77. Донорная матрица по п. 76, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью, для уменьшения вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или для увеличения экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

78. Донорная матрица по п. 77, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете не содержит сайт-мишень для нуклеазы.

79. Донорная матрица по любому из пп. 66-78, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

80. Донорная матрица по любому из пп. 66-79, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

81. Донорная матрица по любому из пп. 66-80, где донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

82. Донорная матрица по любому из пп. 66-81, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

83. Способ получения генетически модифицированных клеток млекопитающих, содержащих переключатель безопасности, включающий:

получение по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, содержащей генетическую нагрузку, содержащую по меньшей мере один необходимый компонент переключателя безопасности,

где указанная генетическая нагрузка фланкирована первой гомологичной областью (HR) и второй HR, где первая и вторая HR по существу гомологичны первой геномной области (GR) и второй GR соответственно, где первая GR и вторая GR прилегают к заранее определенному геномному положению в экзоне существенного гена в клетке млекопитающего и фланкируют его,

получение системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение, и

добавление по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты и системы редактирования генов в популяцию клеток млекопитающих, где во множество клеток млекопитающих включается генетическая нагрузка в заранее определенном геномном положении,

где разрушение последовательности существенного гена, вызванное нуклеазой, восстанавливается после интеграции HR и генетической нагрузки.

84. Способ по п. 83, где каждая донорная конструкция на основе нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один необходимый компонент переключателя безопасности.

85. Способ по любому из п. 83 или п. 84, где каждая донорная конструкция на основе нуклеиновой кислоты содержит все необходимые компоненты переключателя безопасности.

86. Способ по любому из пп. 83-85, где комбинация донорных конструкций на основе нуклеиновой кислоты содержит все необходимые компоненты функционального переключателя безопасности.

87. Способ по любому из пп. 83-86, где необходимые компоненты переключателя безопасности димеризуются с получением функционального переключателя безопасности.

88. Способ по любому из пп. 83-87, где генетическая нагрузка из первой донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты включается в состав первого аллеля существенного гена, а генетическая нагрузка из второй донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты включается в состав второго аллеля существенного гена.

89. Способ по любому из пп. 83–88, где один или несколько необходимых компонентов переключателя безопасности включаются в состав первого аллеля существенного гена, а остальные необходимые компоненты переключателя безопасности включаются в состав второго аллеля существенного гена.

90. Способ по любому из пп. 83-89, где активация переключателя безопасности запускается клеточным событием, событием окружающей среды или химическим средством.

91. Способ по любому из пп. 83-90, где активация переключателя безопасности индуцирует апоптоз.

92. Способ по любому из пп. 83-91, где активация переключателя безопасности подавляет рост клеток, в которые были включены все необходимые компоненты переключателя безопасности.

93. Популяция клеток, полученная посредством способа по любому из пп. 83-92.

94. Популяция клеток по п. 93, где клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки (PSC).

95. Популяция клеток по п. 93, где клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC).

96. Клетка из популяции клеток по любому из пп. 93-95, где клетка дифференцируется в дифференцированную клетку.

97. Дифференцированная клетка по п. 96, где дифференцированная клетка выбрана из:

клетки иммунной системы, необязательно выбранной из Т-клетки, Т-клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), супрессивной Т-клетки, миелоидной клетки, дендритной клетки и макрофага;

клетки нервной системы, необязательно выбранной из дофаминергического нейрона, микроглиальной клетки, олигодендроцита, астроцита, кортикального нейрона, спинномозгового нейрона

или нейрона глазодвигательного нерва, энтерального нейрона, клетки, происходящей из плакоды, шванновской клетки и нейрона тройничного нерва или чувствительного нейрона;

клетки глазной системы, необязательно выбранной из клетки пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторной колбочковой клетки, фоторецепторной палочковой клетки, биполярной клетки и ганглиозной клетки;

клетки сердечно-сосудистой системы, необязательно выбранной из кардиомиоцита, эндотелиальной клетки и клетки лимфатического узла; или

клетки метаболической системы, необязательно выбранной из гепатоцита, холангиоцита и бета-клетки поджелудочной железы.

98. Способ увеличения процентной доли клеток в популяции клеток по пп. 93-97, в которые включена генетическая нагрузка в заранее определенном геномном положении, включающий:

образование первой популяции клеток млекопитающих, содержащей клетки по любому из пп. 93–97, путем предоставления по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, содержащей специфическую генетическую нагрузку, фланкированную первой гомологичной областью (HR) и второй HR, где первая и вторая HR по существу гомологичны первой геномной области (GR) и второй GR соответственно, где первая GR и вторая GR прилегают к заранее определенному геномному положению в экзоне существенного гена в клетке млекопитающего и фланкируют его,

получение системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение,

предоставление по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты и системы редактирования генов первой популяции клеток млекопитающих,

культивирование первой популяции клеток млекопитающих и

определение процентной доли выживших клеток, которые содержат специфическую генетическую нагрузку,

образование второй популяции клеток млекопитающих путем размножения выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих путем предоставления выжившим клеткам из первой популяции клеток млекопитающих системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение;

необязательно повторное введение по меньшей мере одной донорной конструкции;

культивирование второй популяции клеток млекопитающих и

определение процентной доли выживших клеток, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку,

где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку, является более высокой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку.

99. Способ по п. 98, где множество выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, уничтожается в ходе образования второй популяции клеток млекопитающих.

100. Способ по п. 98 или п. 99, где во множество выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, включаются специфические генетические нагрузки в ходе образования второй популяции клеток млекопитающих.

101. Способ по любому из пп. 98-100, где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфические генетические нагрузки, является в по меньшей мере три раза более высокой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфические генетические нагрузки.

102. Способ по любому из предыдущих пп. 98-101, где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, является в по меньшей мере пять (5) раз более низкой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки.

103. Способ по любому из пп. 98-102, где по меньшей мере одна из донорных конструкций на основе нуклеиновой кислоты имеет генетическую нагрузку, отличную от таковой у по меньшей мере одной другой донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, и в по меньшей мере множество клеток из второй популяции клеток млекопитающих включается каждая из разных генетических нагрузок.

104. Способ по любому из пп. 98-103, где по меньшей мере одна из HR-областей содержит по меньшей мере одну мутацию, которая предотвращает разрезание генетической нагрузки в сайте разрезания нуклеазой.

105. Способ по пп. 98-104, где определение процентной доли выживших клеток осуществляют посредством проточной цитометрии.

106. Сконструированная iPSC, содержащая геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в геноме iPSC, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для переключателя безопасности в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей GAPDH или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где iPSC экспрессирует представляющий интерес продукт гена и GAPDH или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена и GAPDH необязательно экспрессируются из эндогенного промотора гена GAPDH.

107. iPSC по п. 106, где геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

108. iPSC по п. 107, где геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

109. iPSC по любому из пп. 106-108, где геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

110. iPSC по любому из пп. 106-109, где кодирующая последовательность гена GAPDH менее чем на 100% идентична эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH.

111. iPSC по любому из пп. 106-110, где геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

112. iPSC по любому из пп. 106-111 для применения в качестве лекарственного препарата.

113. iPSC по любому из пп. 106-112 для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, рака.

114. Система для редактирования генома iPSC в популяции iPSC, при этом система содержит популяцию iPSC, нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую переключатель безопасности в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и ниже нее (с 3'-стороны от нее).

115. Система по п. 114, где разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

116. Система по любому из пп. 114-115, где разрыв расположен в пределах последнего экзона гена GAPDH.

117. Система по любому из пп. 114-116, где нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и система дополнительно содержит направляющую молекулу для нуклеазы CRISPR/Cas.

118. Система по любому из пп. 114-116, где нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу.

119. Система по любому из пп. 114-118, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

120. Система по п. 119, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

121. Система по любому из пп. 114-120, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

122. Система по любому из пп. 114-121, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC.

123. Система по п. 122, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH в iPSC с удалением сайта-мишени для ДНК-нуклеазы и/или с уменьшением вероятности гомологичной рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном iPSC.

124. Система по п. 123, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность гена GAPDH в нокин-кассете не содержит сайт-мишень для нуклеазы.

125. Способ увеличения процентной доли генетически модифицированных клеток млекопитающих с желаемой генетической нагрузкой в популяции клеток млекопитающих, включающий:

образование первой популяции клеток млекопитающих путем предоставления по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, содержащей специфическую генетическую нагрузку, фланкированную первой гомологичной областью (HR) и второй HR, где первая и вторая HR по

существу гомологичны первой геномной области (GR) и второй GR соответственно, где первая GR и вторая GR прилегают к заранее определенному геномному положению в экзоне существенного гена в клетке млекопитающего и фланкируют его,

получение системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение,

предоставление по меньшей мере одной донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты и системы редактирования генов первой популяции клеток млекопитающих,

культивирование первой популяции клеток млекопитающих и

определение процентной доли выживших клеток, которые содержат специфическую генетическую нагрузку,

образование второй популяции клеток млекопитающих путем предоставления выжившим клеткам из первой популяции клеток млекопитающих системы редактирования генов, содержащей нуклеазу, нацеленную на заранее определенное геномное положение;

необязательно повторное введение по меньшей мере одной донорной конструкции;

культивирование второй популяции клеток млекопитающих и

определение процентной доли выживших клеток, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку,

где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку, является более высокой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфическую экзогенную генетическую нагрузку.

126. Способ по п. 125, где множество выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, уничтожается в ходе образования второй популяции клеток млекопитающих.

127. Способ по любому из пп. 125-126, где во множество выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, включаются специфические генетические нагрузки в ходе образования второй популяции клеток млекопитающих.

128. Способ по любому из пп. 125-127, где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфические генетические нагрузки, является в по меньшей мере три (3) раза более высокой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые содержат специфические генетические нагрузки.

129. Способ по любому из пп. 125-128, где по меньшей мере одна из донорных конструкций на основе нуклеиновой кислоты имеет генетическую нагрузку, отличную от таковой у по меньшей мере одной другой донорной конструкции на основе нуклеиновой кислоты, и в по меньшей мере множество клеток из второй популяции клеток млекопитающих включается каждая из разных генетических нагрузок.

130. Способ по любому из пп. 125-129, где процентная доля выживших клеток из второй популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки, является в по меньшей мере пять (5) раз более низкой, чем процентная доля выживших клеток из первой популяции клеток млекопитающих, которые не содержат специфические генетические нагрузки.

131. Способ по любому из пп. 125-130, где по меньшей мере одна из HR-областей содержит по меньшей мере одну мутацию, которая предотвращает разрезание генетической нагрузки в сайте разрезания нуклеазой.

132. Способ по любому из пп. 125-131, где определение процентной доли выживших клеток осуществляют посредством проточной цитометрии.

133. Популяция клеток, полученная посредством способа по любому из пп. 125-132.

134. Популяция клеток по п. 133, где клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки (PSC).

135. Популяция клеток по п. 133, где клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC).

136. Клетка из популяции клеток по любому из пп. 133-135, где клетка дифференцируется в дифференцированную клетку.

137. Дифференцированная клетка по п. 136, где дифференцированная клетка выбрана из:

клетки иммунной системы, необязательно выбранной из Т-клетки, Т-клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), супрессивной Т-клетки, миелоидной клетки, дендритной клетки и макрофага;

клетки нервной системы, необязательно выбранной из дофаминергического нейрона, микроглиальной клетки, олигодендроцита, астроцита, кортикального нейрона, спинномозгового нейрона или нейрона глазодвигательного нерва, энтерального нейрона, клетки, происходящей из плакоды, шванновской клетки и нейрона тройничного нерва или чувствительного нейрона;

клетки глазной системы, необязательно выбранной из клетки пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторной колбочковой клетки, фоторецепторной палочковой клетки, биполярной клетки и ганглиозной клетки;

клетки сердечно-сосудистой системы, необязательно выбранной из кардиомиоцита, эндотелиальной клетки и клетки лимфатического узла; или

клетки метаболической системы, необязательно выбранной из гепатоцита, холангиоцита и бета-клетки поджелудочной железы.

138. iPSC по п. 135, где геном iPSC содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию GAPDH и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

139. iPSC по п. 138, где геном iPSC содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью гена GAPDH и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

140. iPSC по любому из пп. 138-139, где геном iPSC содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

141. iPSC по любому из пп. 138-140, где кодирующая последовательность гена GAPDH менее чем на 100% идентична эндогенной кодирующей последовательности гена GAPDH.

142. iPSC по любому из пп. 138-141, где геном iPSC не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

143. iPSC по любому из пп. 138-142 для применения в качестве лекарственного препарата.

144. iPSC по любому из пп. 138-143 для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, рака.

145. Способ редактирования генома плюрипотентной стволовой клетки или клетки iPS, при этом способ включает приведение клетки в контакт с:

(i) нуклеазой, которая вызывает разрыв в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и

(ii) донорной матрицей, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где нокин-кассета интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) разрыва, с получением в результате этого клетки с отредактированным геномом, которая экспрессирует:

(a) представляющий интерес продукт гена и

(b) продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант.

146. Способ по п. 145, где в случае, если нокин-кассета не интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR) в правильных положении или ориентации, клетка больше не экспрессирует продукт гена, кодируемый существенным геном, или его функциональный вариант.

147. Способ по п. 145 или п. 146, где разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

148. Способ по любому из пп. 145-147, где разрыв расположен в пределах последних 1000, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

149. Способ по любому из пп. 145-147, где разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена.

150. Способ по любому из пп. 145-149, где нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с направляющей молекулой для нуклеазы CRISPR/Cas.

151. Способ по любому из пп. 145-149, где нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу.

152. Способ по любому из пп. 145-151, где донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой.

153. Способ по п. 152, где донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

154. Способ по любому из пп. 145-153, где донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты.

155. Способ по п. 154, где плечи гомологии соответствуют последовательностям, расположенным по обе стороны от разрыва в геноме клетки.

156. Способ по любому из пп. 145-155, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

157. Способ по п. 156, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

158. Способ по п. 157, где элемент 2A представляет собой элемент T2A (EGRGSLLTCGDVEENPGP), элемент P2A (ATNFSLLKQAGDVEENPGP), элемент E2A (QCTNYALLKLAGDVESNPGP) или элемент F2A (VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP).

159. Способ по п. 157 или п. 158, где нокин-кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкерный пептид, расположенный выше элемента 2A.

160. Способ по п. 159, где линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность GSG.

161. Способ по любому из пп. 145-160, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

162. Способ по любому из пп. 145-161, где экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном.

163. Способ по п. 162, где С-концевой фрагмент имеет длину менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.

164. Способ по п. 162 или п. 163, где С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью эндогенной кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

165. Способ по любому из пп. 145-164, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке.

166. Способ по п. 165, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью, для уменьшения вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки и/или для увеличения экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

167. Способ по любому из пп. 145-166, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

168. Способ по любому из пп. 145-166, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

169. Способ по п. 168, где клетки, происходящие из iPS, представляют собой NK-клетки, происходящие из iPS, или T-клетки, происходящие из iPS.

170. Способ по любому из пп. 145-169, где донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

171. Способ по любому из пп. 145-170, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин (например, интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант), человеческий лейкоцитарный антиген (например, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E)), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

172. Генетически модифицированная плюрипотентная стволовая клетка или клетка iPS, содержащая геном с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки.

173. Сконструированная плюрипотентная стволовая клетка или клетка iPS, содержащая геномную модификацию, где геномная модификация включает вставку экзогенной нокин-кассеты в пределах эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в геноме клетки, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, где нокин-кассета содержит экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью, кодирующей продукт гена из существенного гена или его функциональный вариант, и ниже нее (с 3'-стороны от нее), и где клетка экспрессирует представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, или их функциональный вариант, где представляющий интерес продукт гена и продукт гена, кодируемый существенным геном, необязательно экспрессируются из эндогенного промотора существенного гена.

174. Клетка по п. 172 или п. 173, где геном клетки содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

175. Клетка по п. 174, где геном клетки содержит элемент IRES или 2A, расположенный между кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

176. Клетка по любому из пп. 172-175, где геном клетки содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия

последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

177. Клетка по любому из пп. 172-176, где кодирующая последовательность существенного гена менее чем на 100% идентична эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

178. Клетка по любому из пп. 172-177, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

179. Клетка по любому из пп. 172-177, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

180. Клетка по п. 179, где клетки, происходящие из iPS, представляют собой NK-клетки, происходящие из iPS, или T-клетки, происходящие из iPS.

181. Клетка по любому из пп. 172-180, где геном клетки не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

182. Клетка по любому из пп. 172-181, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

183. Клетка по любому из пп. 172-182 для применения в качестве лекарственного препарата.

184. Клетка по любому из пп. 172-182 для применения при лечении заболевания, нарушения или состояния, например, рака.

185. Клетка или популяция клеток, полученные посредством способа по любому из пп. 145-171, или их потомство.

186. Система для редактирования генома плюрипотентной стволовой клетки или клетки iPS, при этом система содержит клетку (или популяцию клеток), нуклеазу, которая вызывает разрыв в эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке, где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации клетки, и донорную матрицу, которая содержит нокин-кассету, содержащую экзогенную кодирующую последовательность для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее).

187. Система по п. 186, где разрыв представляет собой двухнитевой разрыв.

188. Система по п. 186 или п. 187, где разрыв расположен в пределах последних 1000, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 пар оснований кодирующей последовательности существенного гена.

189. Система по любому из пп. 186-188, где разрыв расположен в пределах последнего экзона существенного гена.

190. Система по любому из пп. 186-189, где нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas, и система дополнительно содержит направляющую молекулу для нуклеазы CRISPR/Cas.

191. Система по любому из пп. 186-189, где нуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или мегануклеазу.

192. Система по любому из пп. 186-191, где донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой.

193. Система по п. 192, где донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

194. Система по любому из пп. 186-193, где донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты.

195. Система по п. 194, где плечи гомологии соответствуют последовательностям, расположенным по обе стороны от разрыва в геноме клетки.

196. Система по любому из пп. 186-195, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

197. Система по п. 196, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

198. Система по любому из пп. 186-197, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

199. Система по любому из пп. 186-198, где экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого существенным геном.

200. Система по п. 199, где С-концевой фрагмент имеет длину менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.

201. Система по п. 199 или п. 200, где С-концевой фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая кодируется областью кодирующей последовательности существенного гена, охватывающей разрыв.

202. Система по любому из пп. 186-201, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке.

203. Система по п. 202, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена в клетке для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью, для уменьшения вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или для увеличения экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

204. Система по п. 203, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете не содержит сайт-мишень для нуклеазы.

205. Система по любому из пп. 186-204, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

206. Система по любому из пп. 186-205, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

207. Система по п. 206, где клетки, происходящие из iPS, представляют собой NK-клетки, происходящие из iPS, или T-клетки, происходящие из iPS.

208. Система по любому из пп. 186-207, где донорная ДНК-матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

209. Система по любому из пп. 186-208, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.

210. Донорная матрица для применения в редактировании генома плюрипотентной стволовой клетки или клетки iPS, при этом донорная матрица содержит нокин-кассету с экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена в рамке считывания с экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и ниже нее (с 3'-стороны от нее), где существенный ген кодирует продукт гена, который необходим для выживания и/или пролиферации плюрипотентной стволовой клетки или клетки iPS.

211. Донорная матрица по п. 210, где нокин-кассета интегрируется в геном клетки посредством направляемой гомологией репарации (HDR).

212. Донорная матрица по п. 210 или п. 211, где донорная матрица представляет собой донорную ДНК-матрицу, где донорная ДНК-матрица необязательно является двухнитевой.

213. Донорная матрица по любому из пп. 210-212, где донорная ДНК-матрица представляет собой плазмиду, где плазмида необязательно не была линеаризована.

214. Донорная матрица по любому из пп. 210-213, где донорная матрица содержит плечи гомологии по обе стороны от нокин-кассеты.

215. Донорная матрица по любому из пп. 210-214, где нокин-кассета содержит регуляторный элемент, который обеспечивает экспрессию продукта гена, кодируемого существенным геном, и представляющего интерес продукта гена в виде отдельных продуктов генов, где необязательно по меньшей мере один из продуктов генов представляет собой белок, и регуляторный элемент обеспечивает экспрессию этого белка отдельно от другого продукта гена.

216. Донорная матрица по п. 215, где нокин-кассета содержит элемент IRES или 2A, расположенный между экзогенной кодирующей последовательностью или частичной кодирующей последовательностью существенного гена и экзогенной кодирующей последовательностью для представляющего интерес продукта гена.

217. Донорная матрица по любому из пп. 210-216, где нокин-кассета содержит последовательность полиаденилирования и необязательно последовательность 3'-UTR, расположенную ниже экзогенной кодирующей последовательности для представляющего интерес продукта гена, где в случае присутствия последовательности 3'-UTR последовательность 3'-UTR расположена с 3'-стороны от экзогенной кодирующей последовательности и с 5'-стороны от последовательности полиаденилирования.

218. Донорная матрица по любому из пп. 210-217, где экзогенная частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете кодирует С-концевой фрагмент белка, кодируемого эндогенной кодирующей последовательностью существенного гена.

219. Донорная матрица по п. 218, где С-концевой фрагмент имеет длину менее 500, 250, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.

220. Донорная матрица по любому из пп. 210-219, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете менее чем на 100% идентична соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена.

221. Донорная матрица по п. 220, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете была кодон-оптимизирована относительно соответствующей эндогенной кодирующей последовательности существенного гена для предотвращения дополнительного связывания нуклеазы с сайтом-мишенью, для уменьшения вероятности рекомбинации после интеграции нокин-кассеты в геном клетки или для увеличения экспрессии продукта гена из существенного гена и/или представляющего интерес продукта гена после интеграции нокин-кассеты в геном клетки.

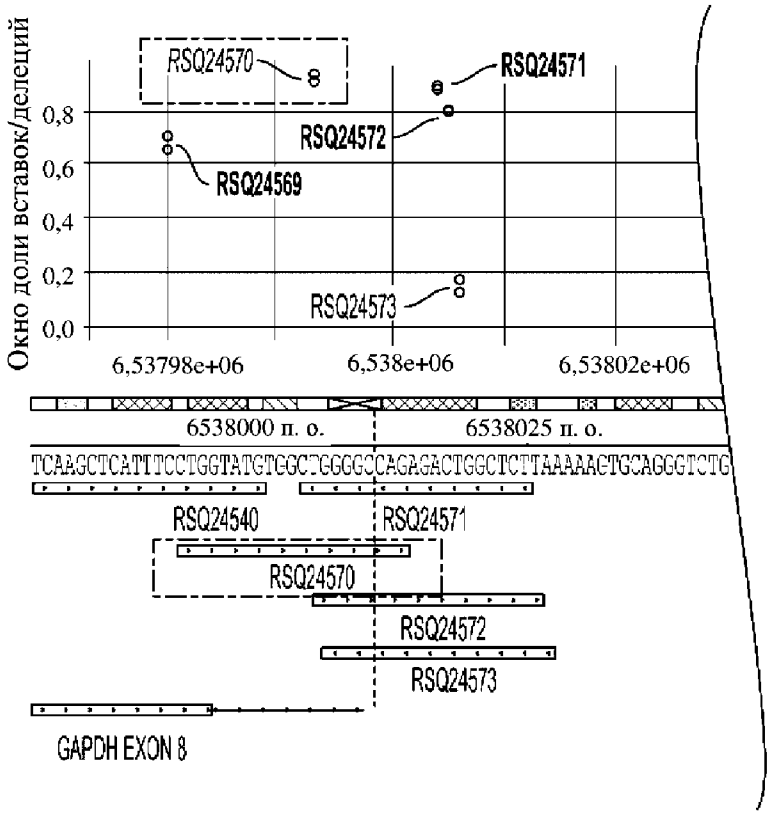
222. Донорная матрица по п. 221, где экзогенная кодирующая последовательность или частичная кодирующая последовательность существенного гена в нокин-кассете не содержит сайт-мишень для нуклеазы.

223. Донорная матрица по любому из пп. 210-222, где существенный ген представляет собой ген "домашнего хозяйства", например, ген, представленный в таблице 3.

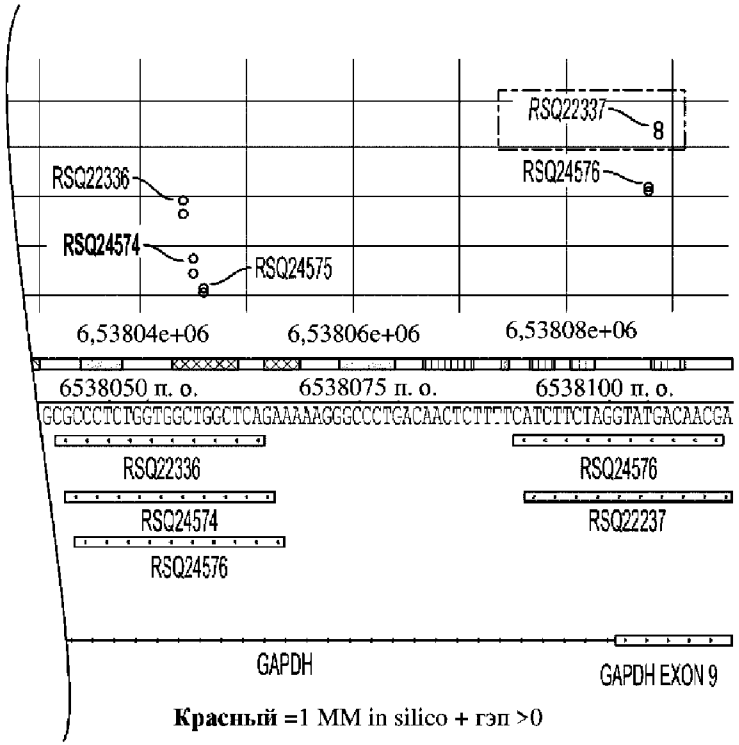
224. Донорная матрица по любому из пп. 210-223, где клетка представляет собой клетку iPS или клетку ES, и существенный ген вовлекается в дифференцировку клеток iPS или ES или размножение клеток, происходящих из iPS или ES, например, ген, представленный в таблице 4.

225. Донорная матрица по любому из пп. 210-224, где донорная матрица не содержит репортерный ген, например, ген флуоресцентного репортерного белка или ген устойчивости к антибиотикам.

226. Донорная матрица по любому из пп. 210-225, где представляющий интерес продукт гена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), не встречающийся в природе вариант FcγRIII (CD16), интерлейкин 15 (IL-15), рецептор интерлейкина 15 (IL-15R) или его вариант, интерлейкин 12 (IL-12), рецептор интерлейкина 12 (IL-12R) или его вариант, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), человеческий лейкоцитарный антиген E (HLA-E), поверхностный лейкоцитарный антиген кластер дифференцировки CD47 (CD47) или любую комбинацию двух или более из них.


Окно доли вставок/делеций
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
RSQ24570
RSQ24571
RSQ24572
RSQ24569
RSQ24573
6,53798e+06
6,538e+06
6,53802e+06
6538000 п. о.
6538025 п. о.
TCAAGCTCATTTCCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTGGCTCTTAAAAACTGCAGGGTCTG
RSQ24540
RSQ24571
RSQ24570
RSQ24572
RSQ24573
GAPDH EXON 8

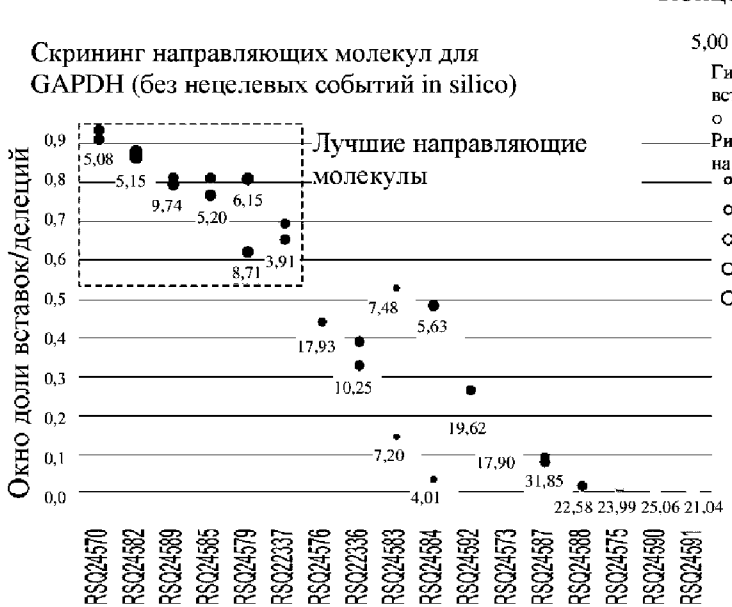
ФИГ. 1



Красный =1 MM in silico + гэп >0

ФИГ. 1

ПРОДОЛЖЕНИЕ

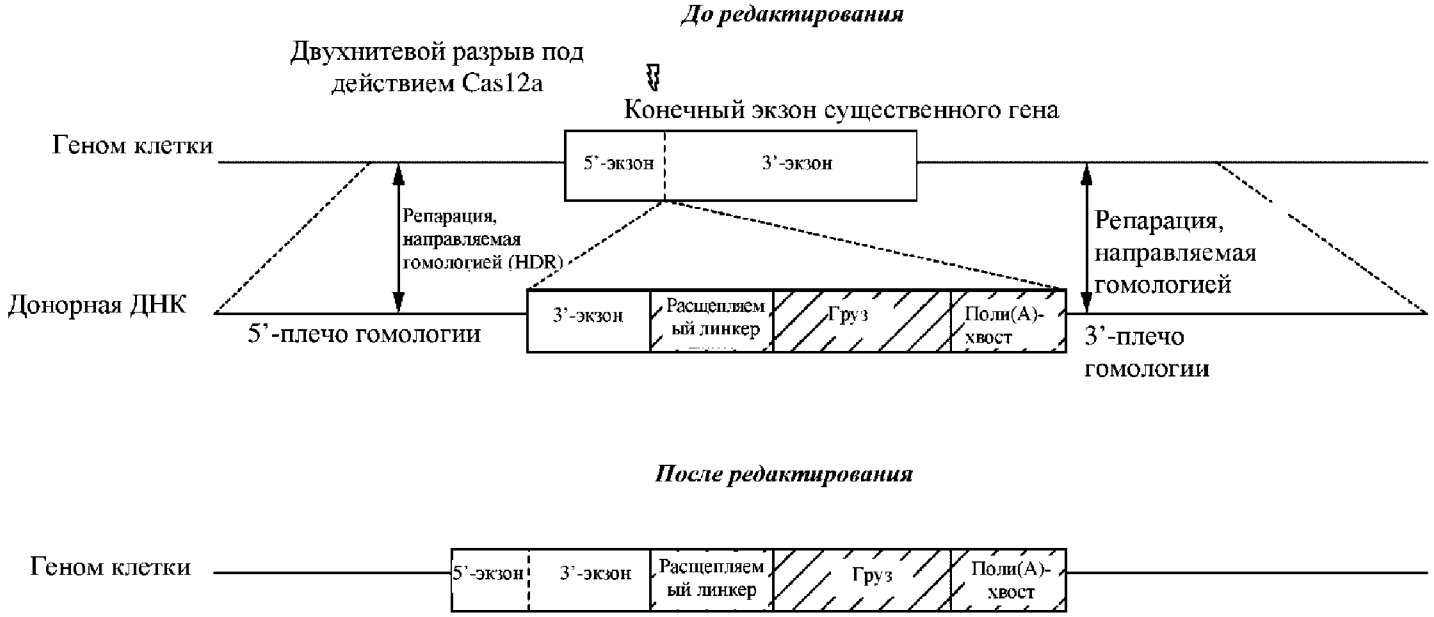


Сводные данные

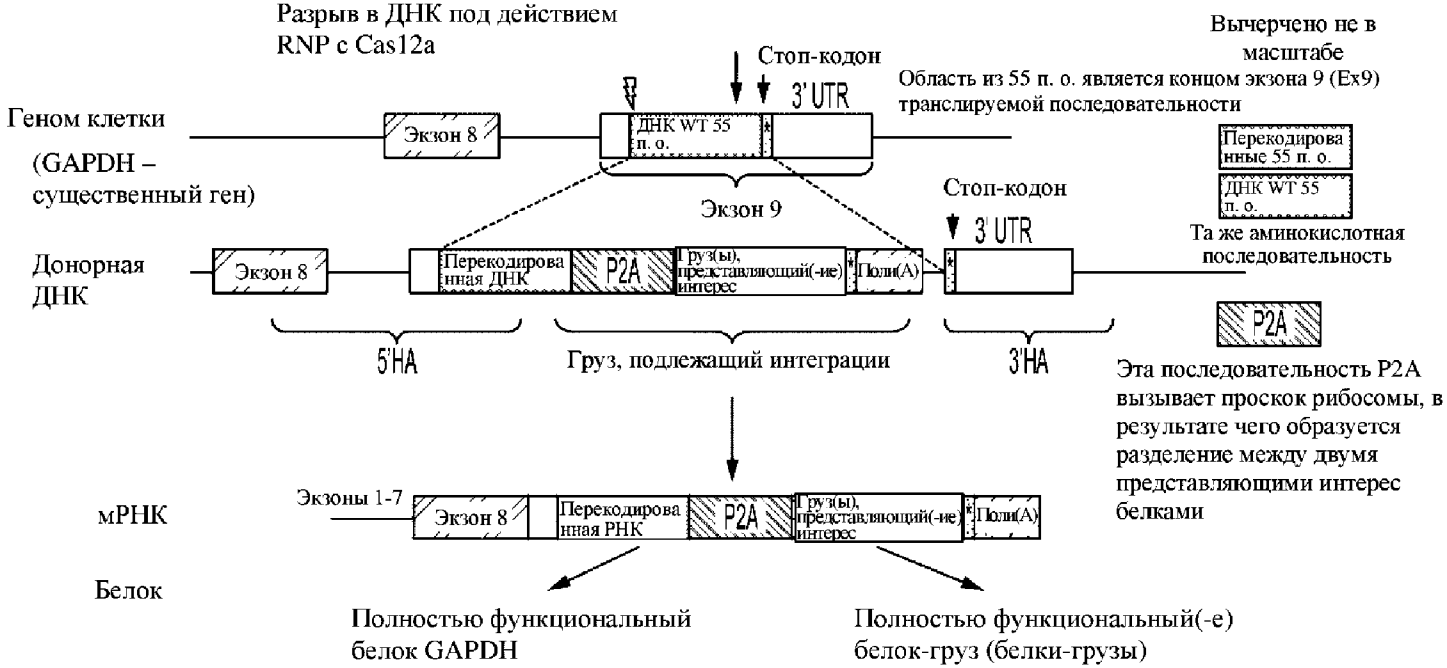
- Направляющие молекулы с ≥ 1 MM in silico + гэп удалены.
- Концентрация gDNA в образце значительно снижена при уровнях редактирования более 30%.
- Количество ридов, картированных на мишень, снижено для некоторых направляющих молекул с уровнем редактирования от среднего до низкого.

Лучшие направляющие молекулы	% редактирования	1 MM + гэпы	2 MM + гэпы
RSQ24570	91,5	0	35
RSQ24582	88,5	0	9
RSQ24589	87,5	0	51
RSQ24585	86,5	0	3
RSQ22337	69,5	0	3

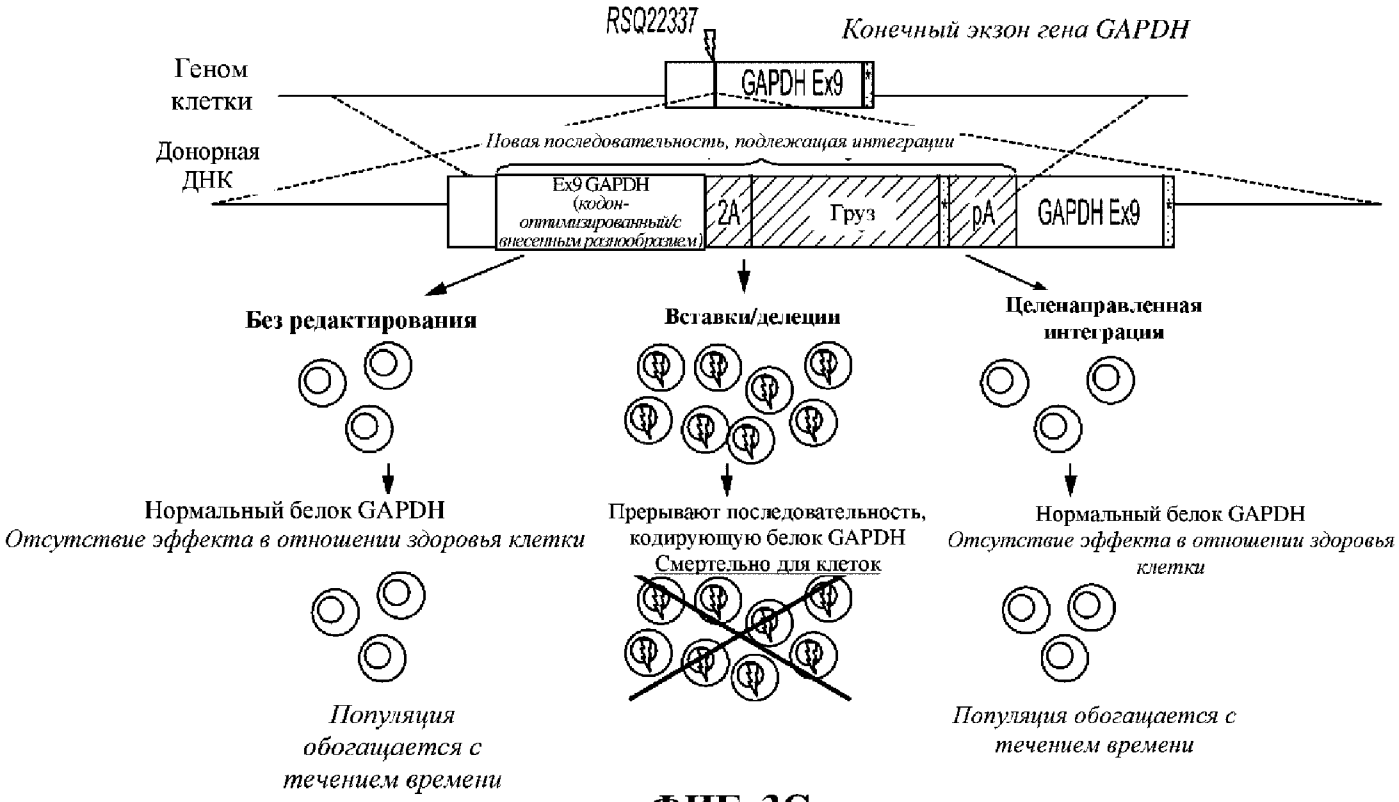
ФИГ. 2


До редактирования
Двухнитевой разрыв под действием Cas12a
Конечный экзон существенного гена
Геном клетки
5'-экзон
3'-экзон
Репарация, направляемая гомологией (HDR)
Репарация, направляемая гомологией
Донорная ДНК
3'-экзон
Расщепляемый линкер
Груз
Поли(А)-хвост
5'-плечо гомологии
3'-плечо гомологии
После редактирования
Геном клетки
5'-экзон
3'-экзон
Расщепляемый линкер
Груз
Поли(А)-хвост

ФИГ. 3А


Разрыв в ДНК под действием RNP с Cas12a
Стоп-кодон
3' UTR
Вычерчено не в масштабе
Область из 55 п. о. является концом экзона 9 (Ex9) транслируемой последовательности
Геном клетки
(GAPDH – существенный ген)
Экзон 8
ДНК WT 55 п. о.
Перекодированные 55 п. о.
ДНК WT 55 п. о.
Экзон 9
Стоп-кодон
3' UTR
Та же аминокислотная последовательность
Донорная ДНК
Экзон 8
Перекодированная ДНК
P2A
Груз(ы), представляющий(-ие) интерес
Поли(А)
P2A
5'HA
Груз, подлежащий интеграции
3'HA
Эта последовательность P2A вызывает проскок рибосомы, в результате чего образуется разделение между двумя представляющими интерес белками
Экзоны 1-7
мРНК
Экзон 8
Перекодированная РНК
P2A
Груз(ы), представляющий(-ие) интерес
Поли(А)
Белок
Полностью функциональный белок GAPDH
Полностью функциональный(-е) белок-груз (белки-грузы)

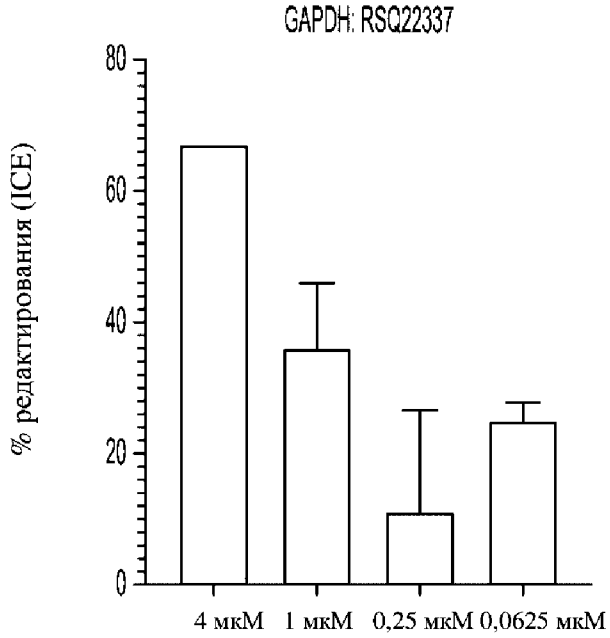
ФИГ. 3В


RSQ22337
Конечный экзон гена GAPDH
Геном клетки
GAPDH Ex9
Донорная ДНК
Новая последовательность, подлежащая интеграции
Ex9 GAPDH (кодон-оптимизированный/с внесенным разнообразием)
2A
Груз
pA
GAPDH Ex9
Без редактирования
Вставки/делеции
Целенаправленная интеграция
Нормальный белок GAPDH
Отсутствие эффекта в отношении здоровья клетки
Популяция обогащается с течением времени
Прерывают последовательность, кодирующую белок GAPDH
Смертельно для клеток
Нормальный белок GAPDH
Отсутствие эффекта в отношении здоровья клетки
Популяция обогащается с течением времени

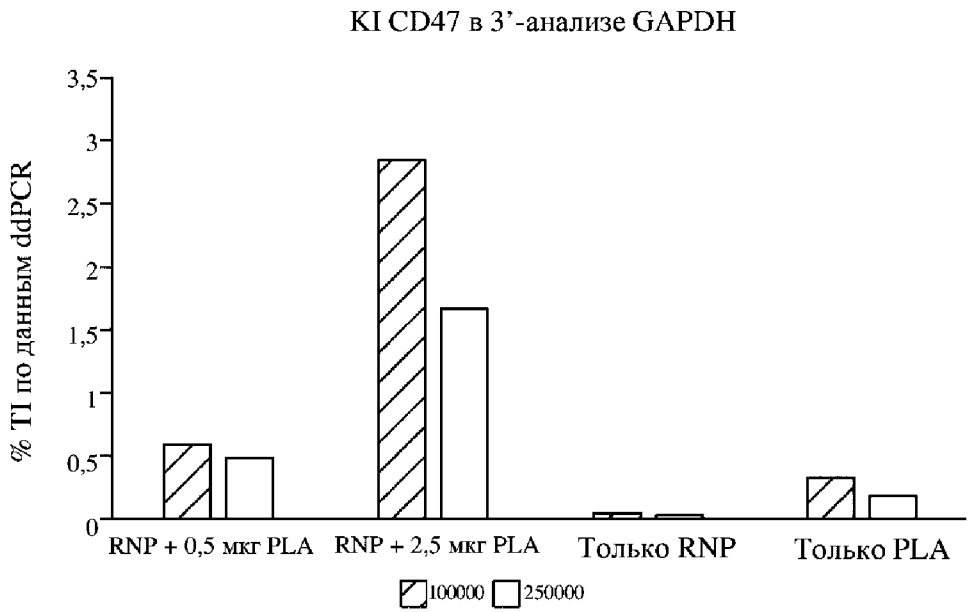
ФИГ. 3С

Перекодированная область ДНК предотвращает повторное связывание и повторное разрезание ДНК под действием Cas12a после нокина (молчащие мутации, например, те же аминокислоты)
Разрыв в ДНК под действием RNP с Cas12a; в пределах ~ 500 п. о. от стартового кодона
Стартовый кодон - Met
Нижерасположенная геномная область, экзоны и интроны
Геном клетки
Энхансер/промотор
5'UTR
ДНК WT для оптимизации
Кодирующая область
Эндогенный нижерасположенный ген-мишень
N-конец, например, экзон 1
Донорная матрица
Энхансер/промотор
Груз(ы), представляющий (-ие) интерес
P2A
Перекодированная ДНК
Кодирующая область
5'HA
Нокин-кассета с грузом, подлежащим интеграции
3'HA
мРНК
Вышерасположенные
Промотор
Груз(ы), представляющий (-ие) интерес
P2A
Перекодированная РНК
Ген-мишень
Белок
Полностью функциональный(-е) белок-груз (белки-грузы)
Полностью функциональный белок, кодируемый существенным геном

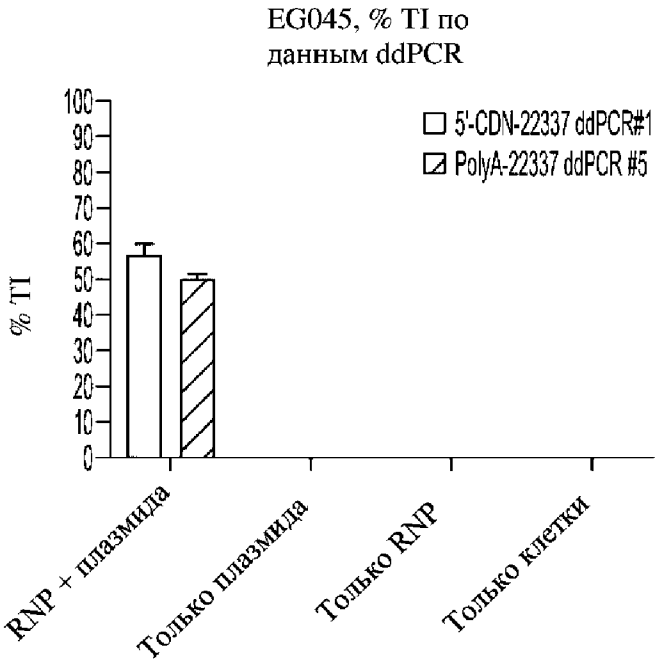
ФИГ. 3D


GAPDH: RSQ22337
% редактирования (ICE)
80
60
40
20
0
4 мкМ
1 мкМ
0,25 мкМ
0,0625 мкМ

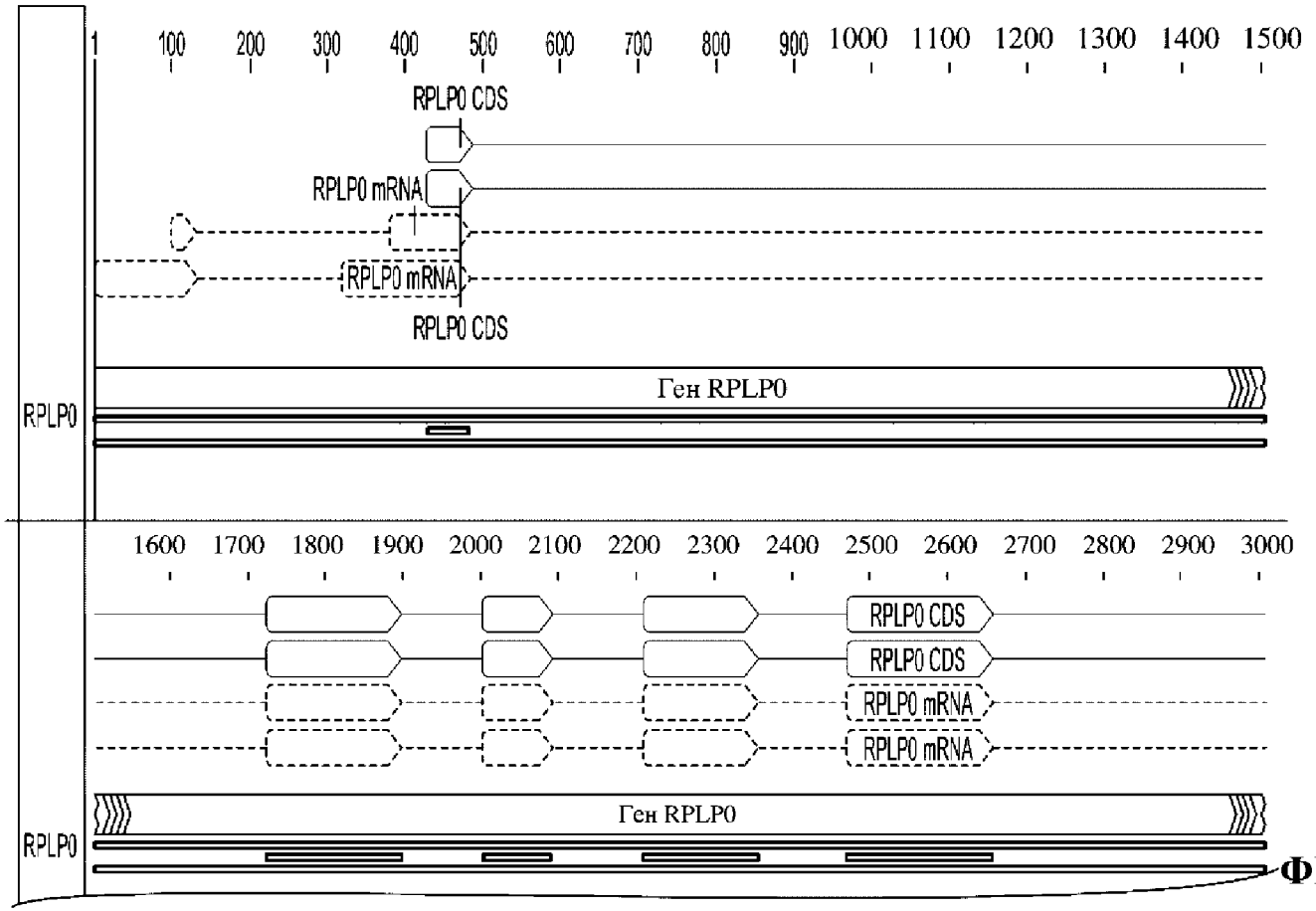
ФИГ. 4


KI CD47 в 3'-анализе GAPDH
% TI по данным ddPCR
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
RNP + 0,5 мкг PLA
RNP + 2,5 мкг PLA
Только RNP
Только PLA
100000
250000

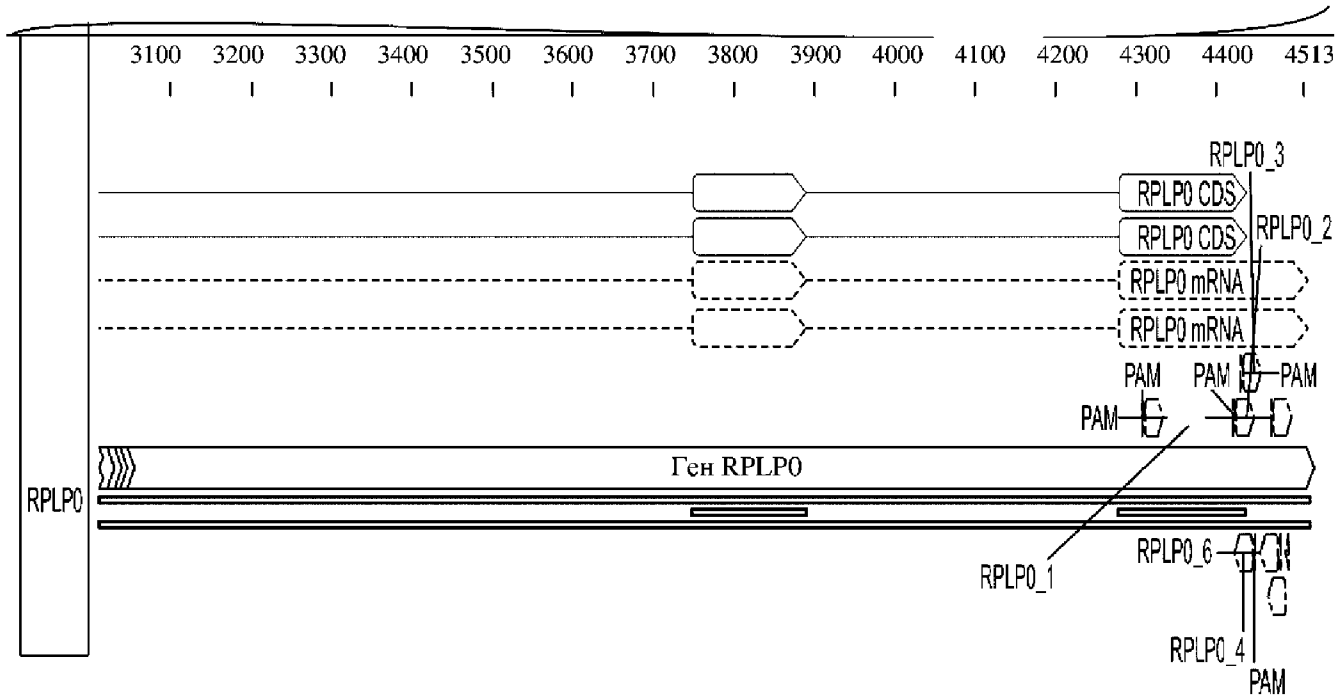
ФИГ. 5


EG045, % TI по данным ddPCR
5'-CDN-22337 ddPCR#1
PolyA-22337 ddPCR #5
% TI
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
RNP + плазмида
Только плазмида
Только RNP
Только клетки

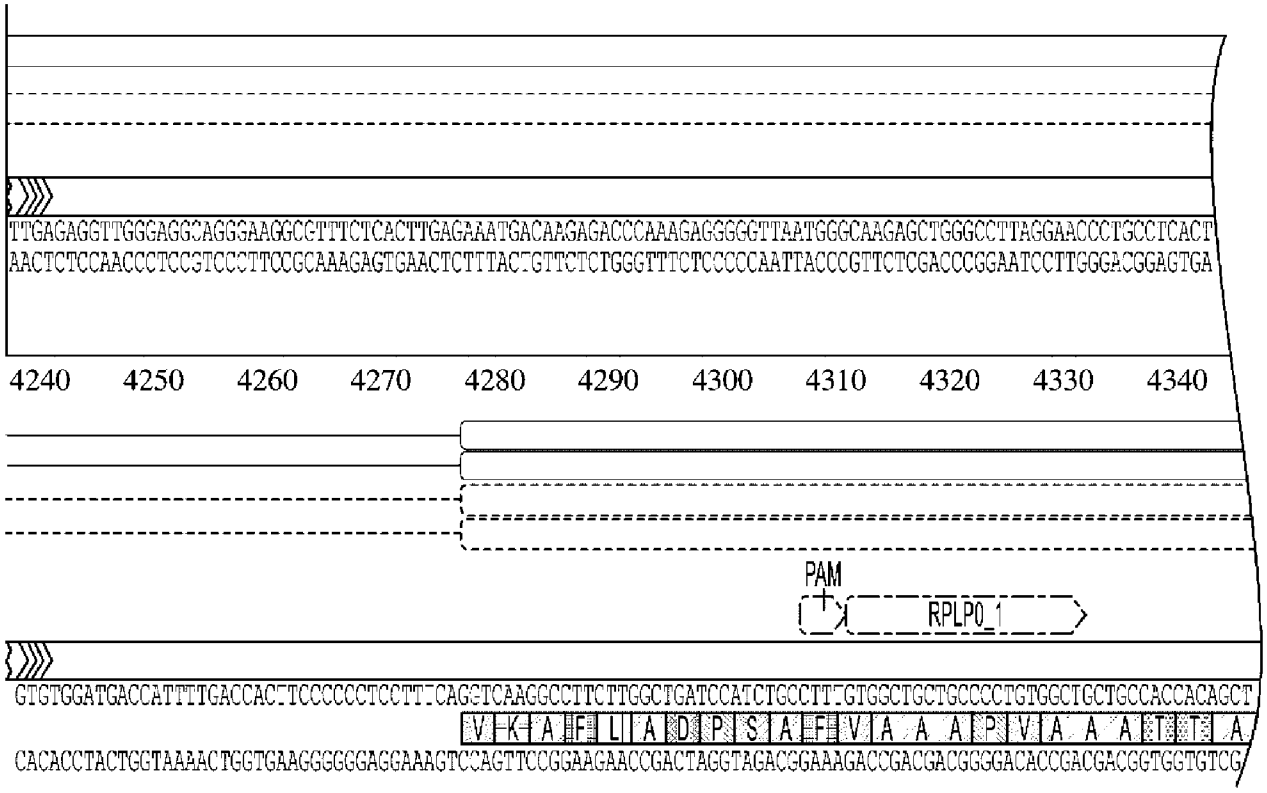
ФИГ. 6


RPLP0
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
RPLP0 CDS
RPLP0 mRNA
RPLP0 mRNA
RPLP0 CDS
Ген RPLP0
RPLP0
1600
1700
1800
1900
2000
2100
2200
2300
2400
2500
2600
2700
2800
2900
3000
RPLP0 CDS
RPLP0 CDS
RPLP0 mRNA
RPLP0 mRNA
Ген RPLP0

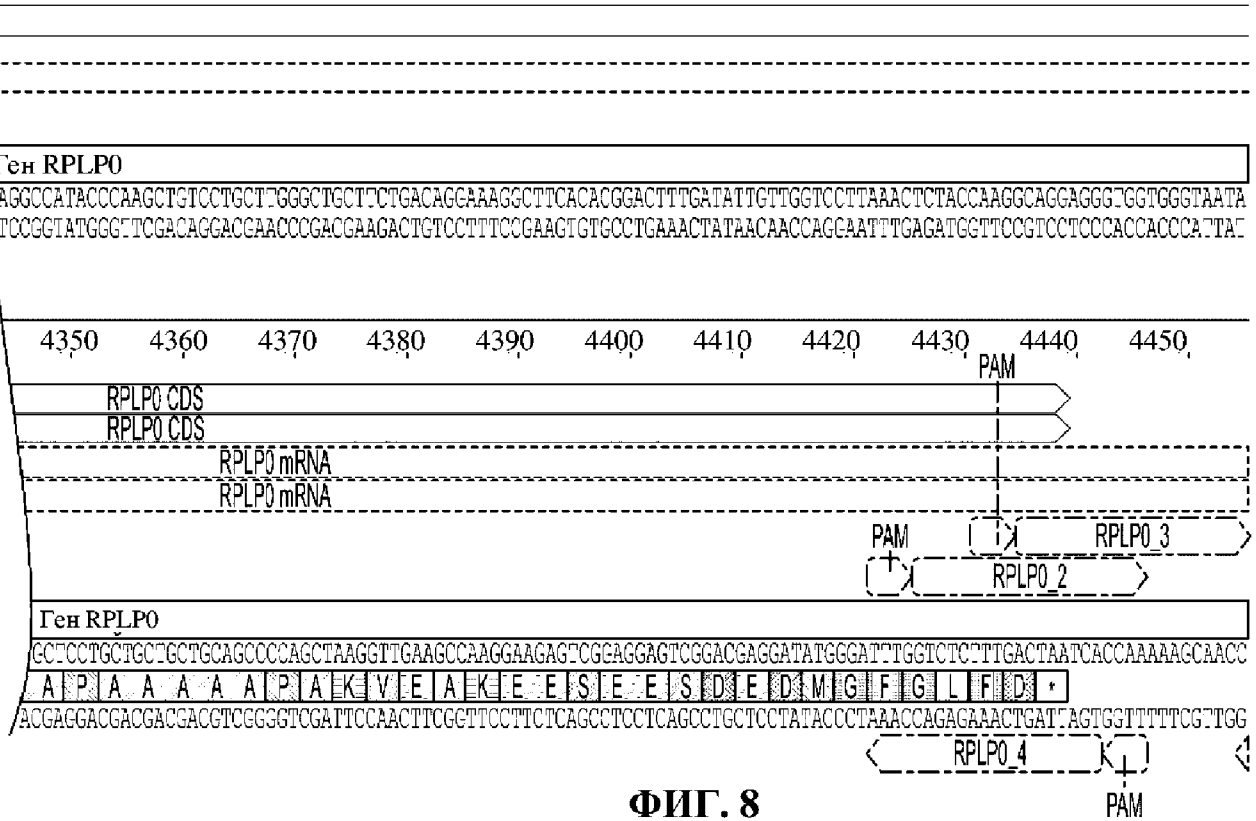
ФИГ. 7



ФИГ. 7
ПРОДОЛЖЕНИЕ

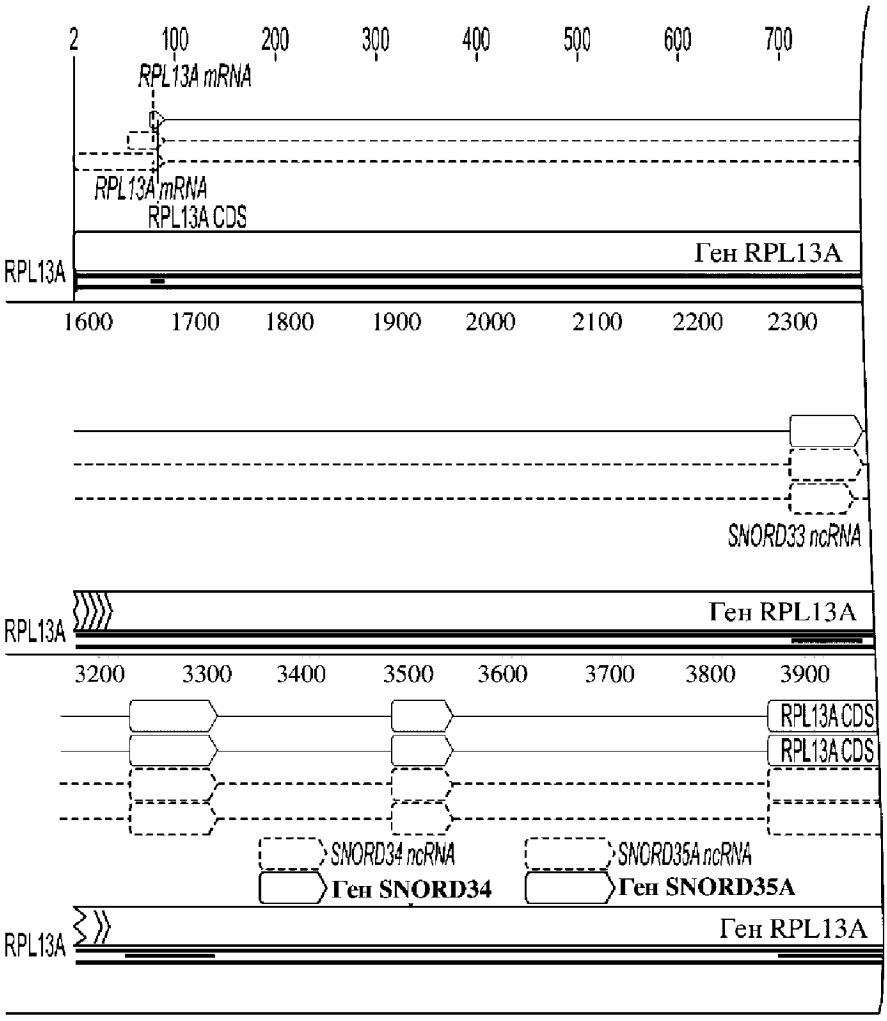

TTGAGAGGTTGGGAGGCAGGGAAGGCGTTTCTCACTTGAGAAATGACAAGAGACCCAAAGAGGGGGTTAATGGGCAAGAGCTGGGCCTTAGGAACCCTGCCTCACT
AACTCTCCAACCCTCCGTCCCTTCCGCAAAGAGTGAACTCTTTACTGTTCTCTGGGTTTCTCCCCCAATTACCCGTTCTCGACCCGGAATCCTTGGGACGGAGTGA
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
PAM
RPLP0_1
GTGTGGATGACCATTTTGACCACCTCCCCCCTCCTTCAGGTCAAGGCCTTCTTGGCTGATCCATCTGCCTTTGTGGCTGCTGCCCCTGTGGCTGCTGCCACCACAGCT
V K A F L A D P S A F V A A A P V A A A T T A
CACACCTACTGGTAAAACTGGTGAAGGGGGGAGGAAAGTCCAGTTCCGGAAGAACCGACTAGGTAGACGGAAAGACCGACGACGGGGACACCGACGACGGTGGTGTCG

ФИГ. 8

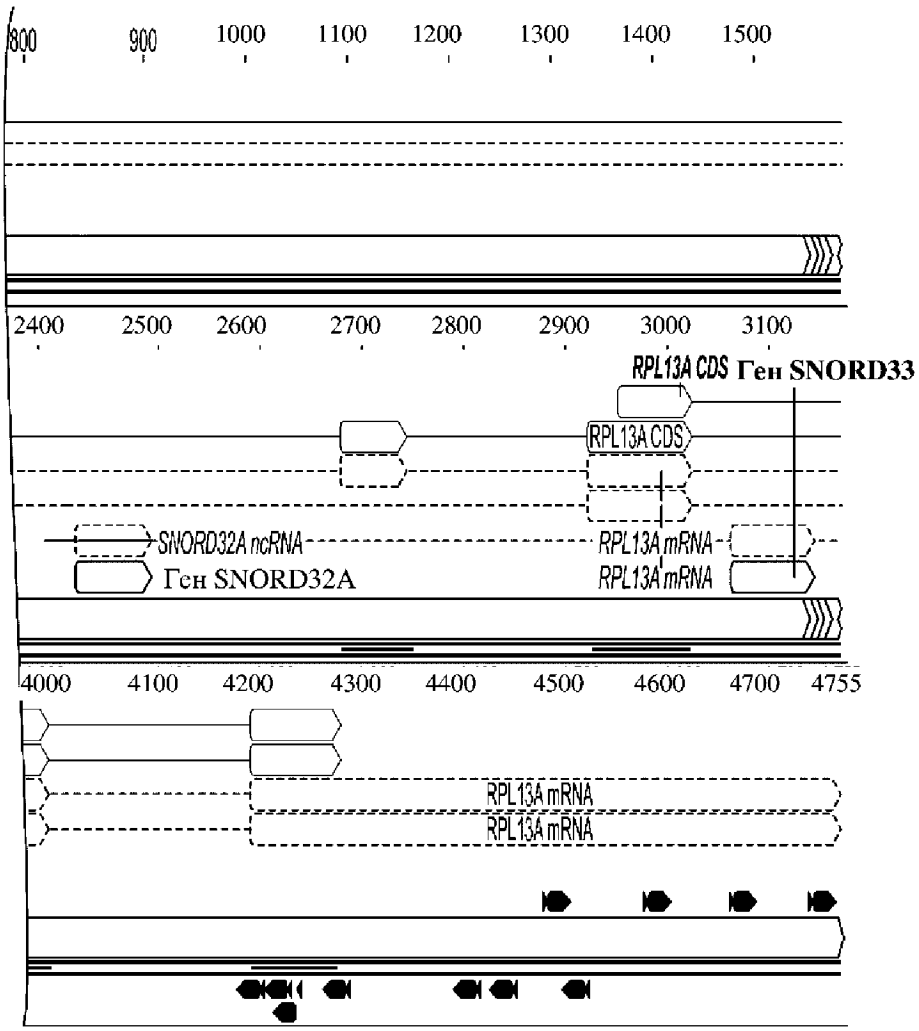


ФИГ. 8

ПРОДОЛЖЕНИЕ

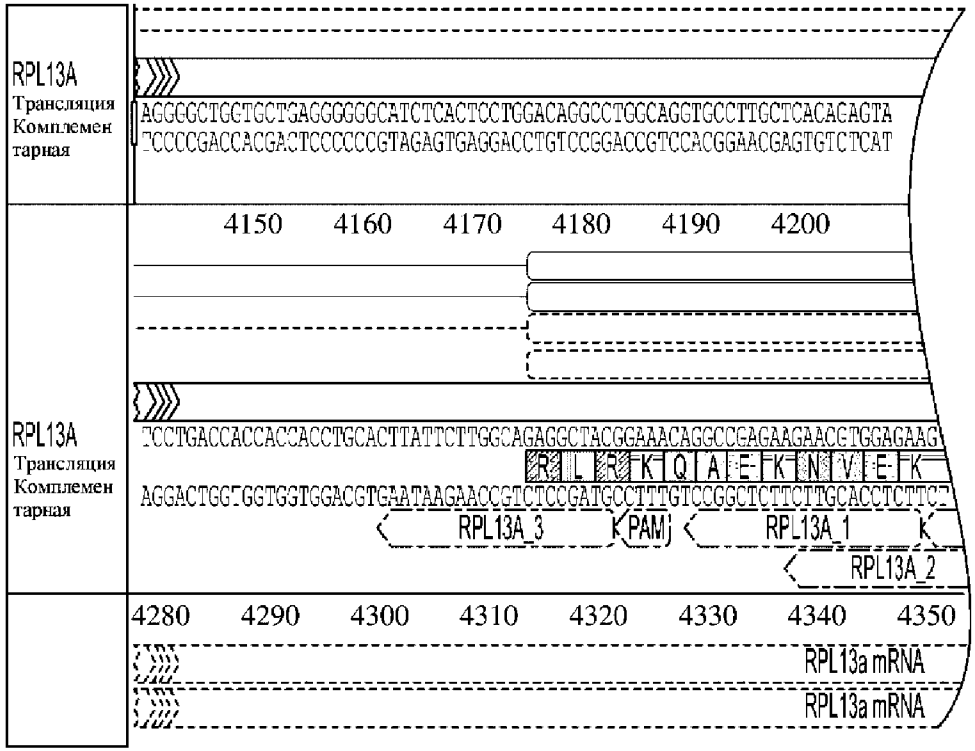

2
100
200
300
400
500
600
700
RPL13A mRNA
RPL13A mRNA
RPL13A CDS
Ген RPL13A
RPL13A
1600
1700
1800
1900
2000
2100
2200
2300
SNORD33 ncRNA
Ген RPL13A
RPL13A
3200
3300
3400
3500
3600
3700
3800
3900
RPL13A CDS
RPL13A CDS
SNORD34 ncRNA
Ген SNORD34
SNORD35A ncRNA
Ген SNORD35A
Ген RPL13A
RPL13A

ФИГ. 9

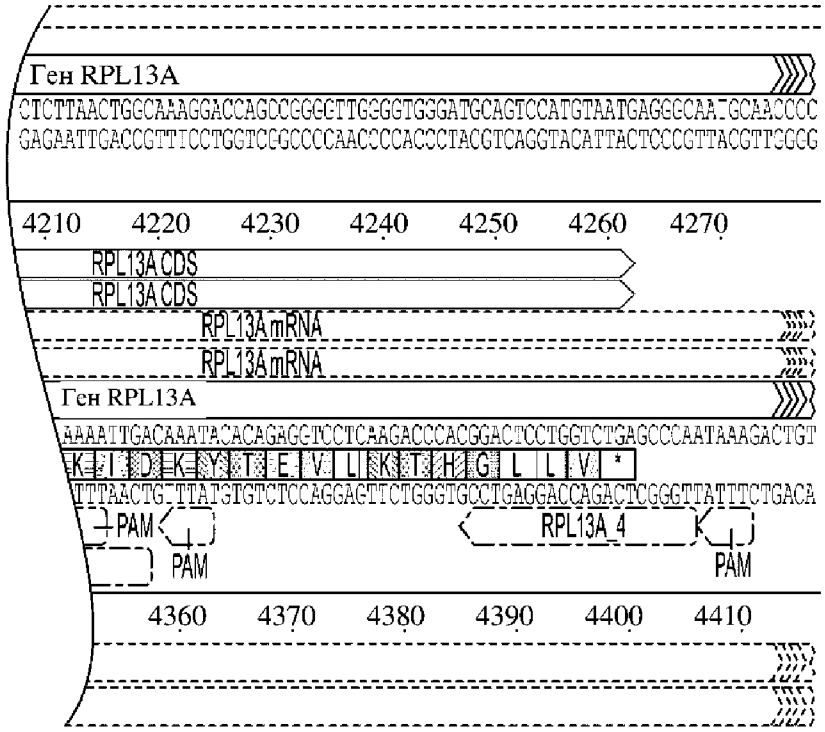


ФИГ. 9

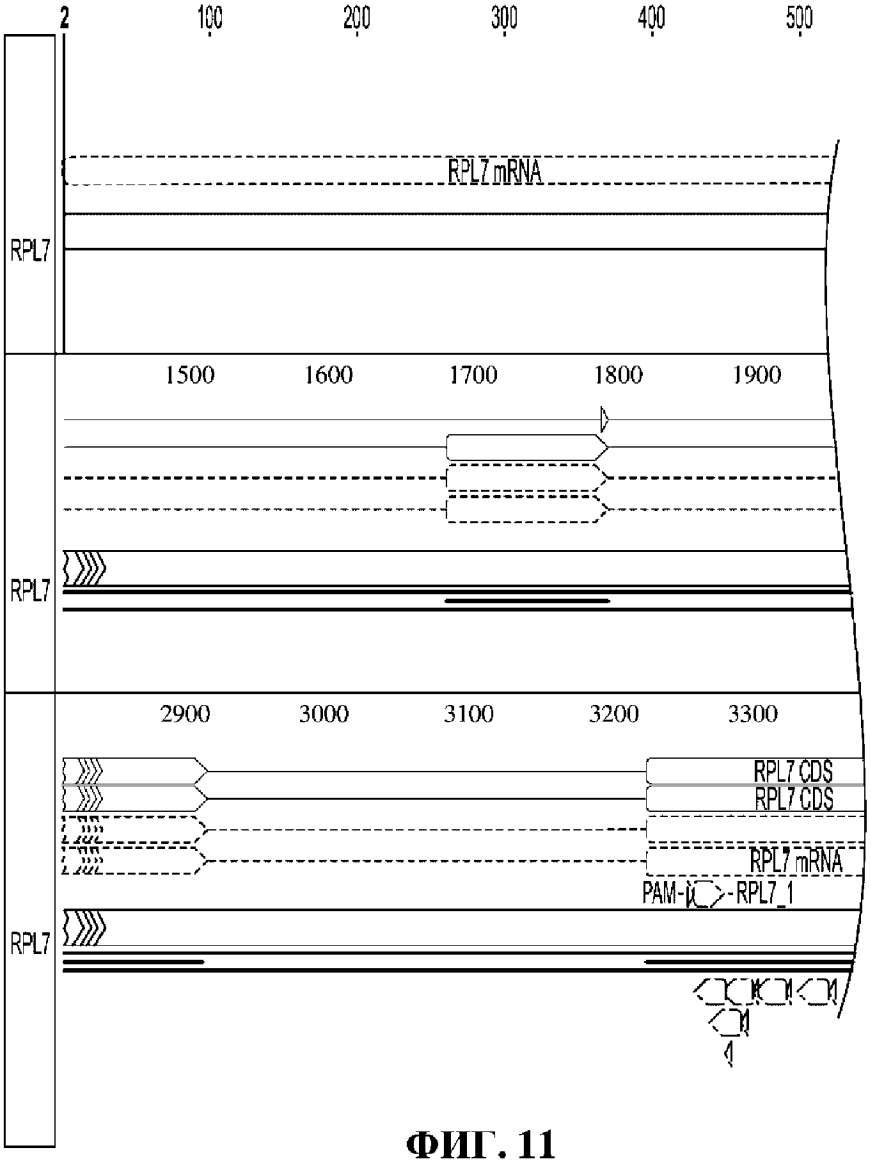
ПРОДОЛЖЕНИЕ


RPL13A
Трансляция
Комплемен
тарная
AGGGGCTGCTGCTGAGGGGGGCATCTCACTCCTGGACAGGCCTGGCAGGTGCCTTGCTCACACAGTA
TCCCCGACCACGACTCCCCCCGTAGAGTGAGGACCTGTCCGGACCGTCCACGGAACGAGTGTCTCAT
4150
4160
4170
4180
4190
4200
RPL13A
Трансляция
Комплемен
тарная
TCCTGACCACCACCACCTGCACTTATTCTTGGCAGAGGCTACGGAAACAGGCCGAGAAGAACGTGGAGAAG
R L K K Q A E K N V E K
AGGACTGGTGGTGGTGGACGTGAATAAGAACCGTCTCCGATGCCTTTGTCCGGCTCTTCTTGCACCTCTTC
RPL13A_3
K
PAM
RPL13A_1
K
RPL13A_2
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
RPL13a mRNA
RPL13a mRNA

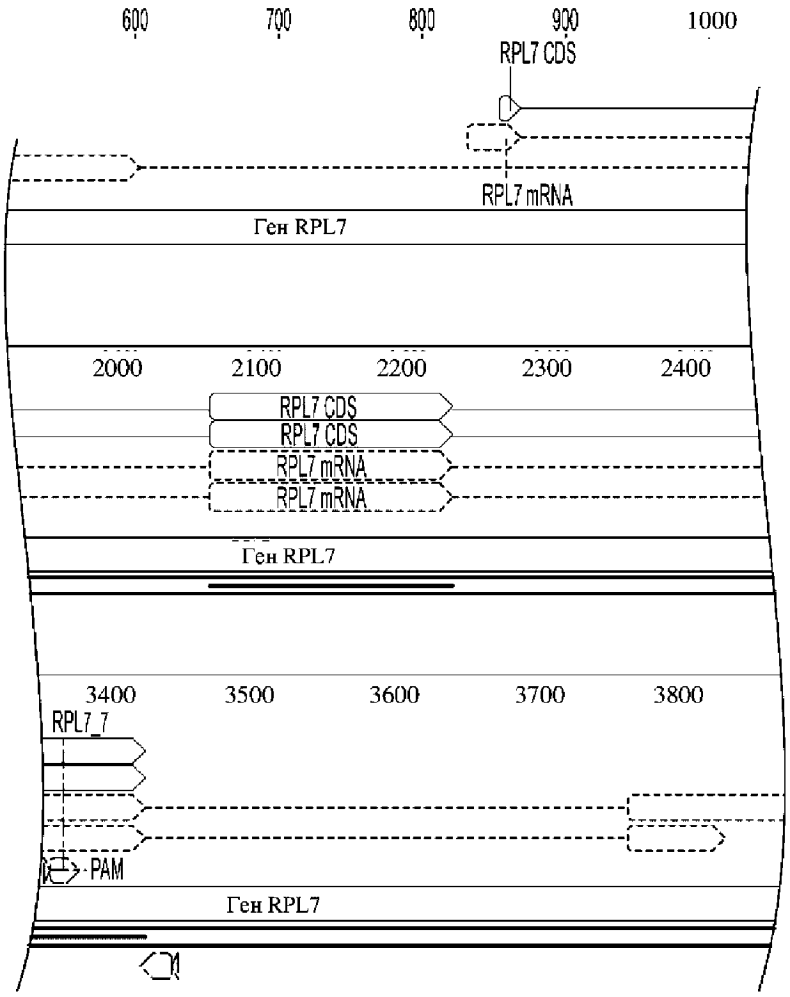
ФИГ. 10



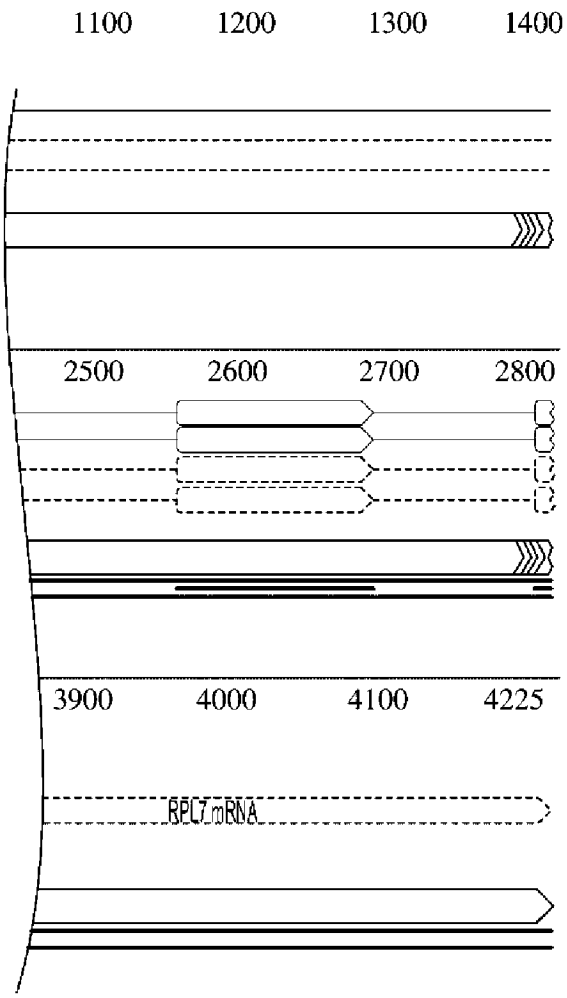
ФИГ. 10
ПРОДОЛЖЕНИЕ


2
100
200
300
400
500
RPL7 mRNA
RPL7
1500
1600
1700
1800
1900
RPL7
2900
3000
3100
3200
3300
RPL7 CDS
RPL7 CDS
RPL7 mRNA
PAM-
RPL7_1
RPL7

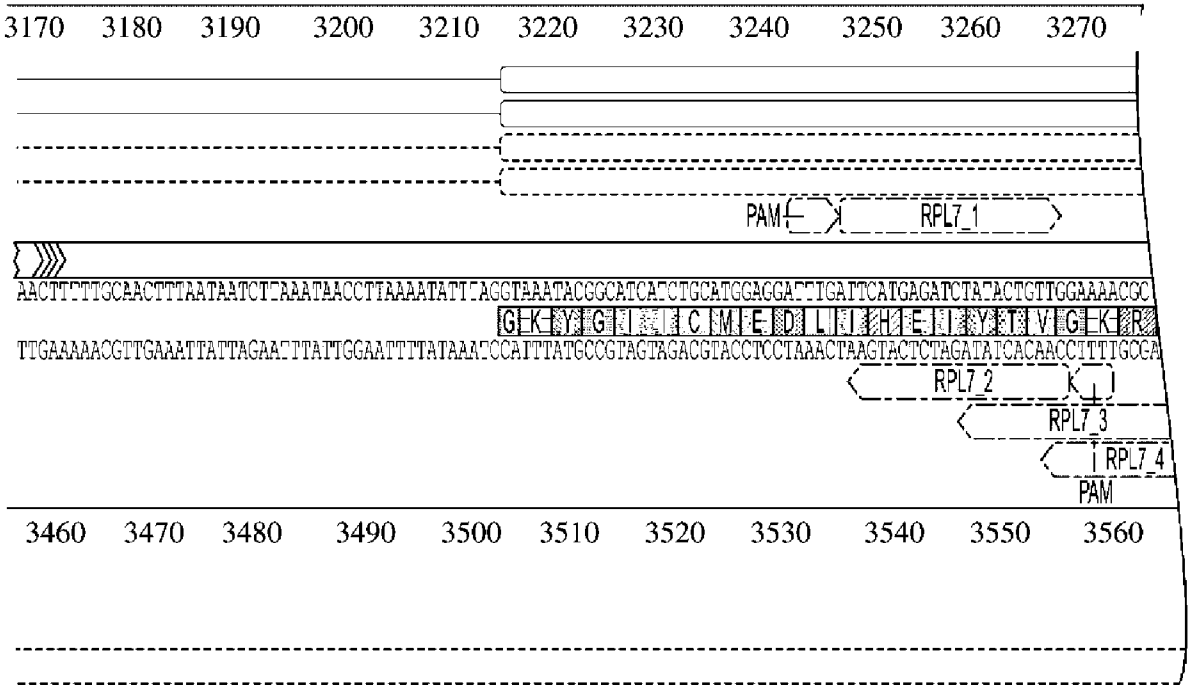
ФИГ. 11



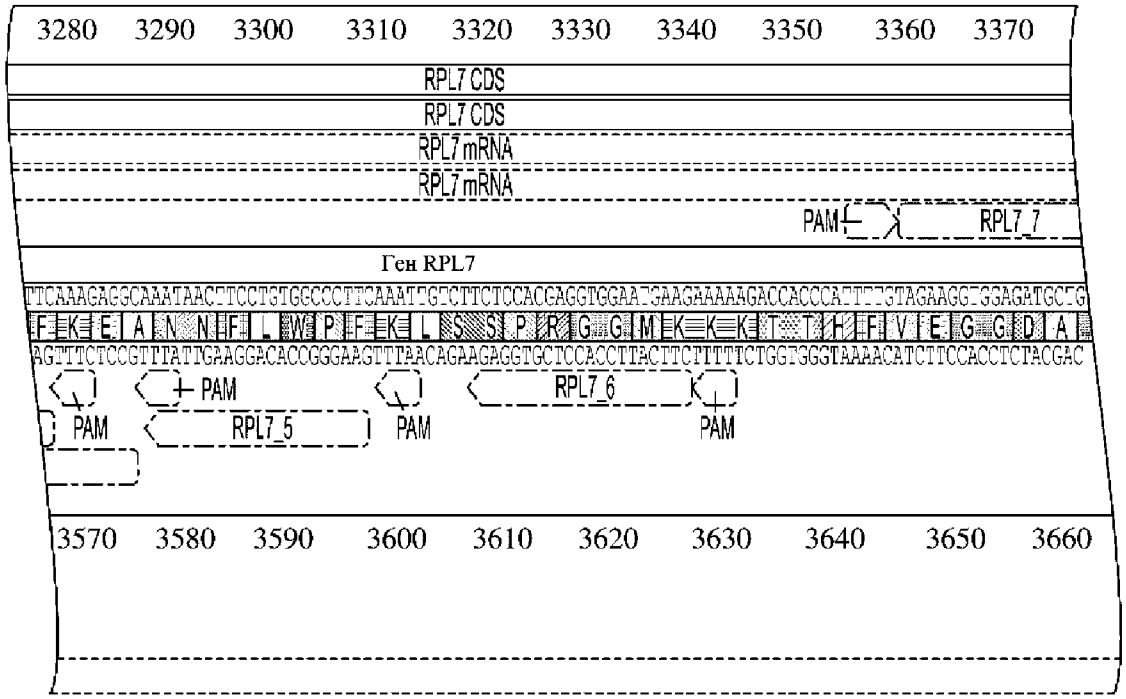
ФИГ. 11
ПРОДОЛЖЕНИЕ



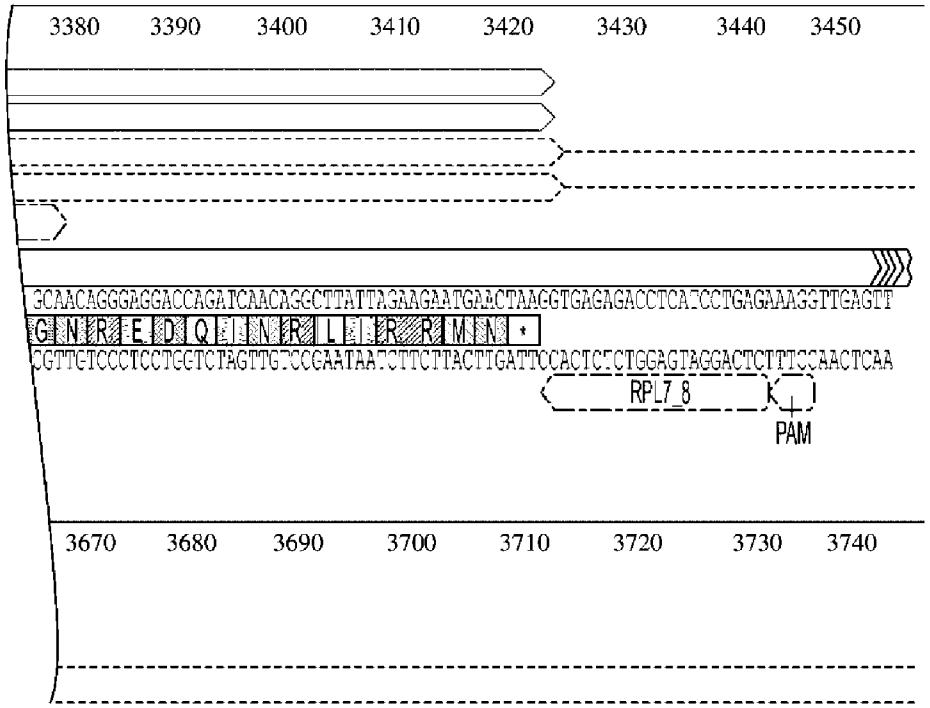
ФИГ. 11
ПРОДОЛЖЕНИЕ


3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
PAM
RPL7_1
RPL7_2
RPL7_3
RPL7_4
PAM
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560

ФИГ. 12



ФИГ. 12
ПРОДОЛЖЕНИЕ

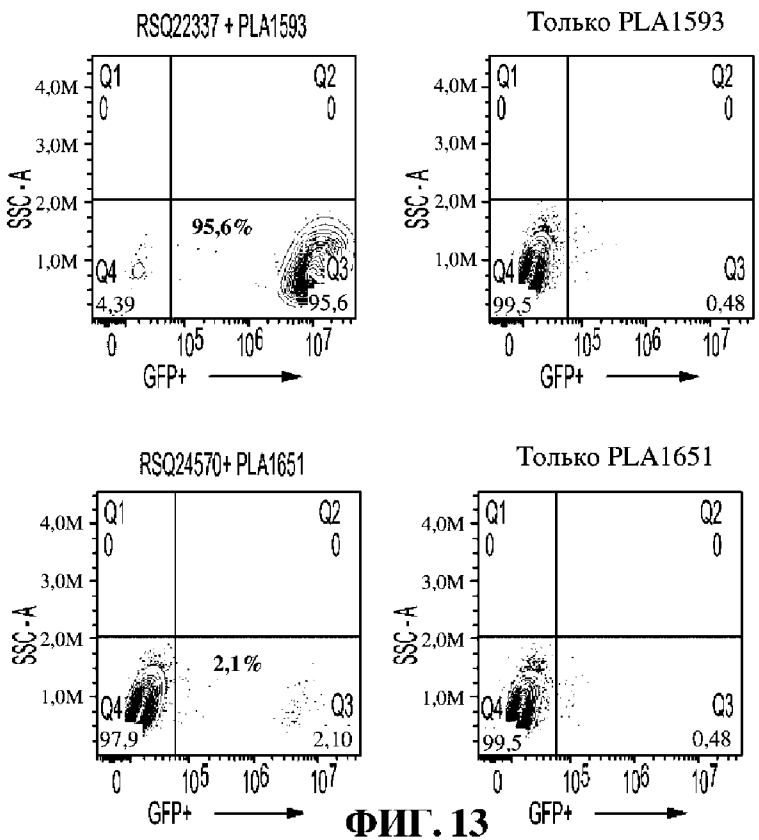


ФИГ. 12
ПРОДОЛЖЕНИЕ

A
Светлопольная
FITC (GFP)
Редактировани
е в экзоне
(RSQ22337)
RSQ22337+ PLA1593
Только
PLA1593
Светлопольная
FITC (GFP)
Редактирование в
интроне
(RSQ24570)
RSQ24570+ PLA1651
Только
PLA1651

ФИГ. 13

B



ФИГ. 13

ПРОДОЛЖЕНИЕ

Аллель 1 GAPDH

Аллель 2 GAPDH

TI или
Вставки/делеци
и или WT

ФИГ. 14A

Аллель 1
GAPDH

Аллель 2 GAPDH

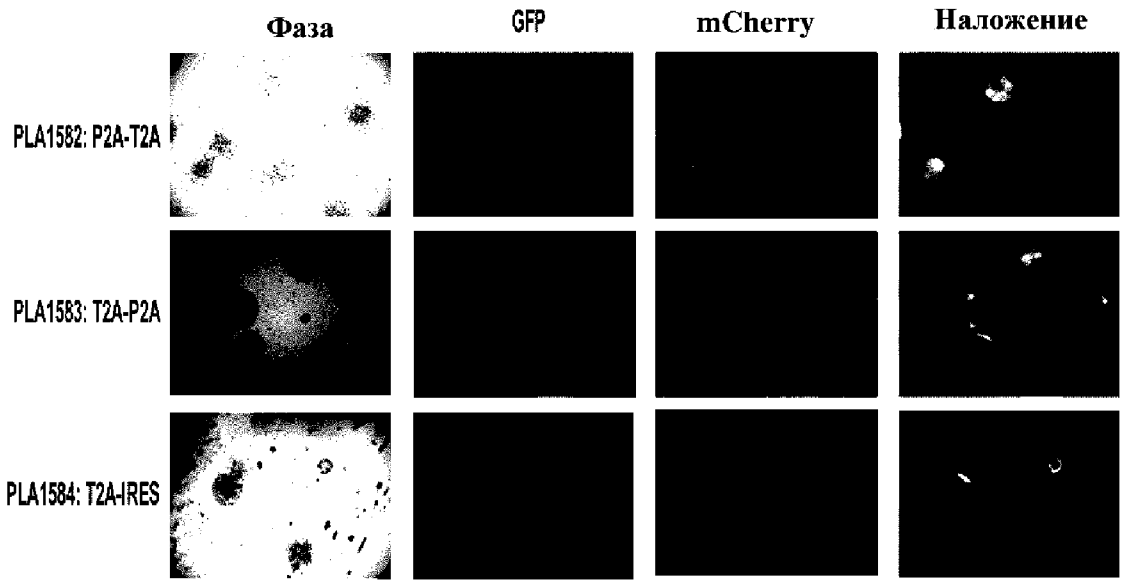
ФИГ. 14В

Линкеры:

P2A
T2A
IRES

PLA	Линкер 1	Линкер 2
PLA1575	P2A	P2A
PLA1582	P2A	T2A
PLA1574	P2A	IRES
PLA1583	T2A	P2A
PLA1573	T2A	T2A
PLA1584	T2A	IRES

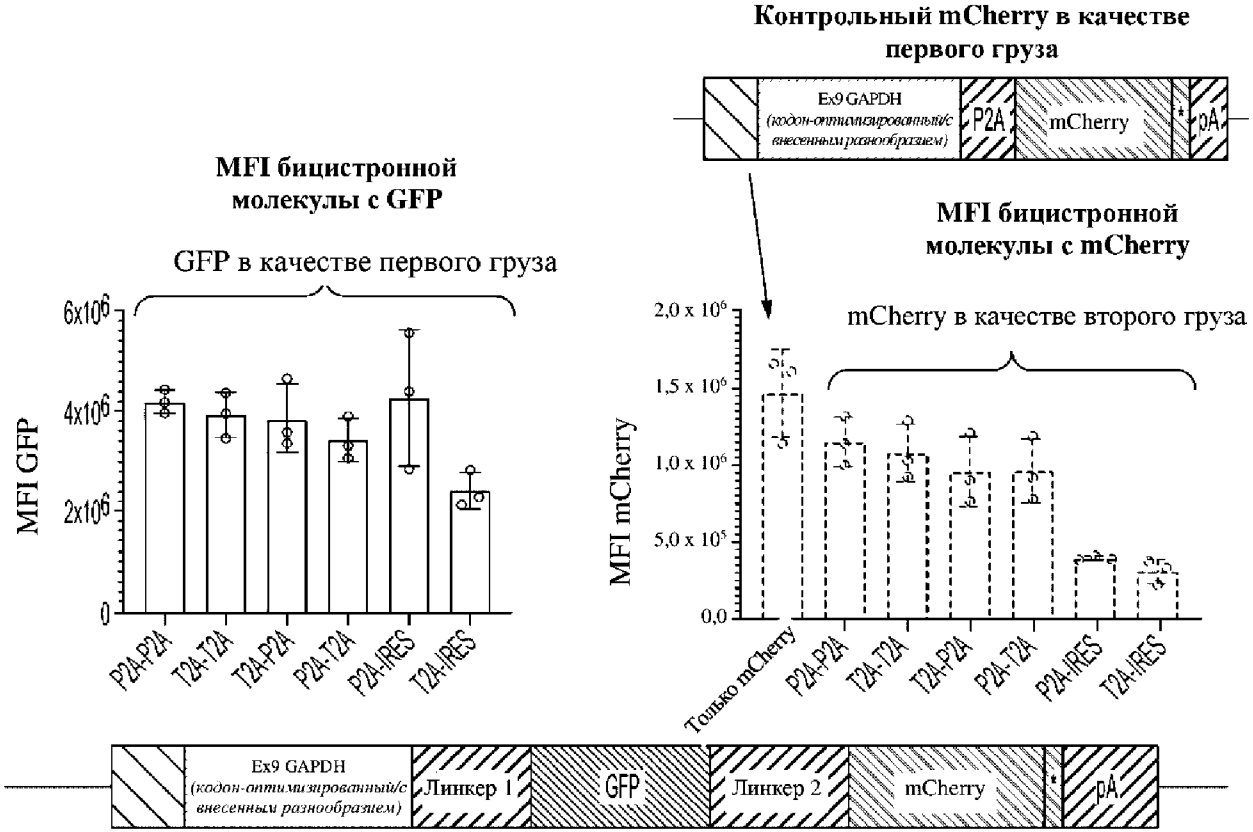
ФИГ. 15A



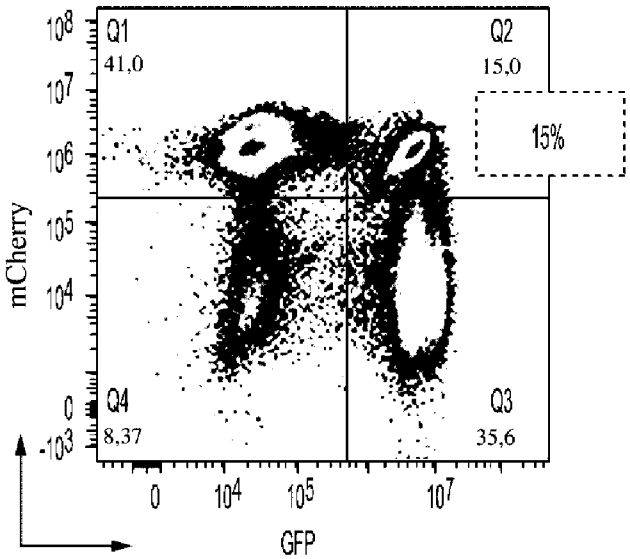
День 9 после нуклеофекции

Все изображения при 2x: 100 мкм
Изображения получены на микроскопе Keyence

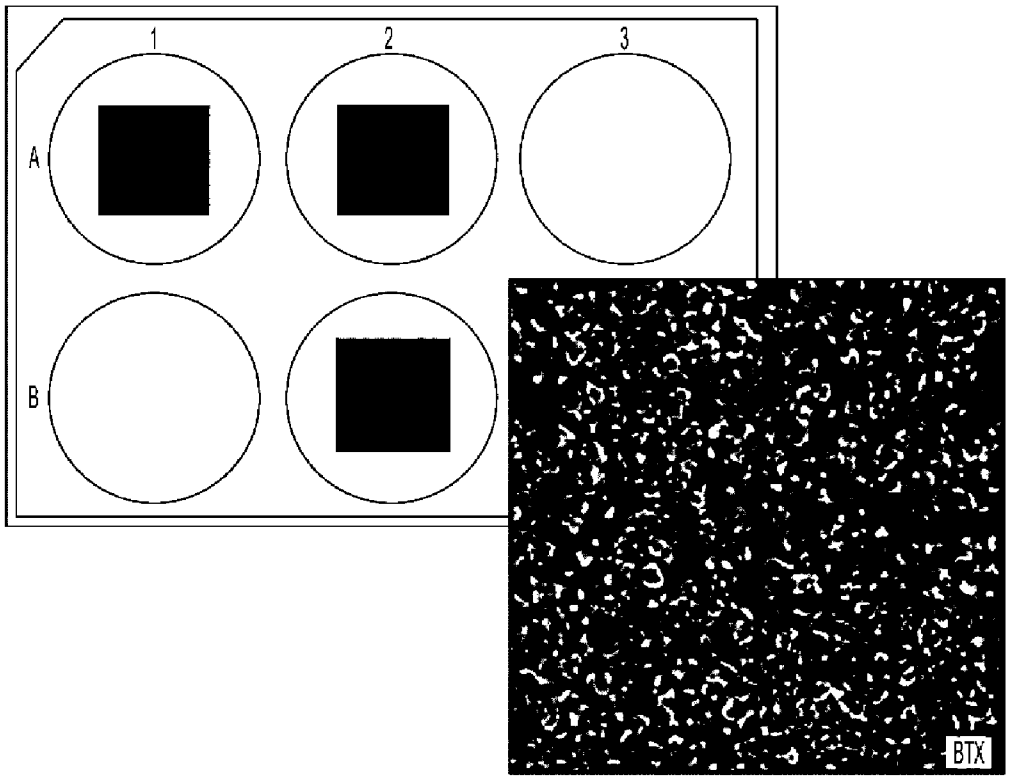
ФИГ. 15B


Контрольный mCherry в качестве первого груза
Ex9 GAPDH (кодон-оптимизированный/с внесенным разнообразием)
P2A
mCherry
pA
MFI бицистронной молекулы с GFP
GFP в качестве первого груза
MFI GFP
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
P2A-P2A
T2A-T2A
T2A-P2A
P2A-T2A
P2A-IRES
T2A-IRES
MFI бицистронной молекулы с mCherry
mCherry в качестве второго груза
MFI mCherry
2,0 x 10^6
1,5 x 10^6
1,0 x 10^6
5,0 x 10^5
0,0
Только mCherry
P2A-P2A
T2A-T2A
T2A-P2A
P2A-T2A
P2A-IRES
T2A-IRES
Ex9 GAPDH (кодон-оптимизированный/с внесенным разнообразием)
Линкер 1
GFP
Линкер 2
mCherry
pA

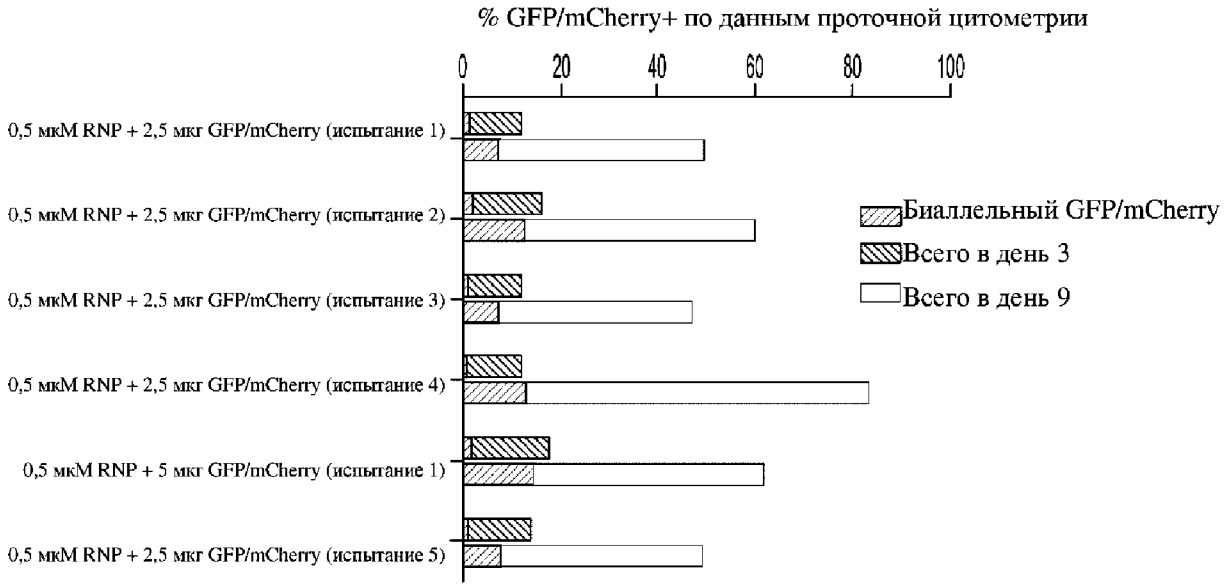
ФИГ. 15С


Q1
41,0
Q2
15,0
15%
Q4
8,37
Q3
35,6
mCherry
GFP
0
10^4
10^5
10^7
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
0
-10^3

ФИГ. 16A



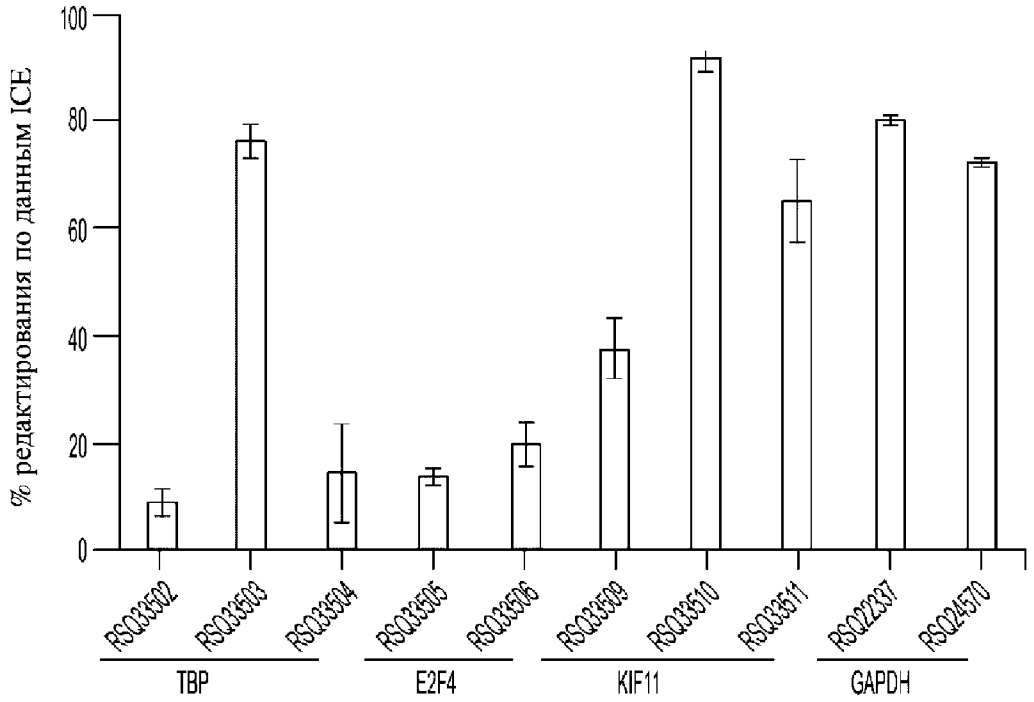
ФИГ. 16B


% GFP/mCherry+ по данным проточной цитометрии
0
20
40
60
80
100
0,5 мкМ RNP + 2,5 мкг GFP/mCherry (испытание 1)
0,5 мкМ RNP + 2,5 мкг GFP/mCherry (испытание 2)
0,5 мкМ RNP + 2,5 мкг GFP/mCherry (испытание 3)
0,5 мкМ RNP + 2,5 мкг GFP/mCherry (испытание 4)
0,5 мкМ RNP + 5 мкг GFP/mCherry (испытание 1)
0,5 мкМ RNP + 2,5 мкг GFP/mCherry (испытание 5)
Биаллельный GFP/mCherry
Всего в день 3
Всего в день 9

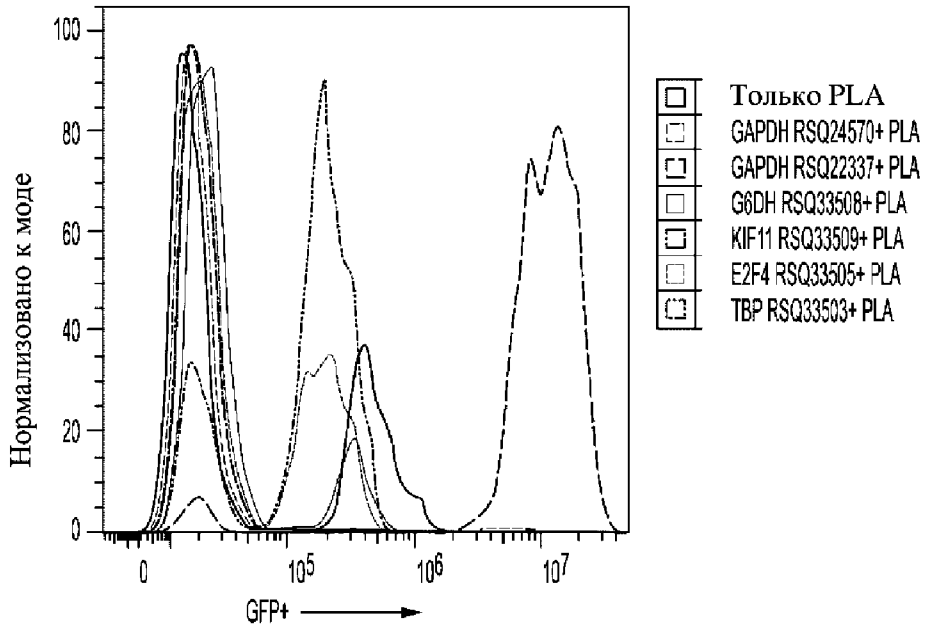
ФИГ. 16С

% GFP+ по данным проточной цитометрии
100
80
60
40
20
0
RSQ33502
RSQ33503
RSQ33504
RSQ33505
RSQ33506
RSQ33507
RSQ33508
RSQ33509
RSQ33510
RSQ33511
RSQ22337
RSQ24570
TBP
E2F4
G6PD
KIF11
GAPDH

ФИГ. 17A

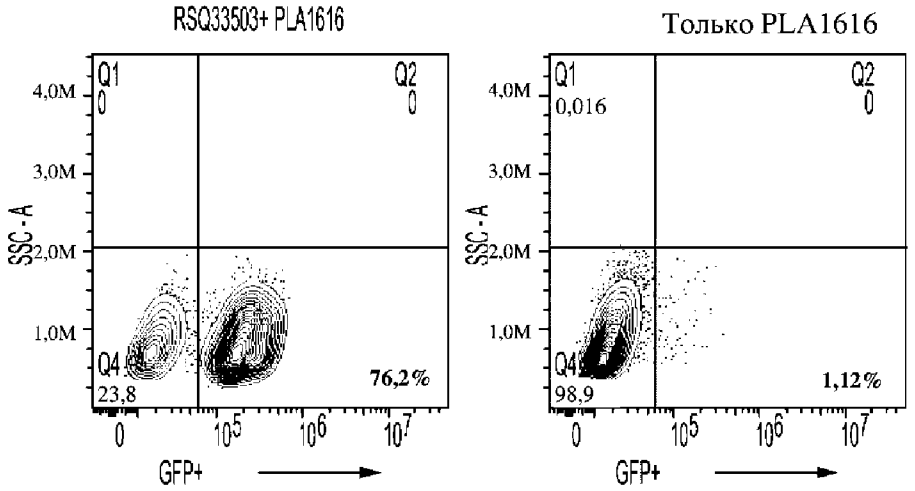

% редактирования по данным ICE
100
80
60
40
20
0
RSQ33502
RSQ33503
RSQ33504
RSQ33505
RSQ33506
RSQ33509
RSQ33510
RSQ33511
RSQ22337
RSQ24570
TBP
E2F4
KIF11
GAPDH

ФИГ. 17B


Нормализовано к моде
100
80
60
40
20
0
0
10^5
10^6
10^7
GFP+
Только PLA
GAPDH RSQ24570+ PLA
GAPDH RSQ22337+ PLA
G6DH RSQ33508+ PLA
KIF11 RSQ33509+ PLA
E2F4 RSQ33505+ PLA
TBP RSQ33503+ PLA

ФИГ. 17C

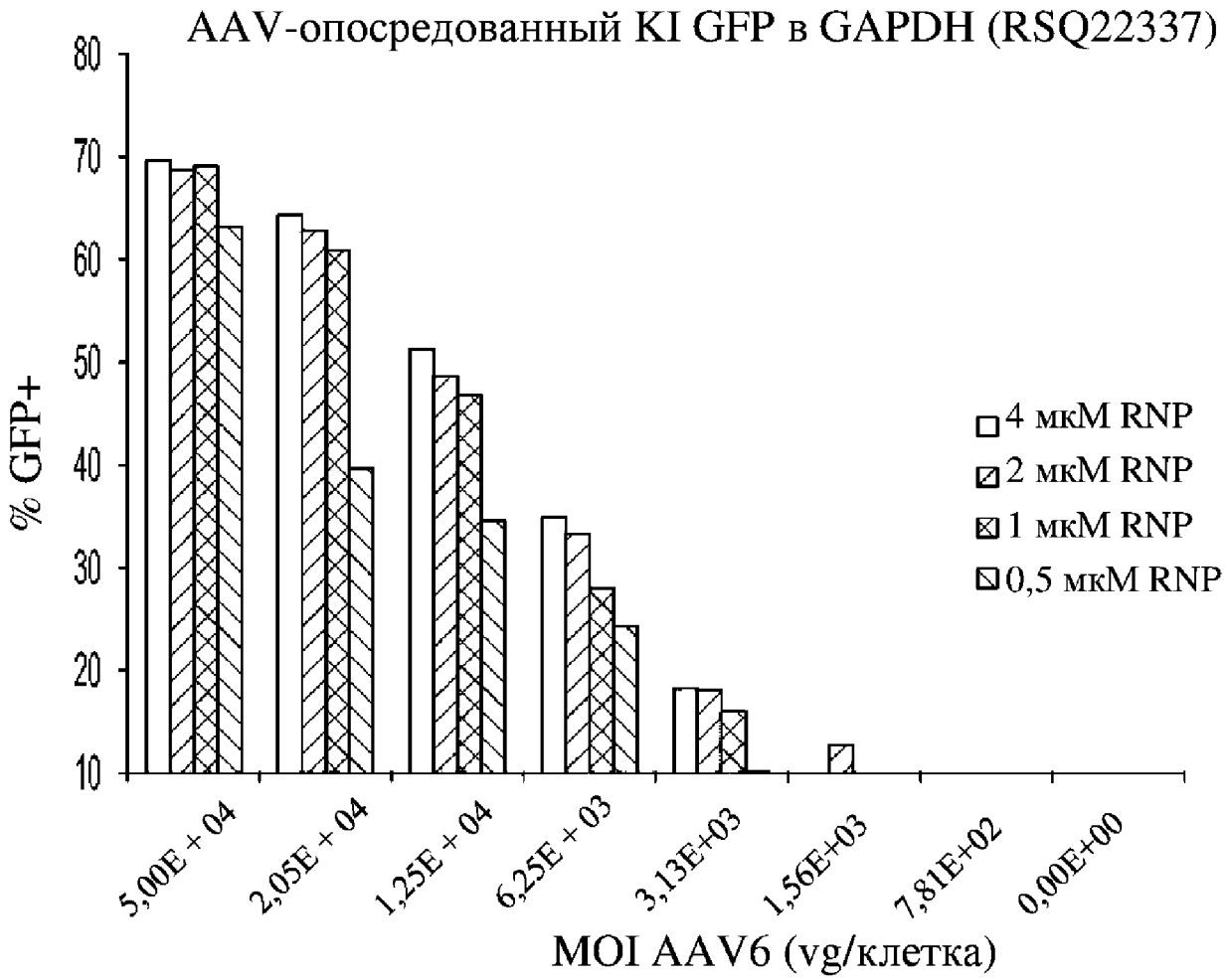
График проточной цитометрии для KO/KI TBP с использованием плазмиды с GFP



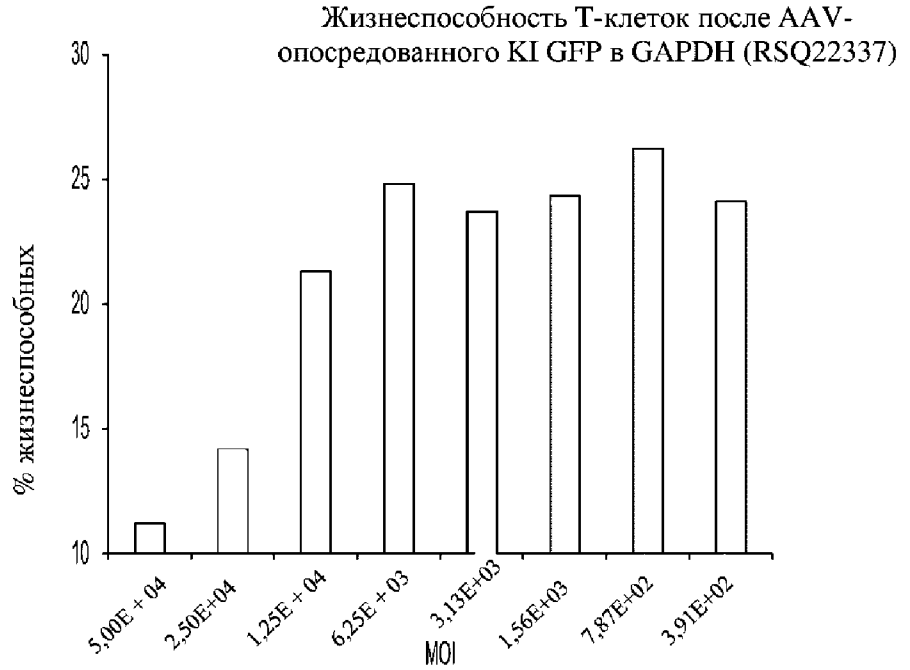
ФИГ. 18

% нокина в аллелях (ddPCR)
80
60
40
20
0
GAPDH
TBP
RSQ22337 + PLA1593
RSQ33503 + PLA1616
Только PLA1593
Только PLA1616

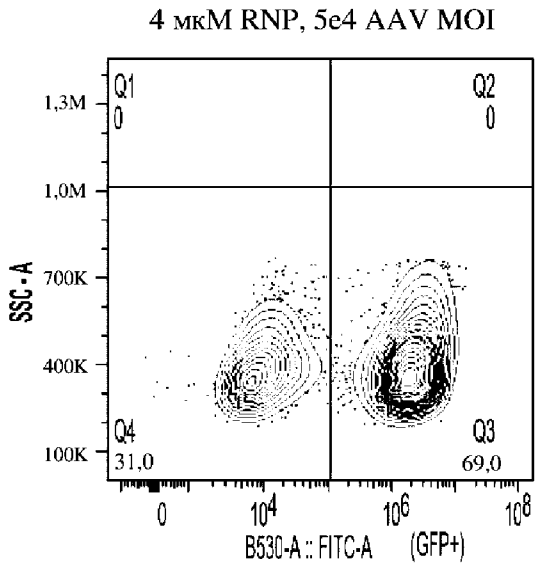
ФИГ. 19


AAV-опосредованный KI GFP в GAPDH (RSQ22337)
% GFP+
80
70
60
50
40
30
20
10
4 мкМ RNP
2 мкМ RNP
1 мкМ RNP
0,5 мкМ RNP
5,00E+04
2,05E+04
1,25E+04
6,25E+03
3,13E+03
1,56E+03
7,81E+02
0,00E+00
MOI AAV6 (vg/клетка)

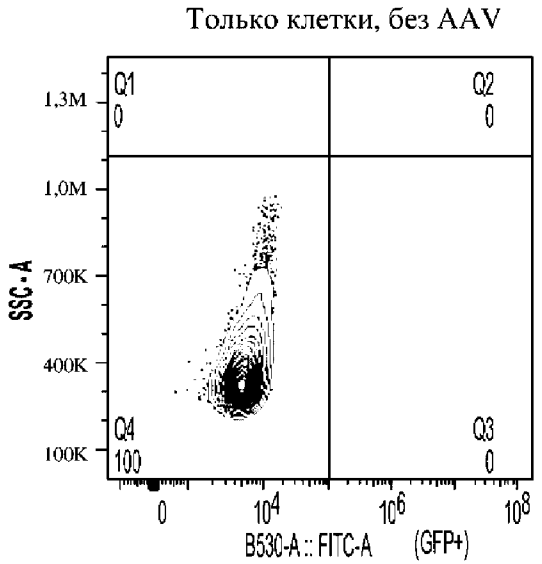
ФИГ. 20


Жизнеспособность Т-клеток после AAV-опосредованного KI GFP в GAPDH (RSQ22337)
% жизнеспособных
30
25
20
15
10
5,00E+04
2,50E+04
1,25E+04
6,25E+03
3,13E+03
1,56E+03
7,87E+02
3,91E+02
MOI

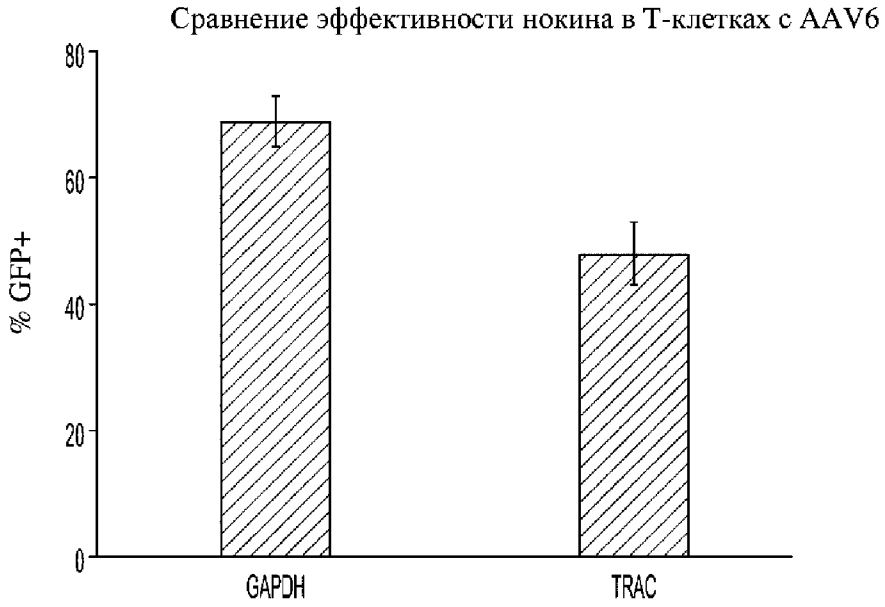
ФИГ. 21


4 мкМ RNP, 5e4 AAV MOI
Q1
0
Q2
0
Q4
31,0
Q3
69,0
1,3M
1,0M
700K
400K
100K
SSC-A
0
10^4
10^6
10^8
B530-A :: FITC-A (GFP+)

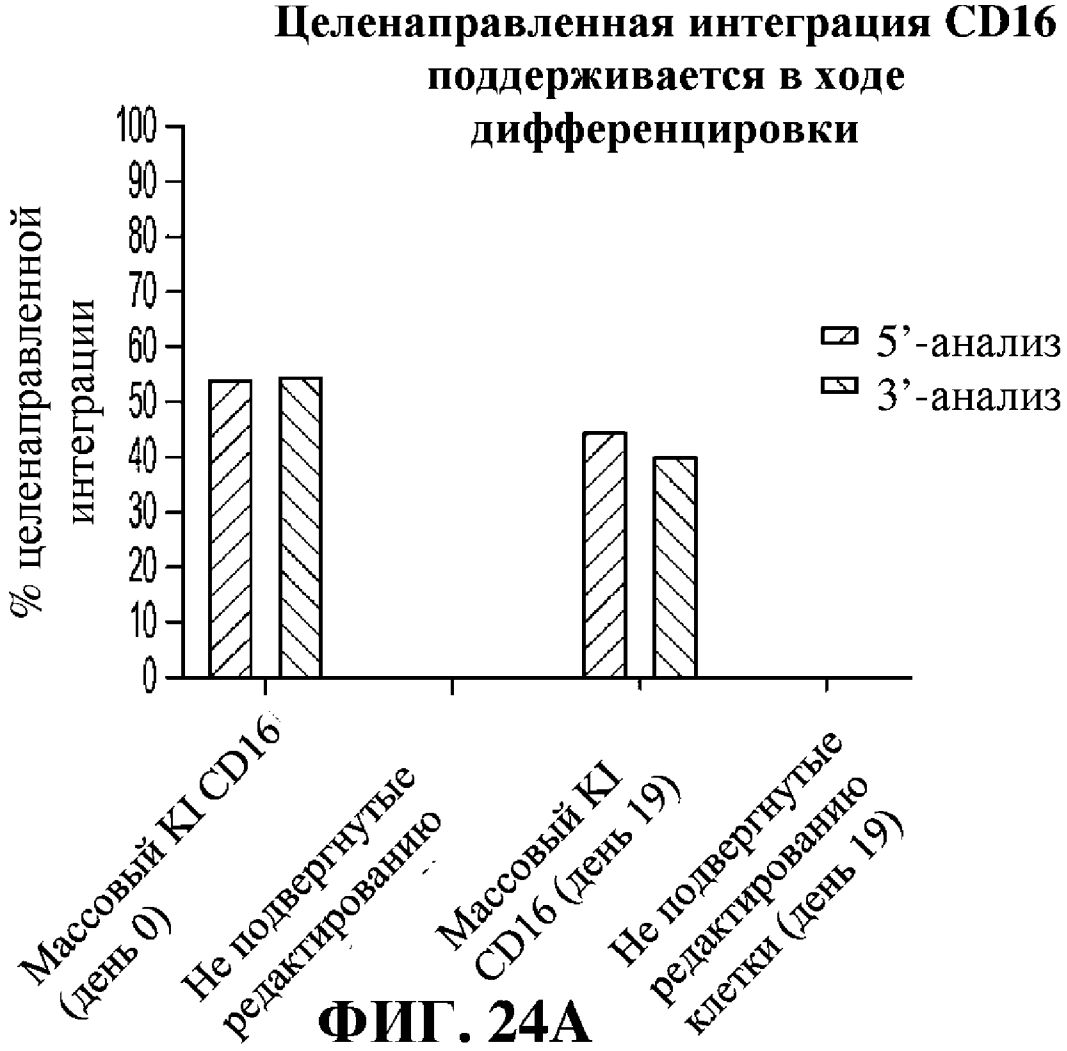
ФИГ. 22А


Только клетки, без AAV
Q1
0
Q2
0
Q4
100
Q3
0
1,3M
1,0M
700K
400K
100K
SSC-A
0
10^4
10^6
10^8
B530-A :: FITC-A (GFP+)

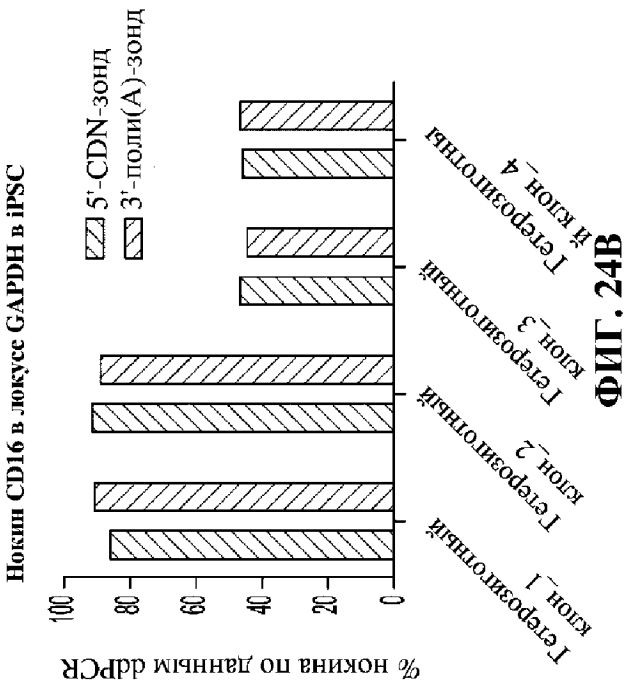
ФИГ. 22B


Сравнение эффективности нокина в Т-клетках с AAV6
% GFP+
80
60
40
20
0
GAPDH
TRAC

ФИГ. 23

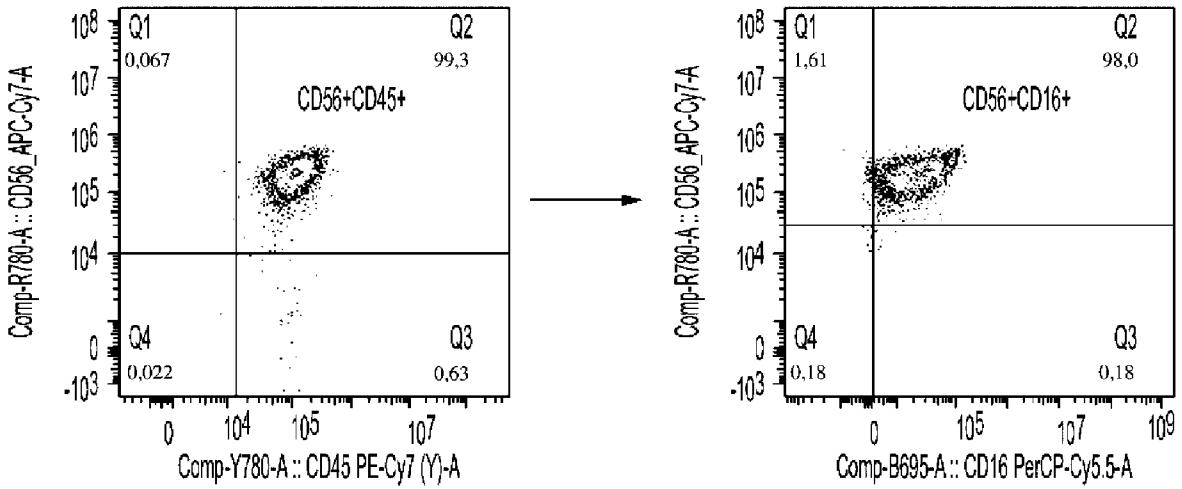

Целенаправленная интеграция CD16 поддерживается в ходе дифференцировки
% целенаправленной интеграции
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5'-анализ
3'-анализ
Массовый KI CD16 (день 0)
Не подвергнутые редактированию
Массовый KI CD16 (день 19)
Не подвергнутые редактированию клетки (день 19)

ФИГ. 24А

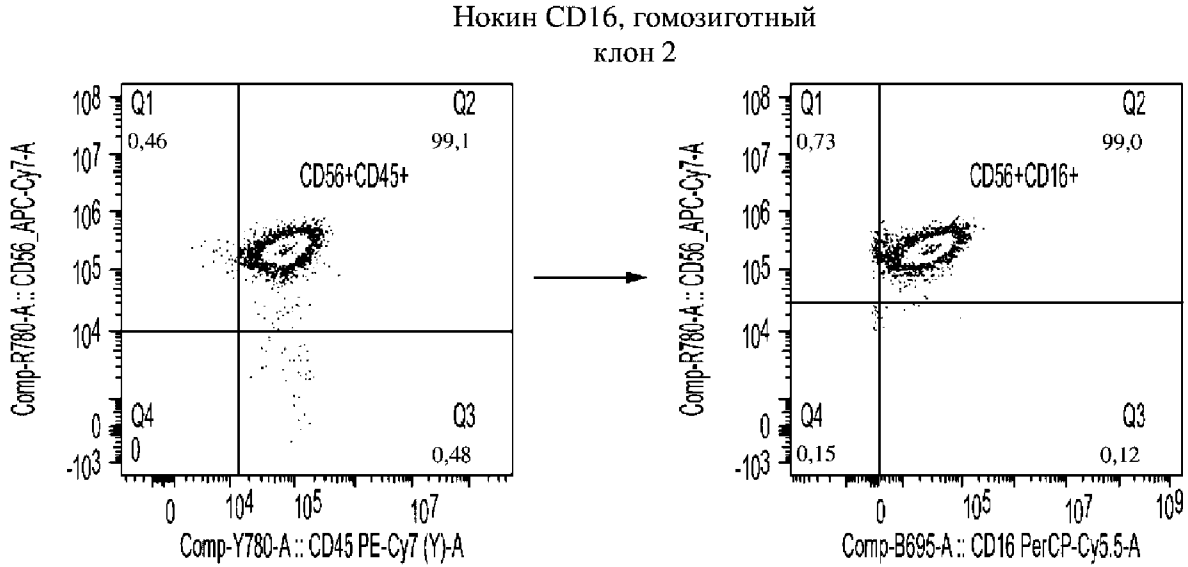

Нокин CD16 в локусе GAPDH в iPSC
5'-CDN-зонд
3'-поли(A)-зонд
% нокина по данным ddPCR
100
80
60
40
20
0
Гетерозиготный клон_1
Гетерозиготный клон_2
Гетерозиготный клон_3
Гетерозиготный клон_4

ФИГ. 24B

Нокин CD16, гомозиготный клон 1

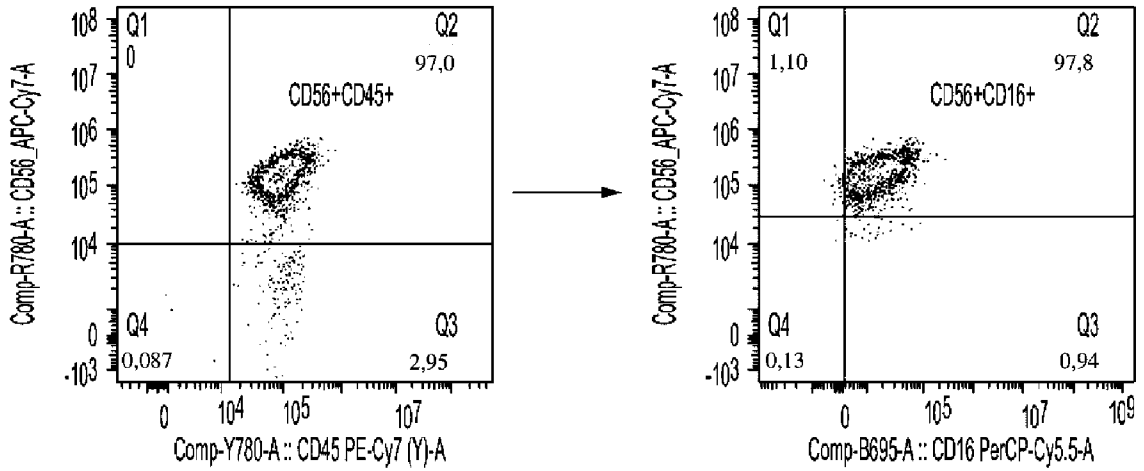


ФИГ. 25А

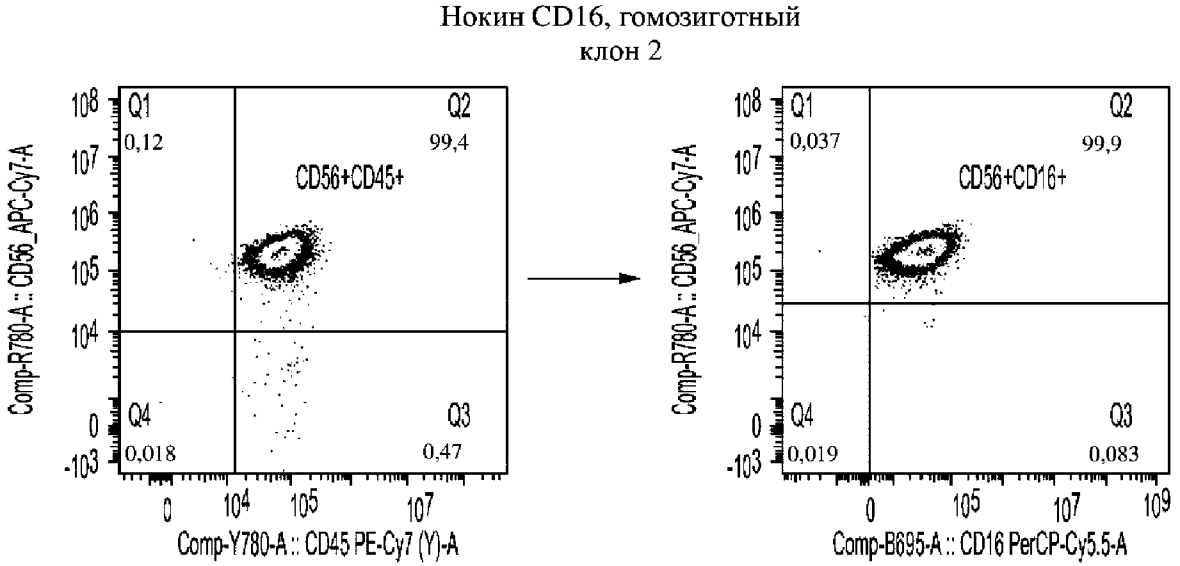

Нокин CD16, гомозиготный
клон 2
Q1
0,46
Q2
99,1
CD56+CD45+
Q4
0
Q3
0,48
Comp-R780-A :: CD56_APC-Cy7-A
Comp-Y780-A :: CD45 PE-Cy7 (Y)-A
Q1
0,73
Q2
99,0
CD56+CD16+
Q4
0,15
Q3
0,12
Comp-R780-A :: CD56_APC-Cy7-A
Comp-B695-A :: CD16 PerCP-Cy5.5-A

ФИГ. 25B

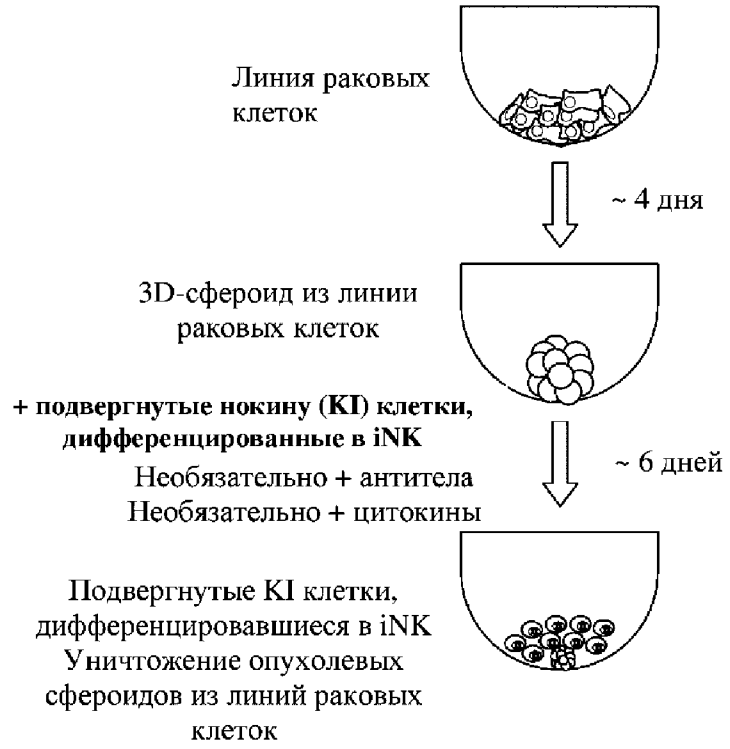
Нокин CD16, гомозиготный клон 1



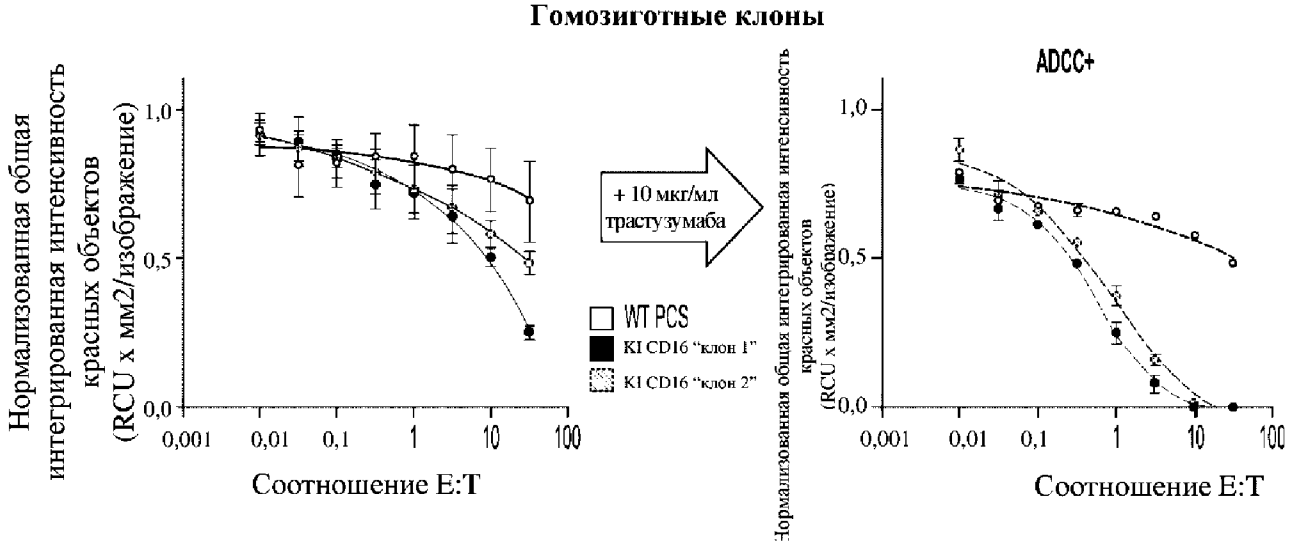
ФИГ. 25C


Нокин CD16, гомозиготный
клон 2
Q1
0,12
Q2
99,4
CD56+CD45+
Q4
0,018
Q3
0,47
Comp-R780-A :: CD56_APC-Cy7-A
Comp-Y780-A :: CD45 PE-Cy7 (Y)-A
Q1
0,037
Q2
99,9
CD56+CD16+
Q4
0,019
Q3
0,083
Comp-R780-A :: CD56_APC-Cy7-A
Comp-B695-A :: CD16 PerCP-Cy5.5-A

ФИГ. 25D


Линия раковых клеток
~ 4 дня
3D-сфероид из линии раковых клеток
+ подвергнутые нокину (KI) клетки, дифференцированные в iNK
Необязательно + антитела
Необязательно + цитокины
~ 6 дней
Подвергнутые KI клетки, дифференцировавшиеся в iNK
Уничтожение опухолевых сфероидов из линий раковых клеток

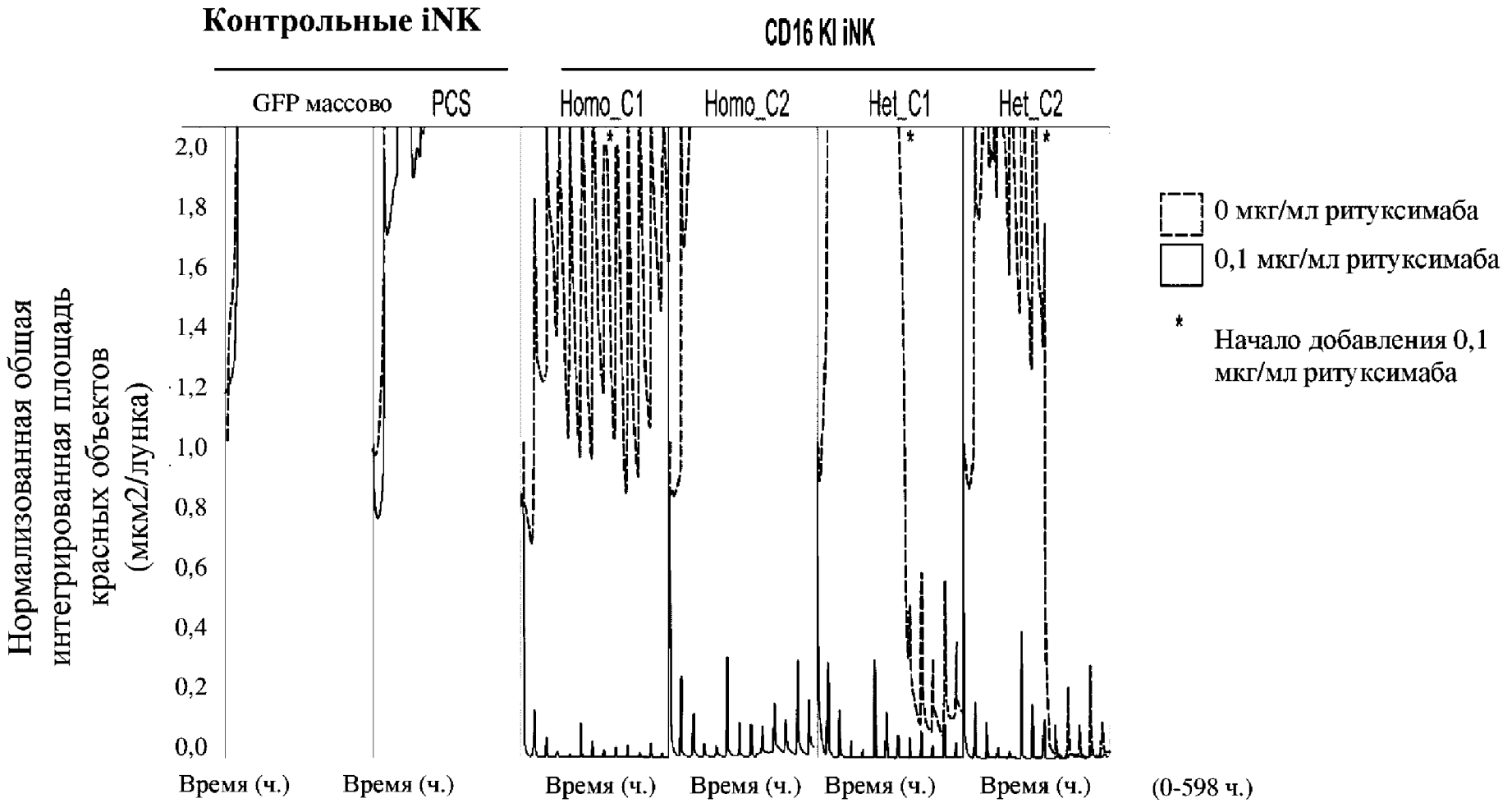
ФИГ. 26


Гомозиготные клоны
Нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов (RCU x мм2/изображение)
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Соотношение E:T
+ 10 мкг/мл трастузумаба
WT PCS
KI CD16 "клон 1"
KI CD16 "клон 2"
ADCC+
Нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов (RCU x мм2/изображение)
Соотношение E:T

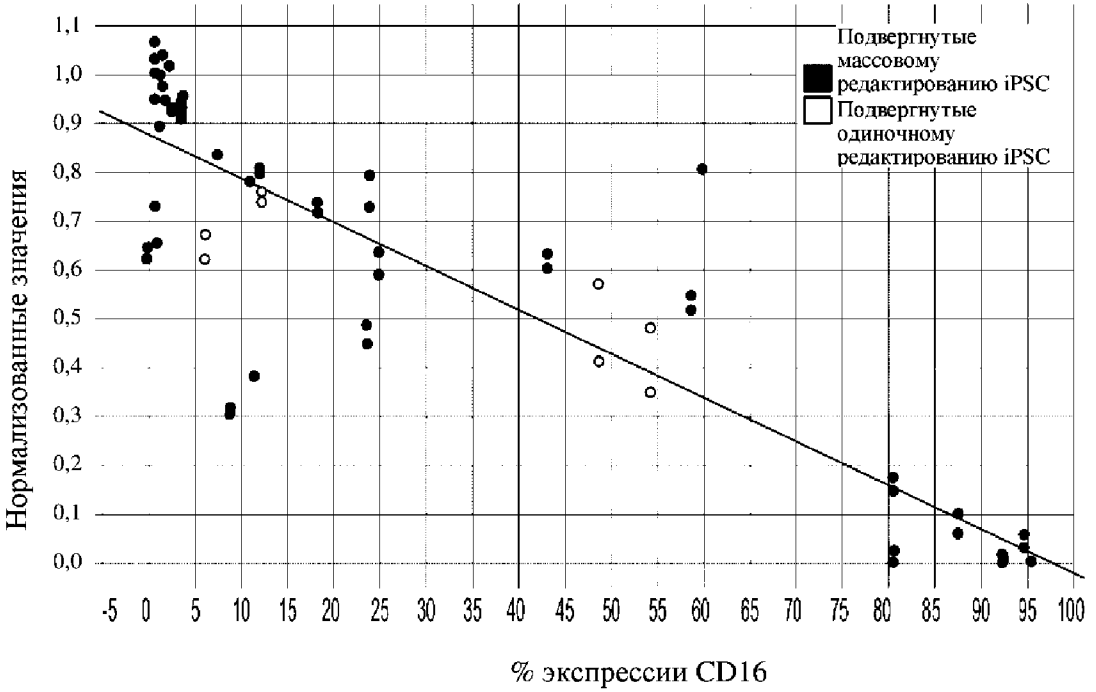
ФИГ. 27A

Гомозиготные клоны
Нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов (RCU x мм2/изображение)
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Соотношение E:T
+ 10 мкг/мл трастузумаба
WT PCS
KI CD16 "клон 1"
KI CD16 "клон 2"
ADCC+
Нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов (RCU x мм2/изображение)
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Соотношение E:T

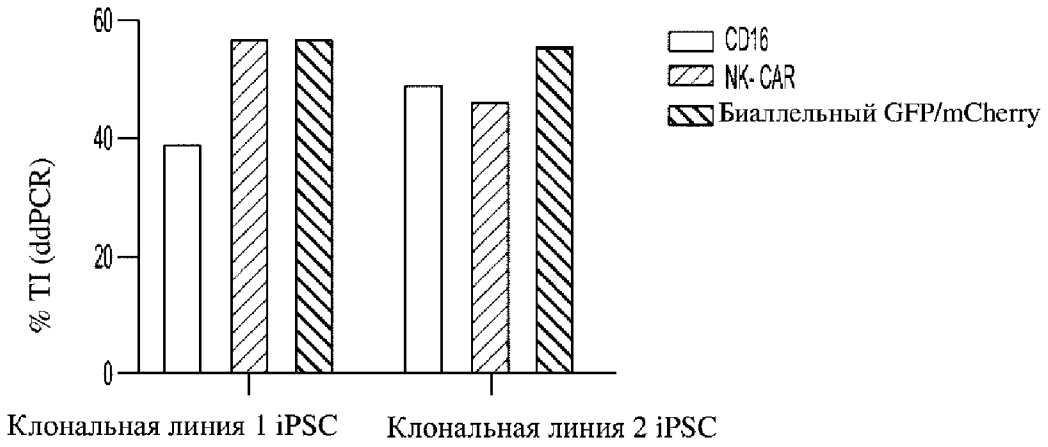
ФИГ. 27B


Контрольные iNK
CD16 KI iNK
GFP массово
PCS
Homo_C1
Homo_C2
Het_C1
Het_C2
Нормализованная общая интегрированная площадь красных объектов (мкм2/лунка)
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Время (ч.)
Время (ч.)
Время (ч.)
Время (ч.)
Время (ч.)
Время (ч.)
(0-598 ч.)
0 мкг/мл ритуксимаба
0,1 мкг/мл ритуксимаба
* Начало добавления 0,1 мкг/мл ритуксимаба

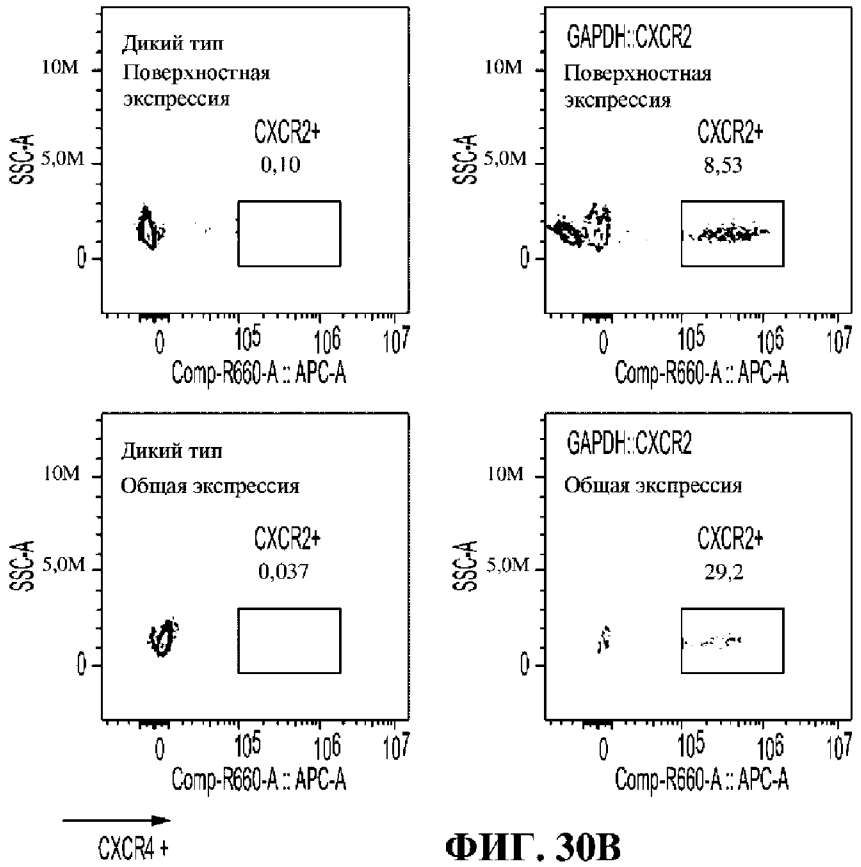
ФИГ. 28


Нормализованные значения
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
-5 0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
% экспрессии CD16
Подвергнутые массовому редактированию iPSC
Подвергнутые одиночному редактированию iPSC

ФИГ. 29


60
40
20
0
% TI (ddPCR)
CD16
NK-CAR
Биаллельный GFP/mCherry
Клональная линия 1 iPSC
Клональная линия 2 iPSC

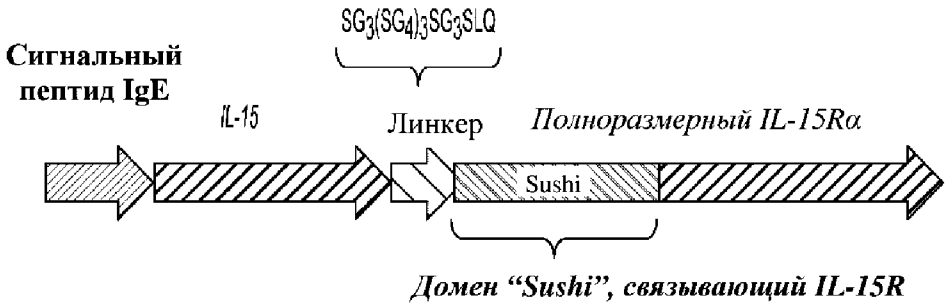
ФИГ. 30A


Дикий тип
Поверхностная экспрессия
CXCR2+
0,10
GAPDH::CXCR2
Поверхностная экспрессия
CXCR2+
8,53
Дикий тип
Общая экспрессия
CXCR2+
0,037
GAPDH::CXCR2
Общая экспрессия
CXCR2+
29,2
SSC-A
10M
5,0M
0
0
10^5
10^6
10^7
Comp-R660-A :: APC-A
CXCR4 +

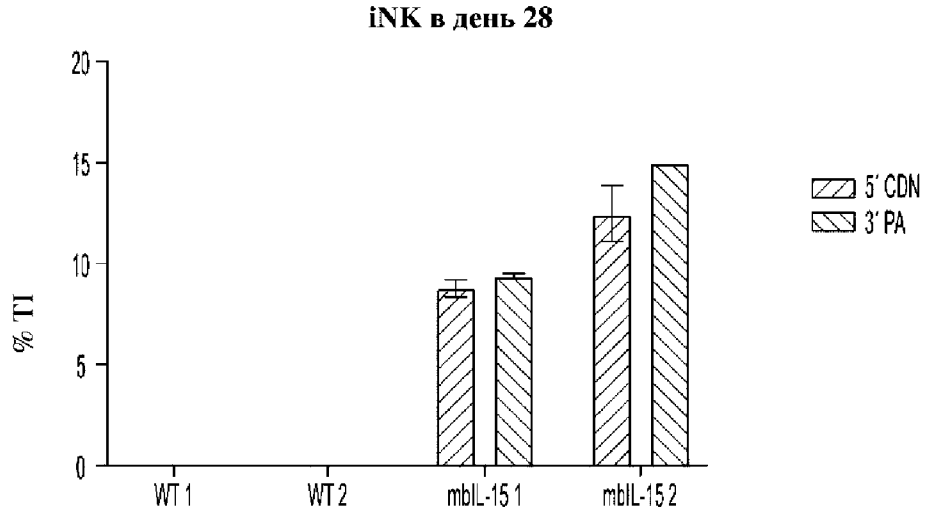
ФИГ. 30B

Процентное значение TI, измеренное с помощью ddPCR
0
20
40
60
80
CD16::P2A::CAR
CD16::IRES::CAR
CAR::P2A::CD16
CAR::IRES::CD16
mbIL-15

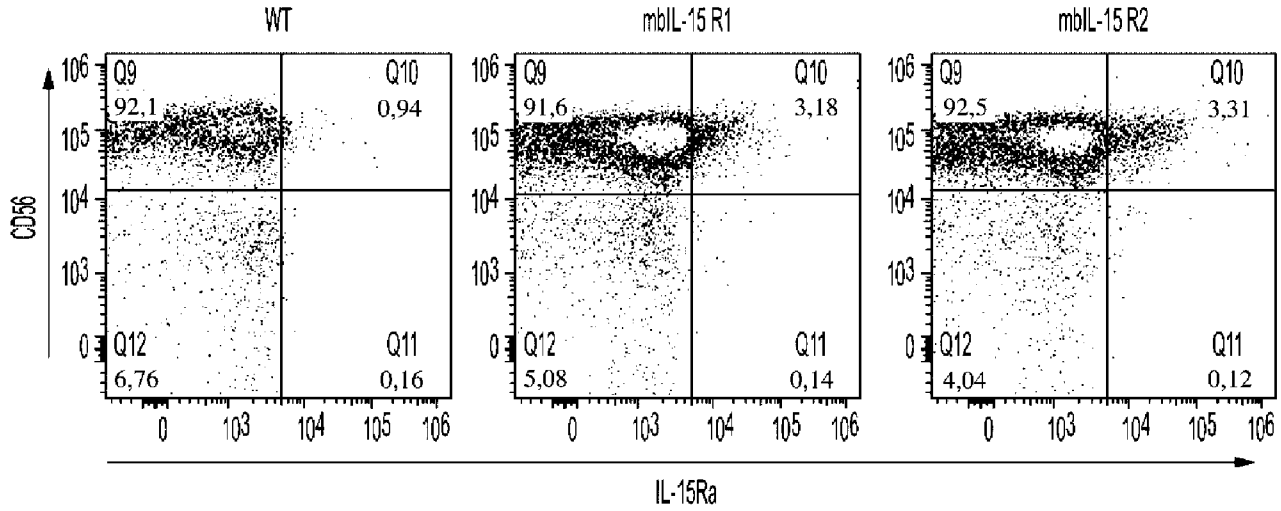
ФИГ. 31


Сигнальный пептид IgE
IL-15
SG3(SG4)3SG3SLQ
Линкер
Полноразмерный IL-15Rα
Sushi
Домен "Sushi", связывающий IL-15R

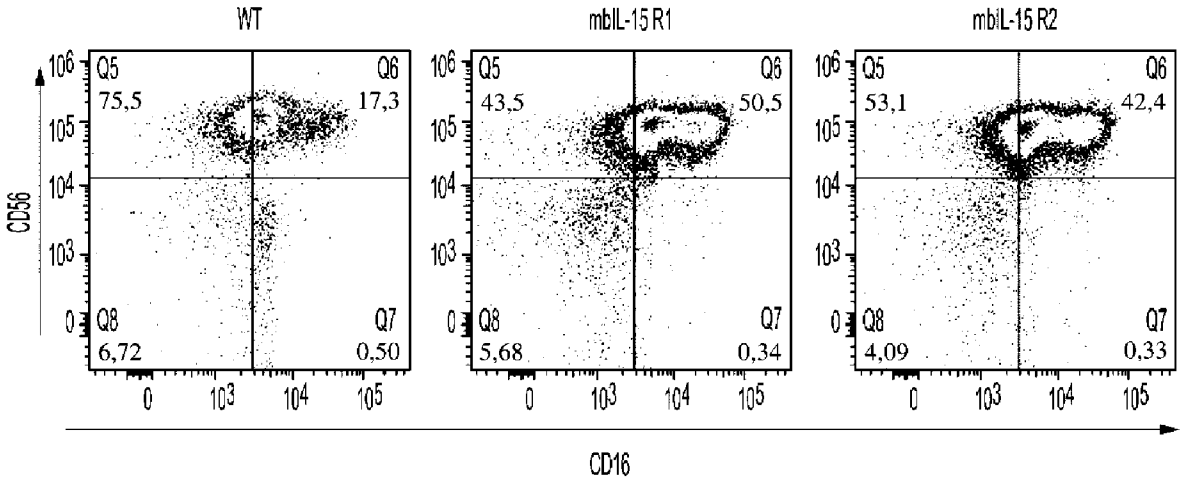
ФИГ. 32



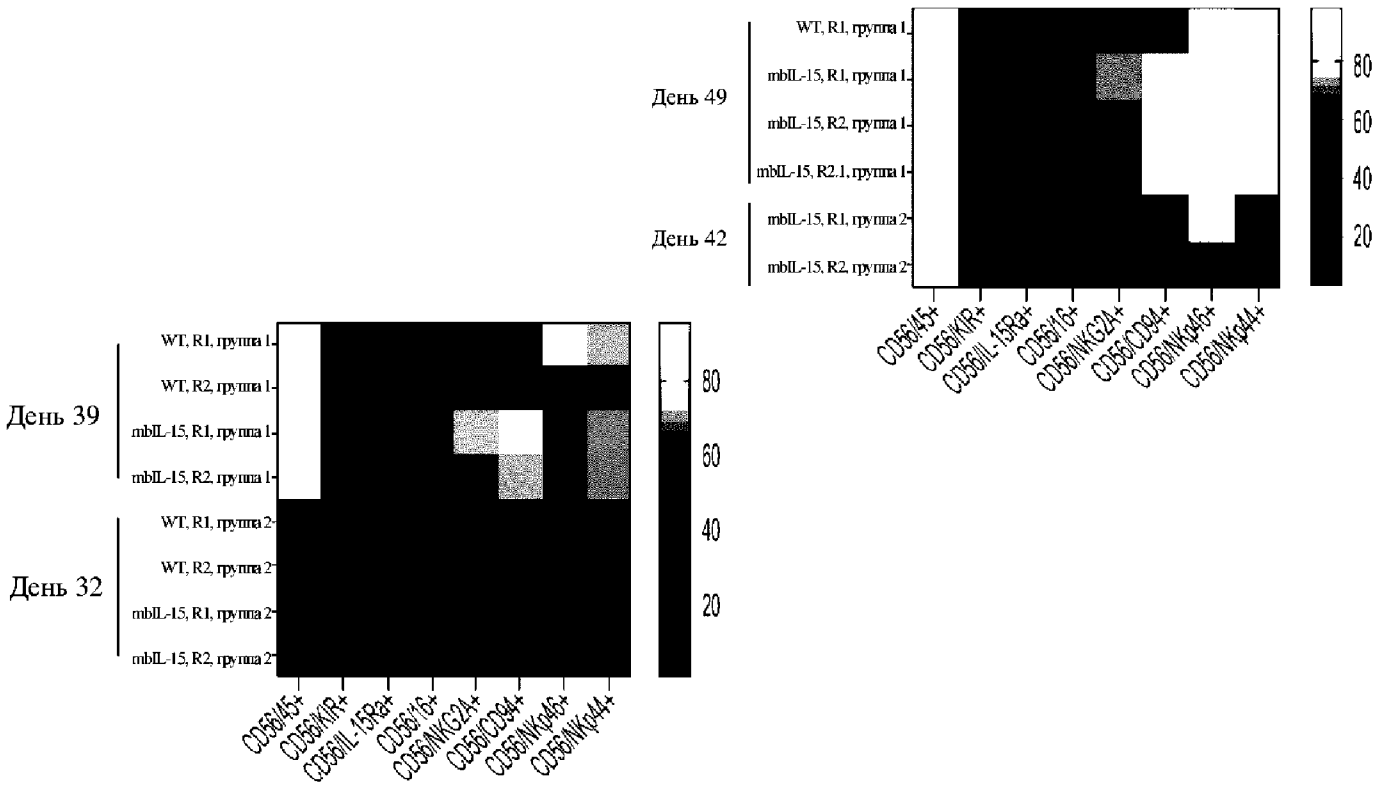
ФИГ. 33


WT
mbIL-15 R1
mbIL-15 R2
CD56
IL-15Ra
Q9
92,1
Q10
0,94
Q12
6,76
Q11
0,16
Q9
91,6
Q10
3,18
Q12
5,08
Q11
0,14
Q9
92,5
Q10
3,31
Q12
4,04
Q11
0,12
0
10³
10⁴
10⁵
10⁶

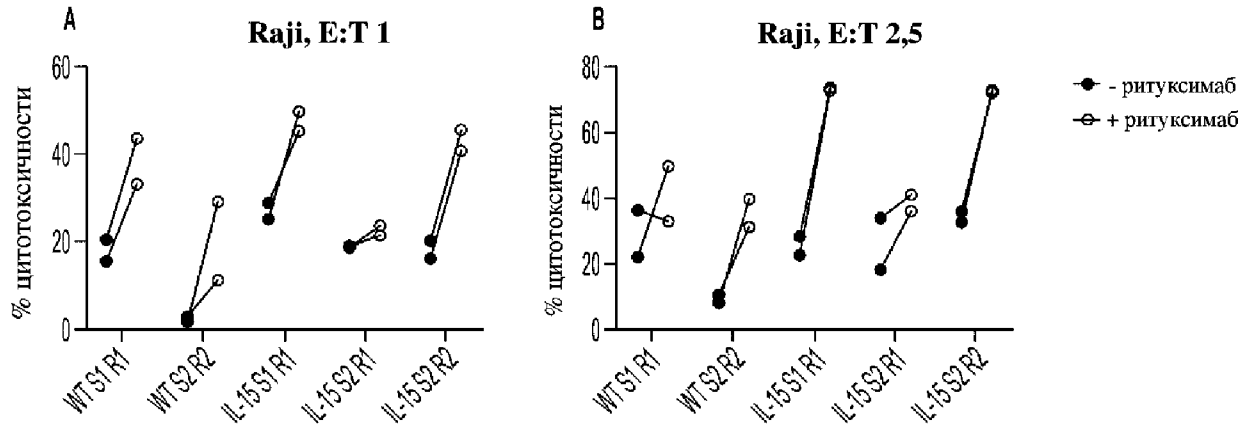
ФИГ. 34А


WT
mbIL-15 R1
mbIL-15 R2
CD56
CD16
Q5
75,5
Q6
17,3
Q8
6,72
Q7
0,50
Q5
43,5
Q6
50,5
Q8
5,68
Q7
0,34
Q5
53,1
Q6
42,4
Q8
4,09
Q7
0,33
0
10³
10⁴
10⁵
10⁶

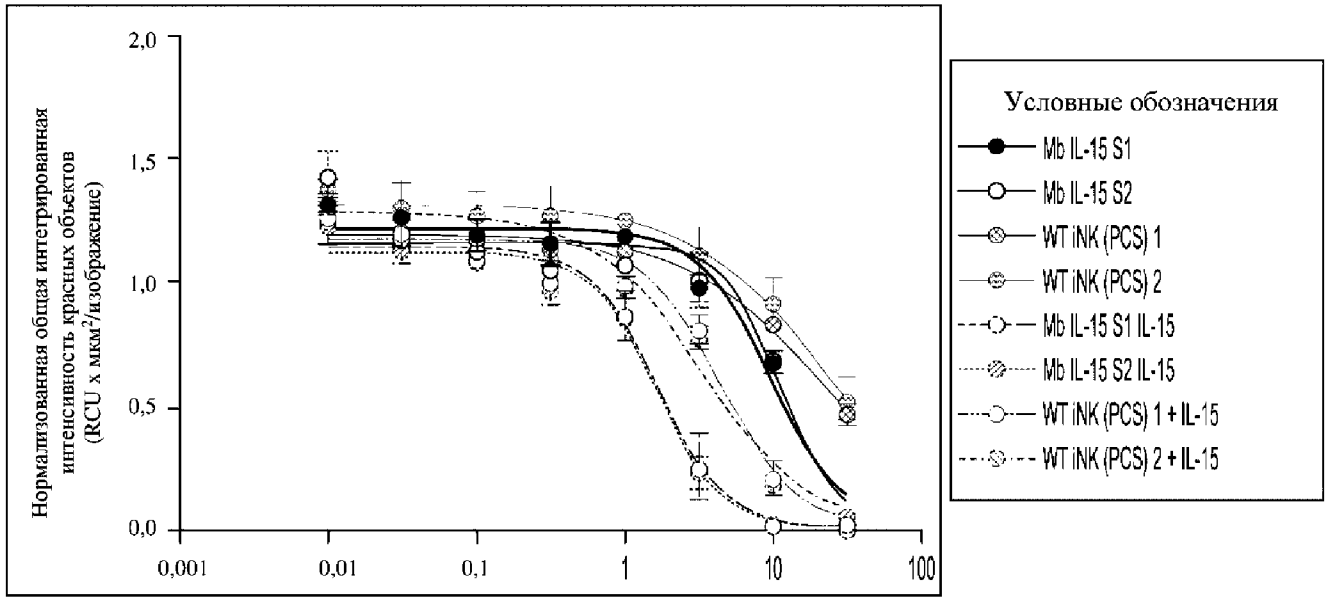
ФИГ. 34B


День 49
WT, R1, группа 1
mbIL-15, R1, группа 1
mbIL-15, R2, группа 1
mbIL-15, R2.1, группа 1
День 42
mbIL-15, R1, группа 2
mbIL-15, R2, группа 2
80
60
40
20
CD56/45+
CD56/KIR+
CD56/IL-15Rα+
CD56/16+
CD56/NKG2A+
CD56/CD94+
CD56/NKp46+
CD56/NKp44+
День 39
WT, R1, группа 1
WT, R2, группа 1
mbIL-15, R1, группа 1
mbIL-15, R2, группа 1
День 32
WT, R1, группа 2
WT, R2, группа 2
mbIL-15, R1, группа 2
mbIL-15, R2, группа 2
80
60
40
20
CD56/45+
CD56/KIR+
CD56/IL-15Rα+
CD56/16+
CD56/NKG2A+
CD56/CD94+
CD56/NKp46+
CD56/NKp44+

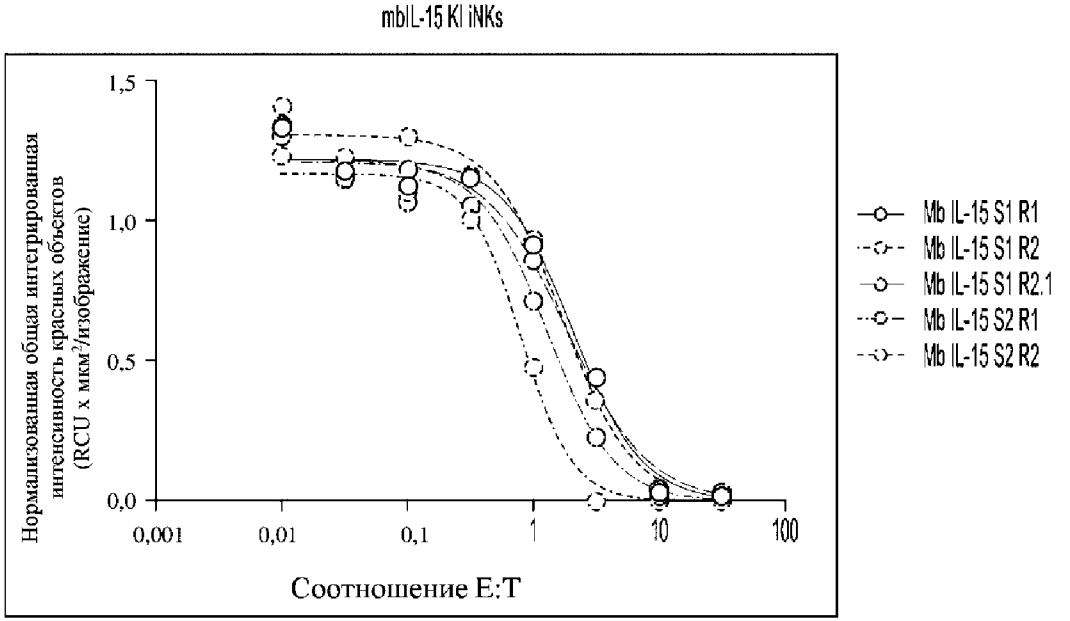
ФИГ. 34С


A
Raji, E:T 1
% цитотоксичности
60
40
20
0
WT S1 R1
WT S2 R2
IL-15 S1 R1
IL-15 S2 R1
IL-15 S2 R2
B
Raji, E:T 2,5
% цитотоксичности
80
60
40
20
0
WT S1 R1
WT S2 R2
IL-15 S1 R1
IL-15 S2 R1
IL-15 S2 R2
- ритуксимаб
+ ритуксимаб

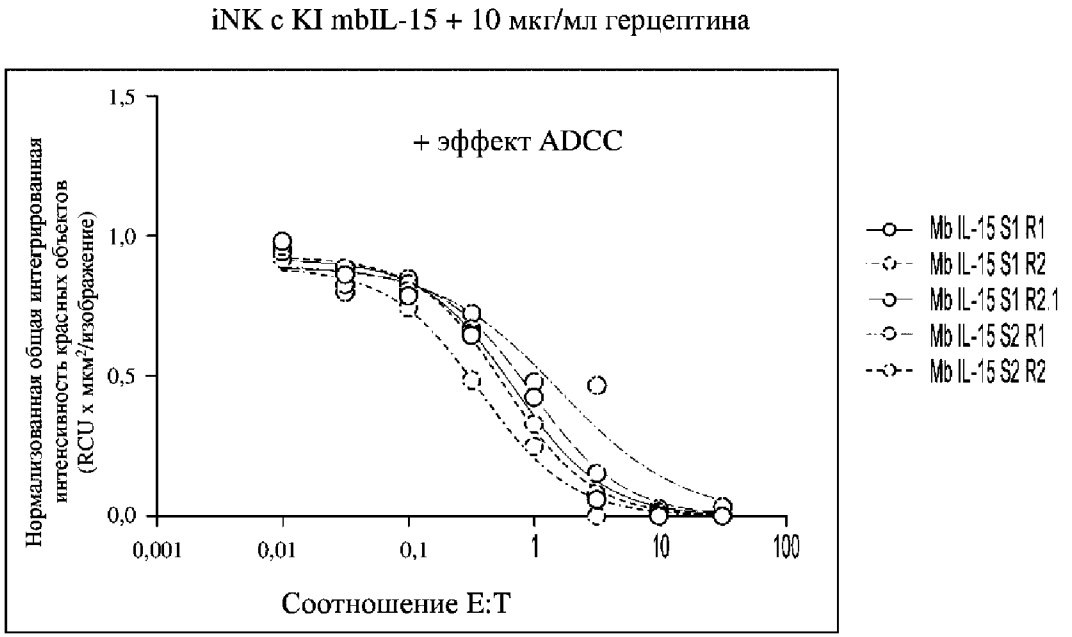
ФИГ. 35


Нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов (RCU x мкм²/изображение)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Соотношение E:T
Условные обозначения
Mb IL-15 S1
Mb IL-15 S2
WT iNK (PCS) 1
WT iNK (PCS) 2
Mb IL-15 S1 IL-15
Mb IL-15 S2 IL-15
WT iNK (PCS) 1 + IL-15
WT iNK (PCS) 2 + IL-15

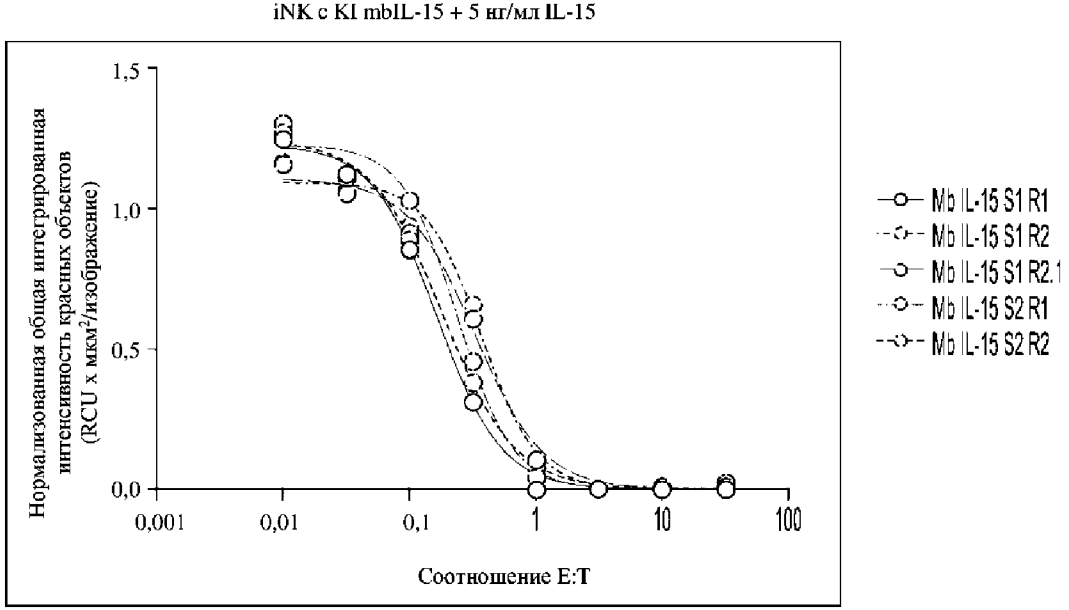
ФИГ. 36


mbIL-15 KI iNKs
Нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов (RCU x мкм²/изображение)
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Соотношение E:T
Mb IL-15 S1 R1
Mb IL-15 S1 R2
Mb IL-15 S1 R2.1
Mb IL-15 S2 R1
Mb IL-15 S2 R2

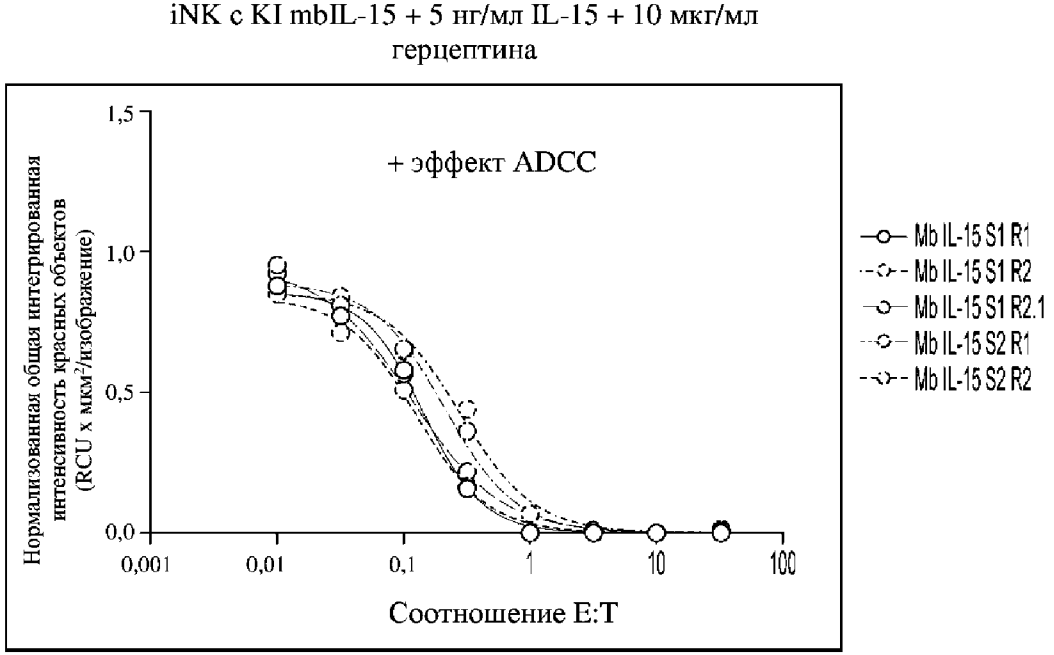
ФИГ. 37A


iNK с KI mbIL-15 + 10 мкг/мл герцептина
+ эффект ADCC
Нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов (RCU x мкм²/изображение)
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Соотношение E:T
Mb IL-15 S1 R1
Mb IL-15 S1 R2
Mb IL-15 S1 R2.1
Mb IL-15 S2 R1
Mb IL-15 S2 R2

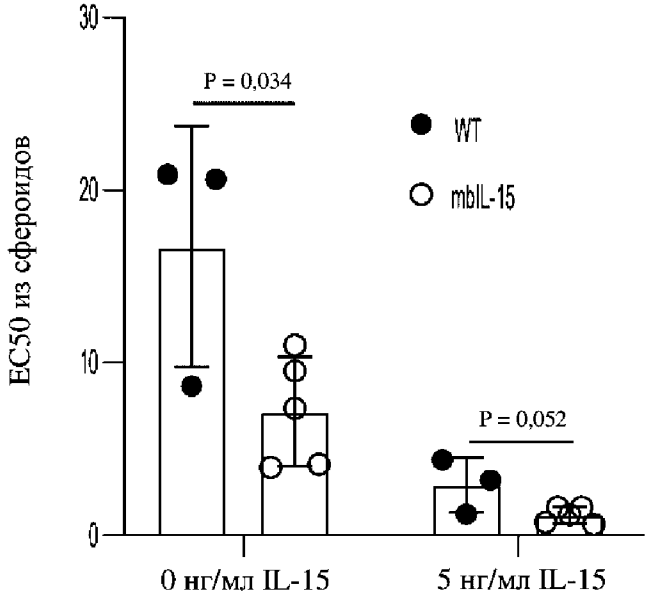
ФИГ. 37B


iNK с KI mbIL-15 + 5 нг/мл IL-15
Нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов (RCU x мкм²/изображение)
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Соотношение E:T
Mb IL-15 S1 R1
Mb IL-15 S1 R2
Mb IL-15 S1 R2.1
Mb IL-15 S2 R1
Mb IL-15 S2 R2

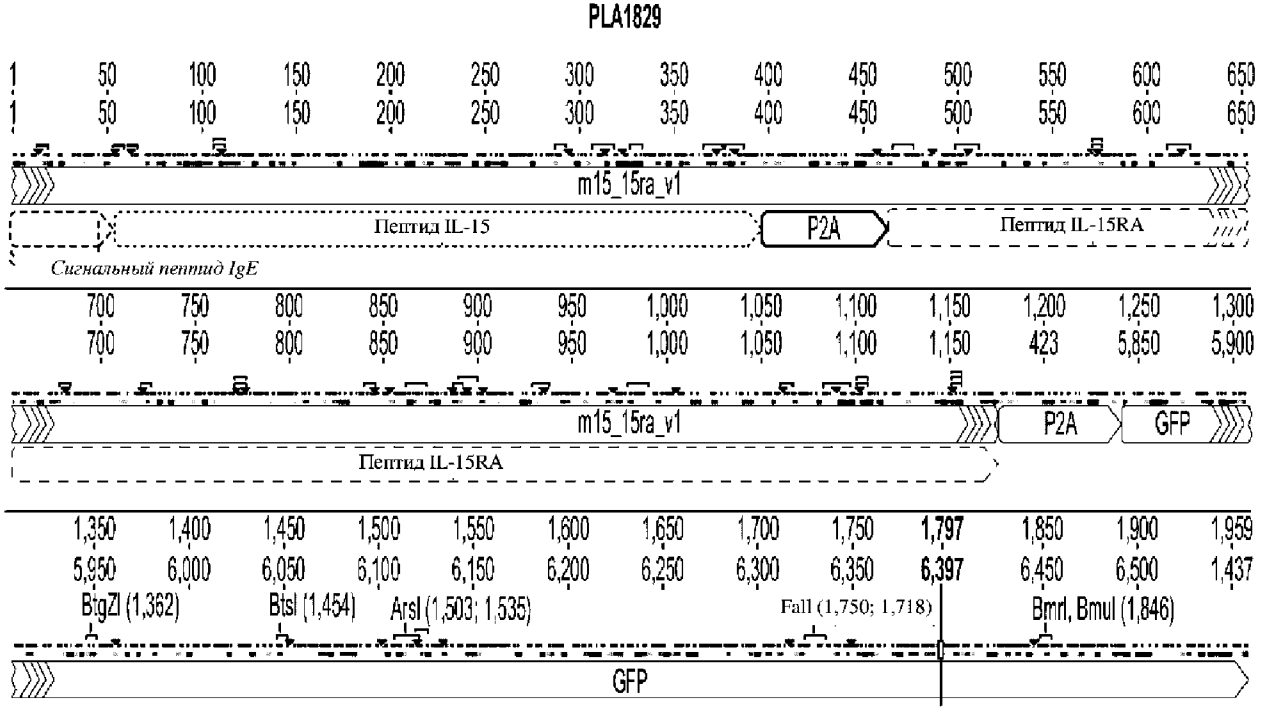
ФИГ. 37C


iNK с KI mbIL-15 + 5 нг/мл IL-15 + 10 мкг/мл герцептина
+ эффект ADCC
Нормализованная общая интегрированная интенсивность красных объектов (RCU x мкм²/изображение)
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Соотношение E:T
Mb IL-15 S1 R1
Mb IL-15 S1 R2
Mb IL-15 S1 R2.1
Mb IL-15 S2 R1
Mb IL-15 S2 R2

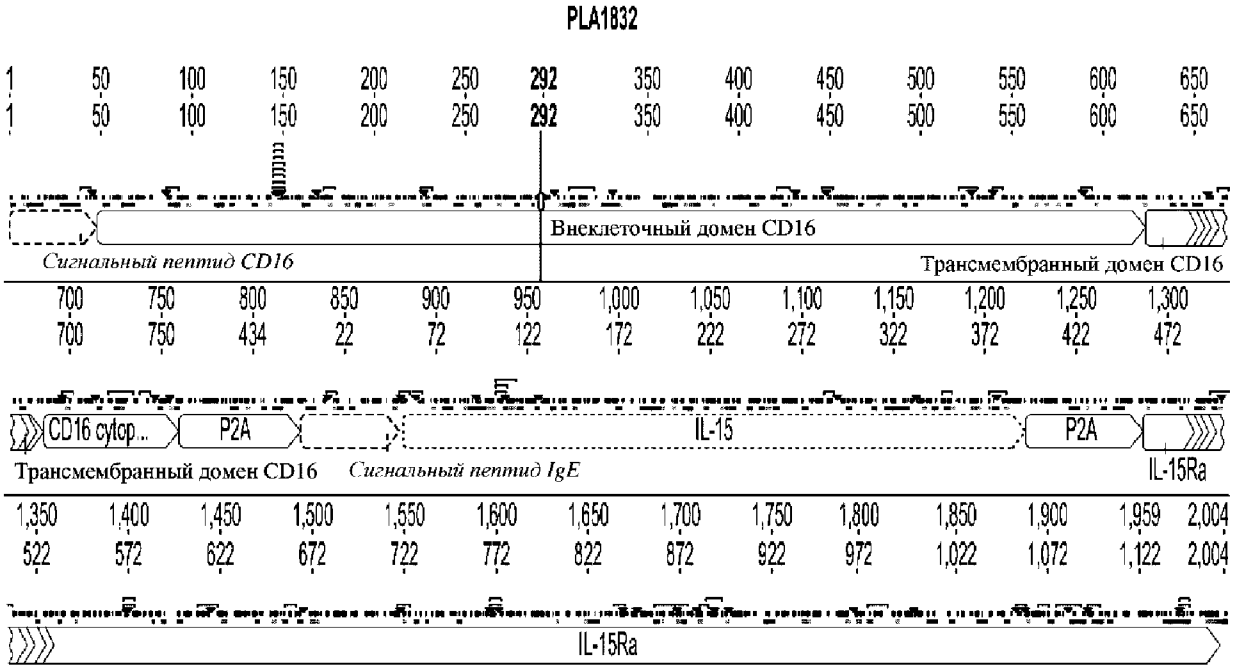
ФИГ. 37D


30
20
10
0
EC50 из сфероидов
P = 0,034
P = 0,052
WT
mbIL-15
0 нг/мл IL-15
5 нг/мл IL-15

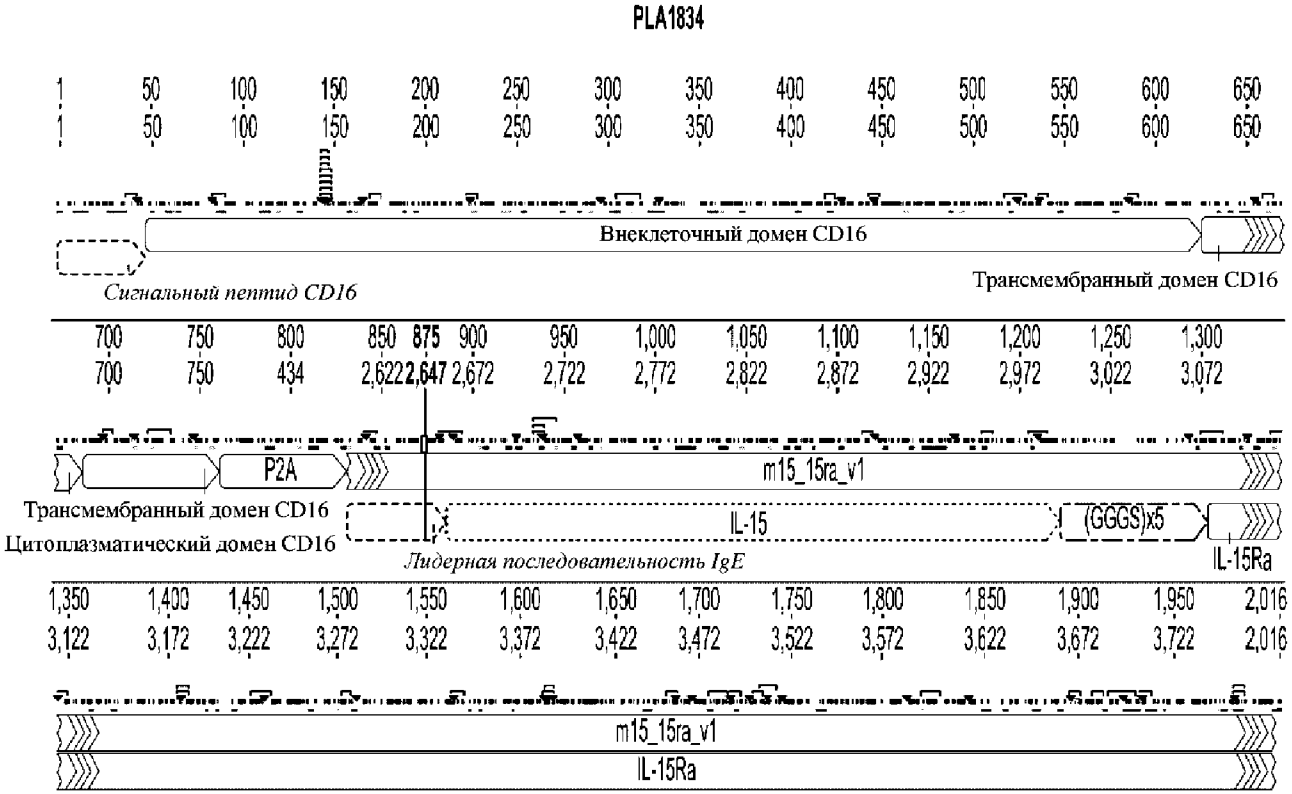
ФИГ. 38


PLA1829
m15_15ra_v1
Пептид IL-15
P2A
Пептид IL-15RA
Сигнальный пептид IgE
m15_15ra_v1
P2A
GFP
Пептид IL-15RA
BtgZI (1,362)
BtsI (1,454)
ArsI (1,503; 1,535)
FalI (1,750; 1,718)
BmrI, BmuI (1,846)
GFP

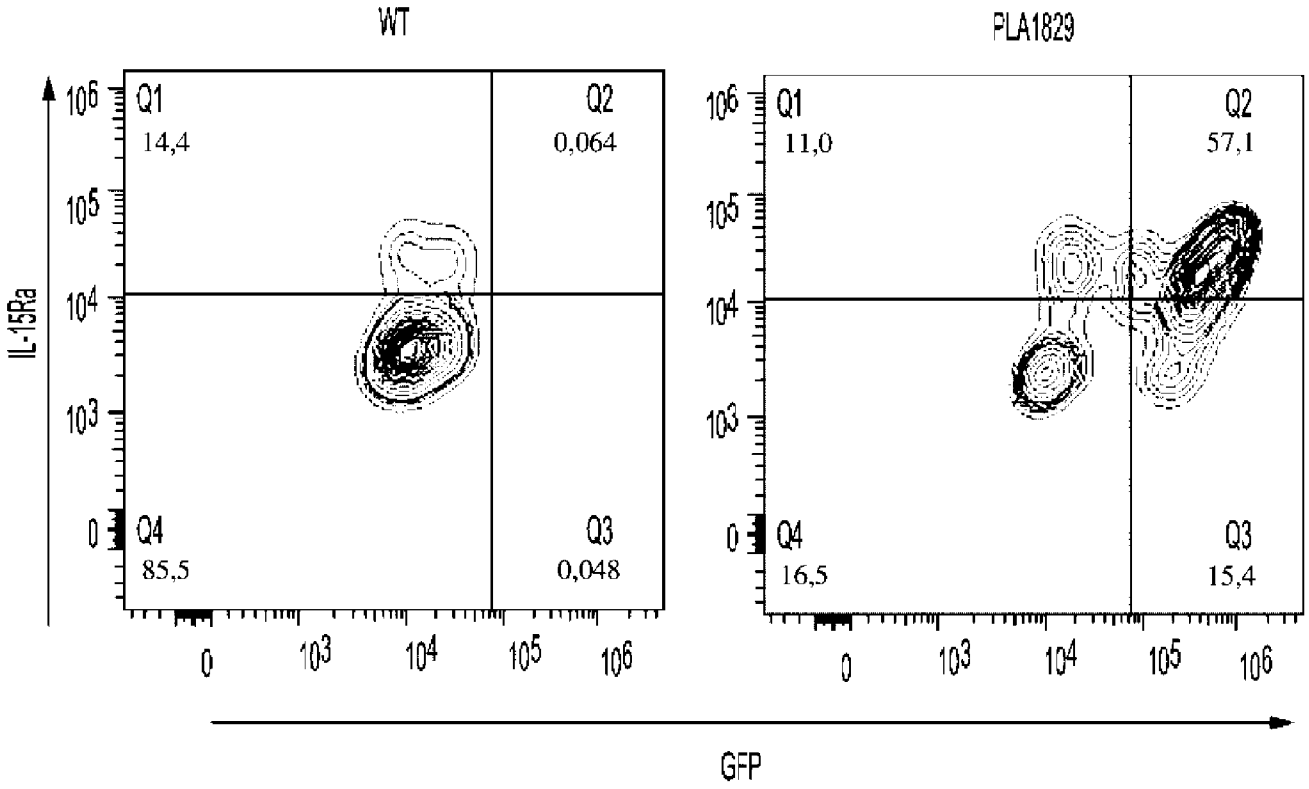
ФИГ. 39A


PLA1832
1 50 100 150 200 250 292 350 400 450 500 550 600 650
1 50 100 150 200 250 292 350 400 450 500 550 600 650
Внеклеточный домен CD16
Сигнальный пептид CD16
Трансмембранный домен CD16
700 750 800 850 900 950 1,000 1,050 1,100 1,150 1,200 1,250 1,300
700 750 434 22 72 122 172 222 272 322 372 422 472
CD16 cytop...
P2A
IL-15
P2A
Трансмембранный домен CD16
Сигнальный пептид IgE
IL-15Ra
1,350 1,400 1,450 1,500 1,550 1,600 1,650 1,700 1,750 1,800 1,850 1,900 1,959 2,004
522 572 622 672 722 772 822 872 922 972 1,022 1,072 1,122 2,004
IL-15Ra

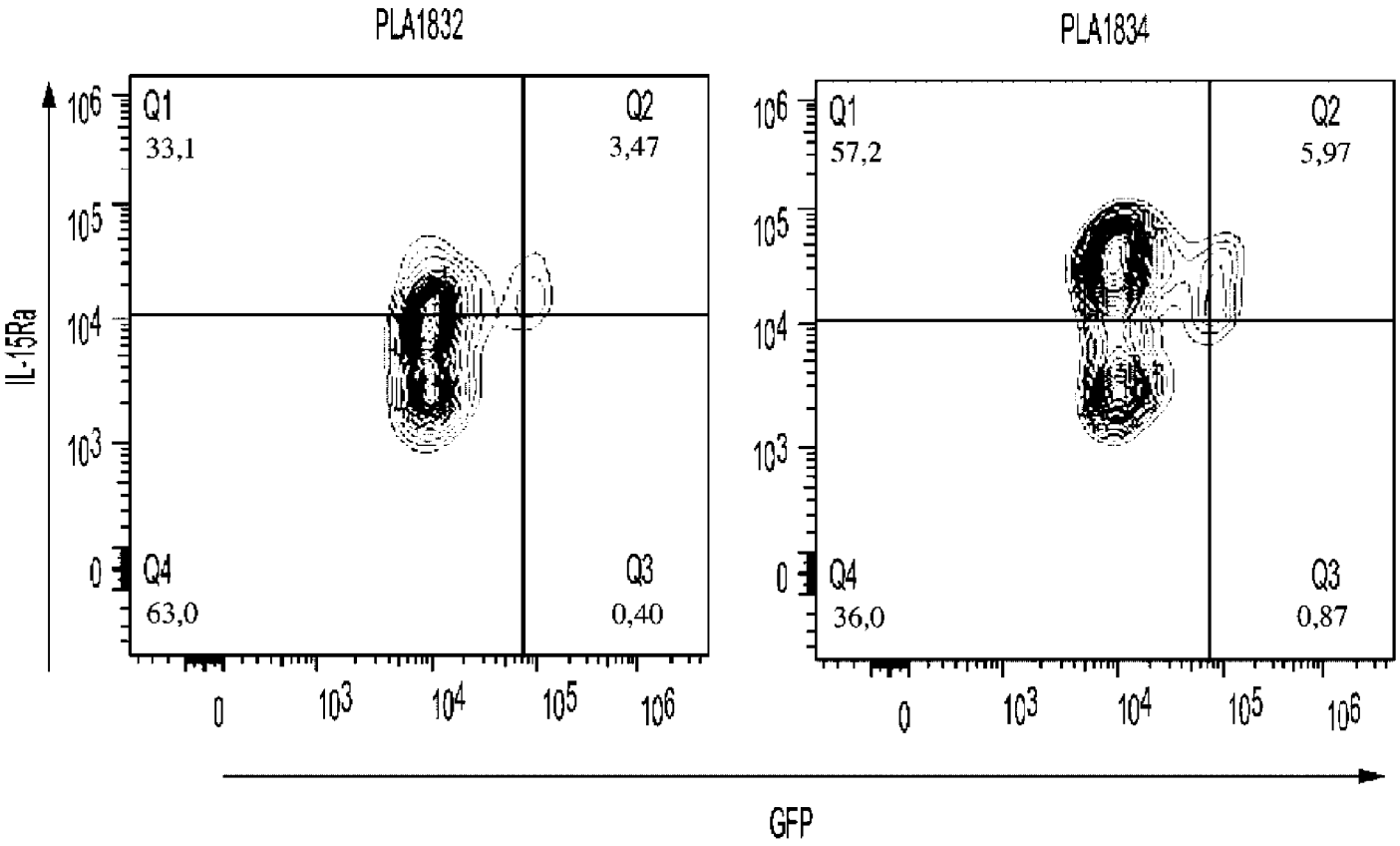
ФИГ. 39B


PLA1834
Внеклеточный домен CD16
Сигнальный пептид CD16
Трансмембранный домен CD16
P2A
m15_15ra_v1
Трансмембранный домен CD16
Цитоплазматический домен CD16
IL-15
(GGGS)x5
Лидерная последовательность IgE
IL-15Ra
m15_15ra_v1
IL-15Ra

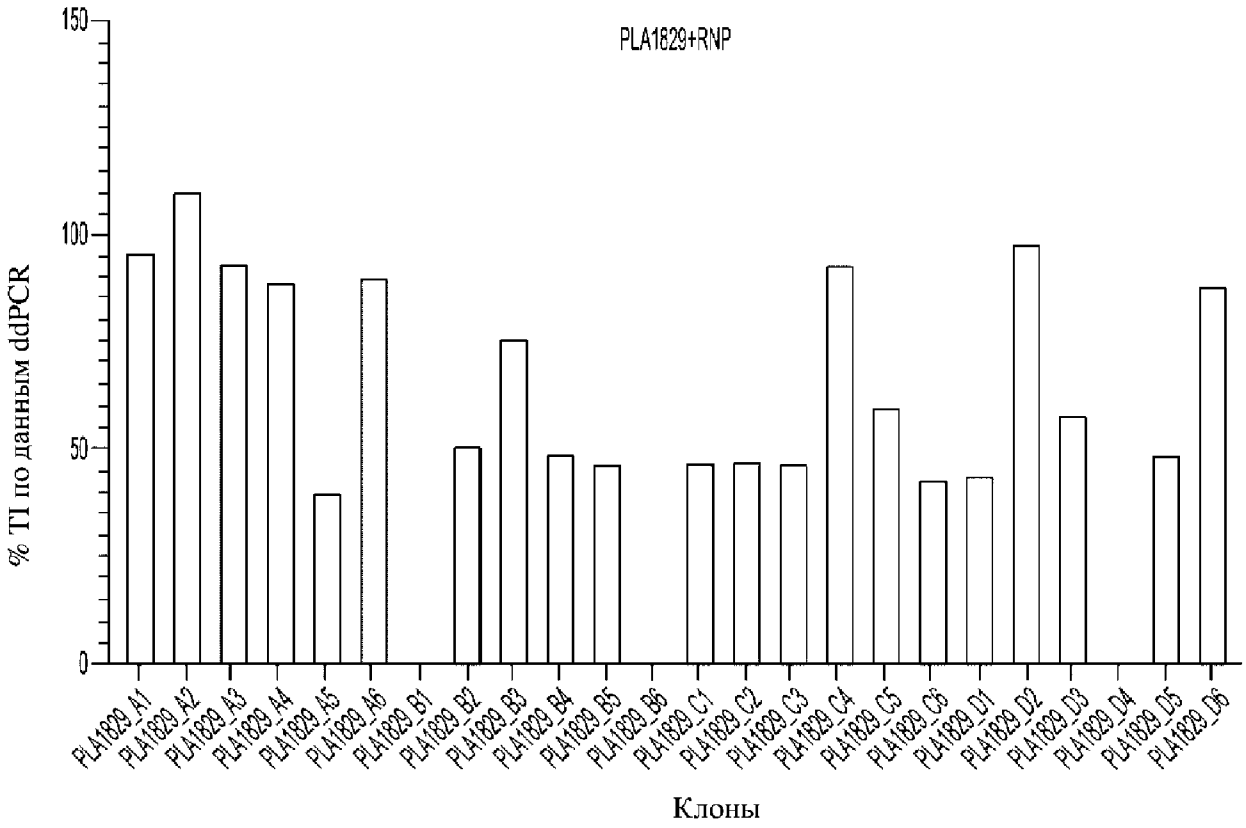
ФИГ. 39C


WT
PLA1829
IL-15Ra
GFP
Q1
14,4
Q2
0,064
Q4
85,5
Q3
0,048
Q1
11,0
Q2
57,1
Q4
16,5
Q3
15,4
0
10^3
10^4
10^5
10^6

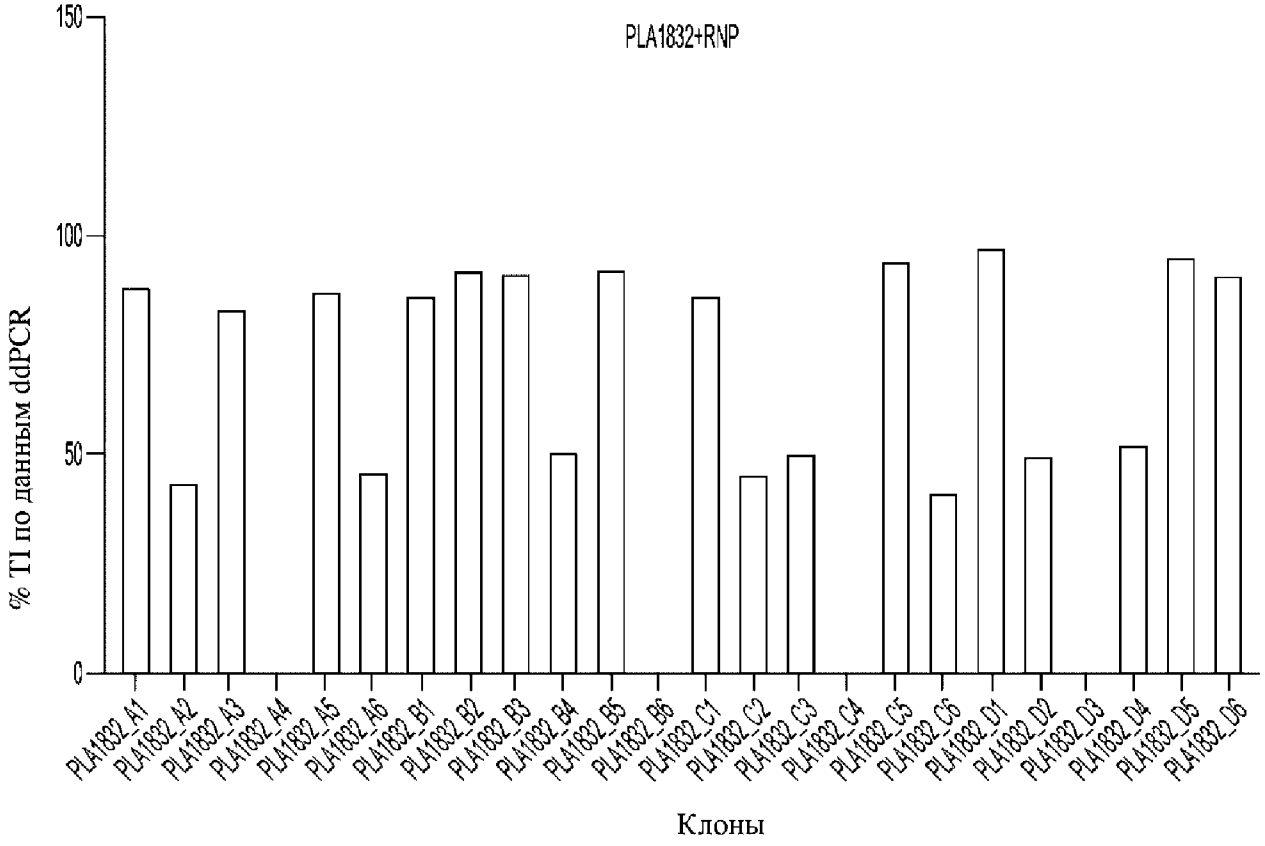
ФИГ. 40A


PLA1832
PLA1834
IL-15Ra
GFP
Q1
33,1
Q2
3,47
Q4
63,0
Q3
0,40
Q1
57,2
Q2
5,97
Q4
36,0
Q3
0,87
0
10^3
10^4
10^5
10^6

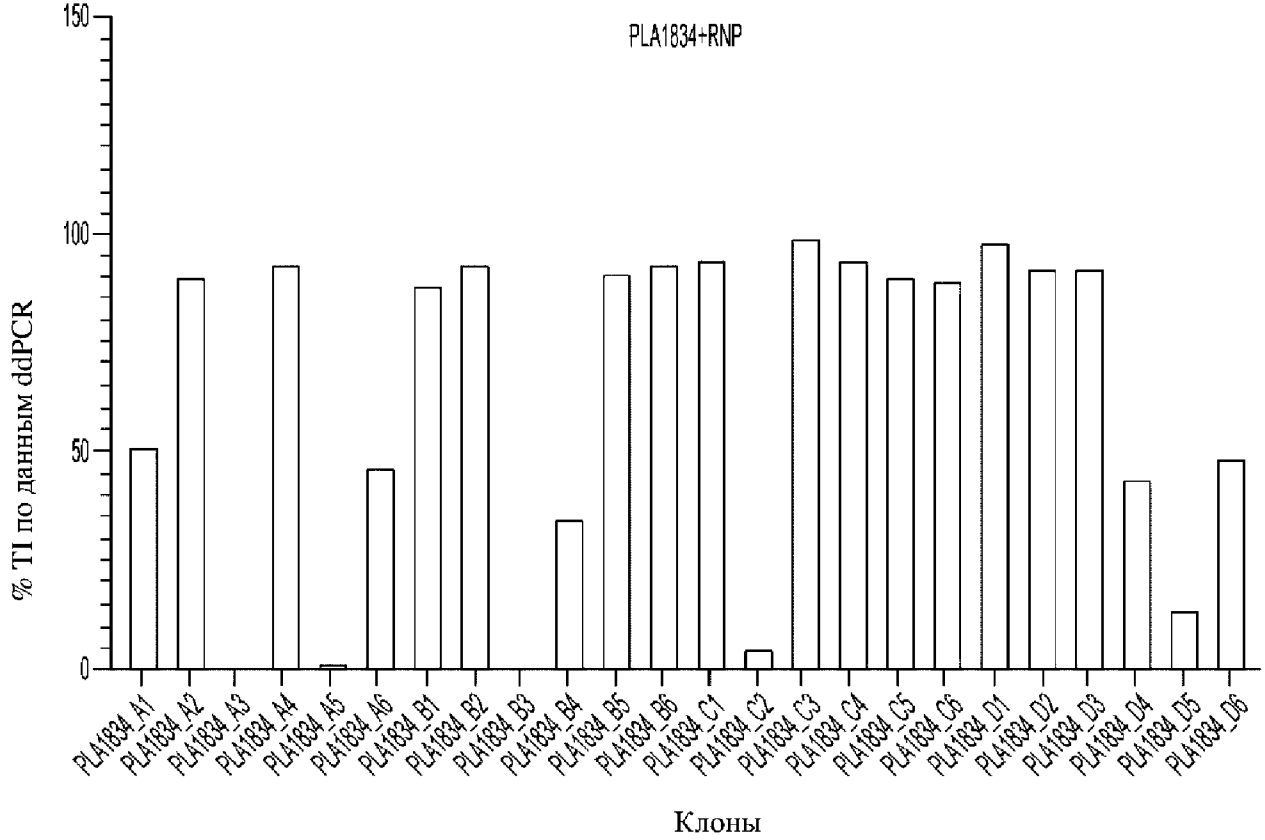
ФИГ. 40B


PLA1629+RNP
% TI по данным ddPCR
150
100
50
0
PLA1629_A1
PLA1629_A2
PLA1629_A3
PLA1629_A4
PLA1629_A5
PLA1629_A6
PLA1629_B1
PLA1629_B2
PLA1629_B3
PLA1629_B4
PLA1629_B5
PLA1629_B6
PLA1629_C1
PLA1629_C2
PLA1629_C3
PLA1629_C4
PLA1629_C5
PLA1629_C6
PLA1629_D1
PLA1629_D2
PLA1629_D3
PLA1629_D4
PLA1629_D5
PLA1629_D6
Клоны

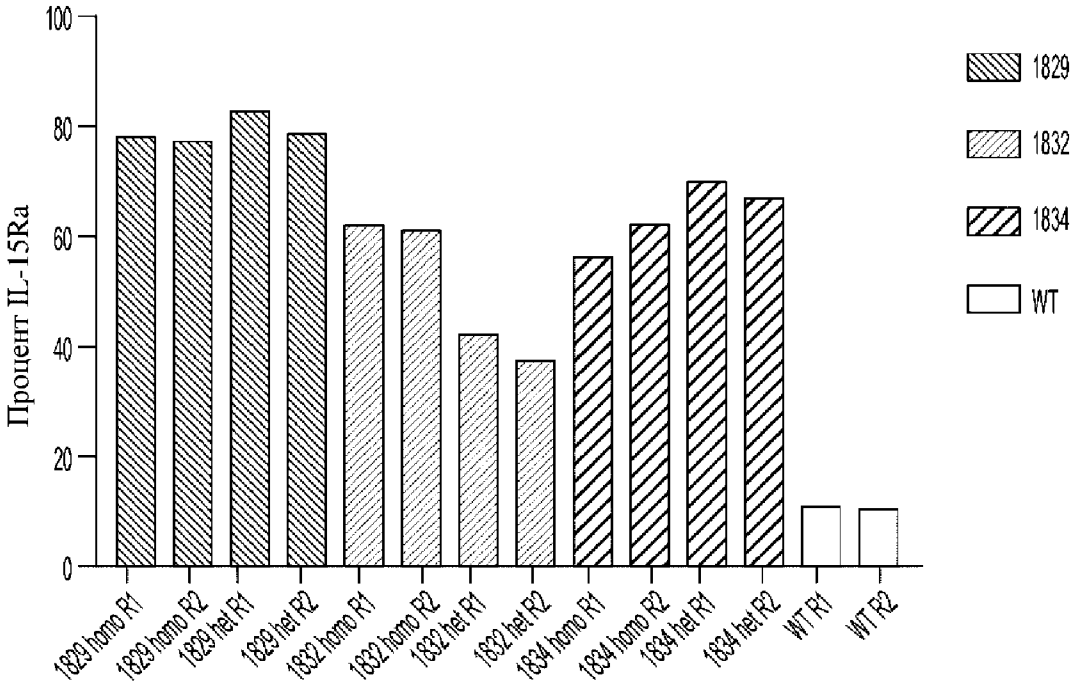
ФИГ. 41A


PLA1832+RNP
% TI по данным ddPCR
150
100
50
0
PLA1832_A1
PLA1832_A2
PLA1832_A3
PLA1832_A4
PLA1832_A5
PLA1832_A6
PLA1832_B1
PLA1832_B2
PLA1832_B3
PLA1832_B4
PLA1832_B5
PLA1832_B6
PLA1832_C1
PLA1832_C2
PLA1832_C3
PLA1832_C4
PLA1832_C5
PLA1832_C6
PLA1832_D1
PLA1832_D2
PLA1832_D3
PLA1832_D4
PLA1832_D5
PLA1832_D6
Клоны

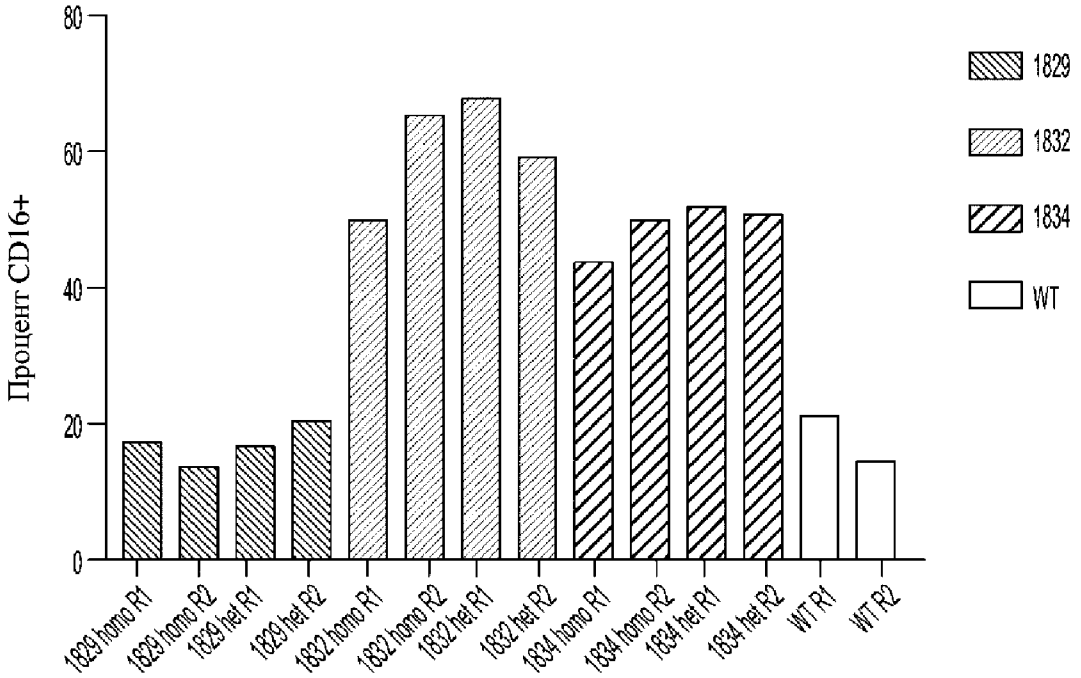
ФИГ. 41B


PLA1834+RNP
% TI по данным ddPCR
150
100
50
0
PLA1834_A1
PLA1834_A2
PLA1834_A3
PLA1834_A4
PLA1834_A5
PLA1834_A6
PLA1834_B1
PLA1834_B2
PLA1834_B3
PLA1834_B4
PLA1834_B5
PLA1834_B6
PLA1834_C1
PLA1834_C2
PLA1834_C3
PLA1834_C4
PLA1834_C5
PLA1834_C6
PLA1834_D1
PLA1834_D2
PLA1834_D3
PLA1834_D4
PLA1834_D5
PLA1834_D6
Клоны

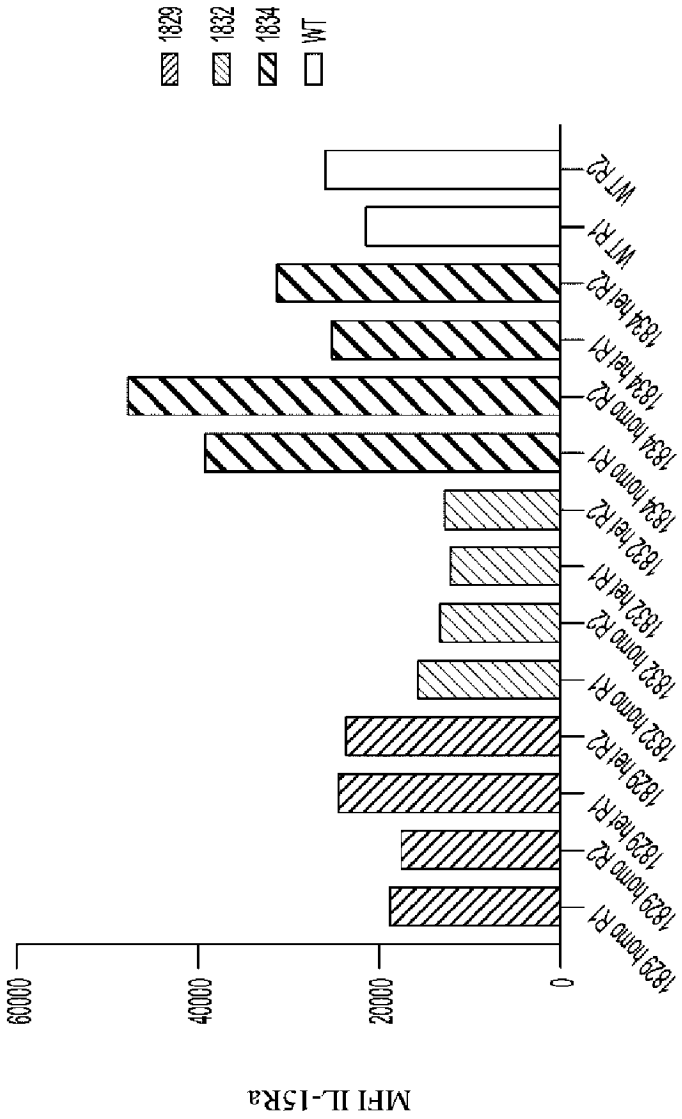
ФИГ. 41C


Процент IL-15Ra
100
80
60
40
20
0
1829 homo R1
1829 homo R2
1829 het R1
1829 het R2
1832 homo R1
1832 homo R2
1832 het R1
1832 het R2
1834 homo R1
1834 homo R2
1834 het R1
1834 het R2
WT R1
WT R2
1829
1832
1834
WT

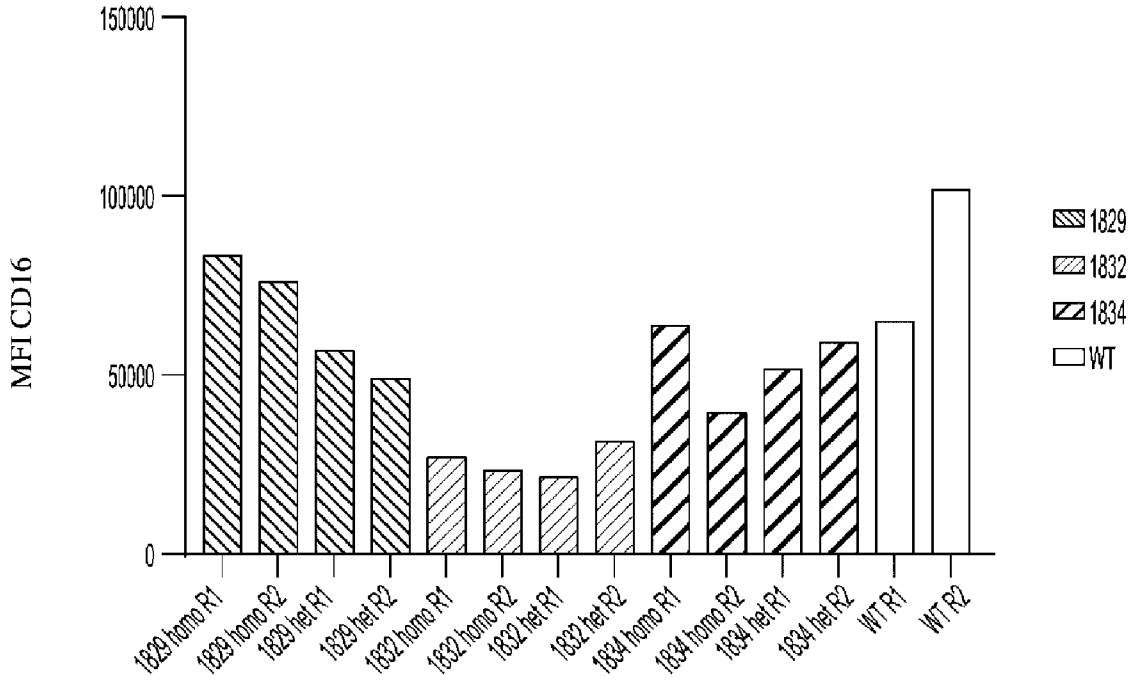
ФИГ. 42А


Процент CD16+
80
60
40
20
0
1829
1832
1834
WT
1829 homo R1
1829 homo R2
1829 het R1
1829 het R2
1832 homo R1
1832 homo R2
1832 het R1
1832 het R2
1834 homo R1
1834 homo R2
1834 het R1
1834 het R2
WT R1
WT R2

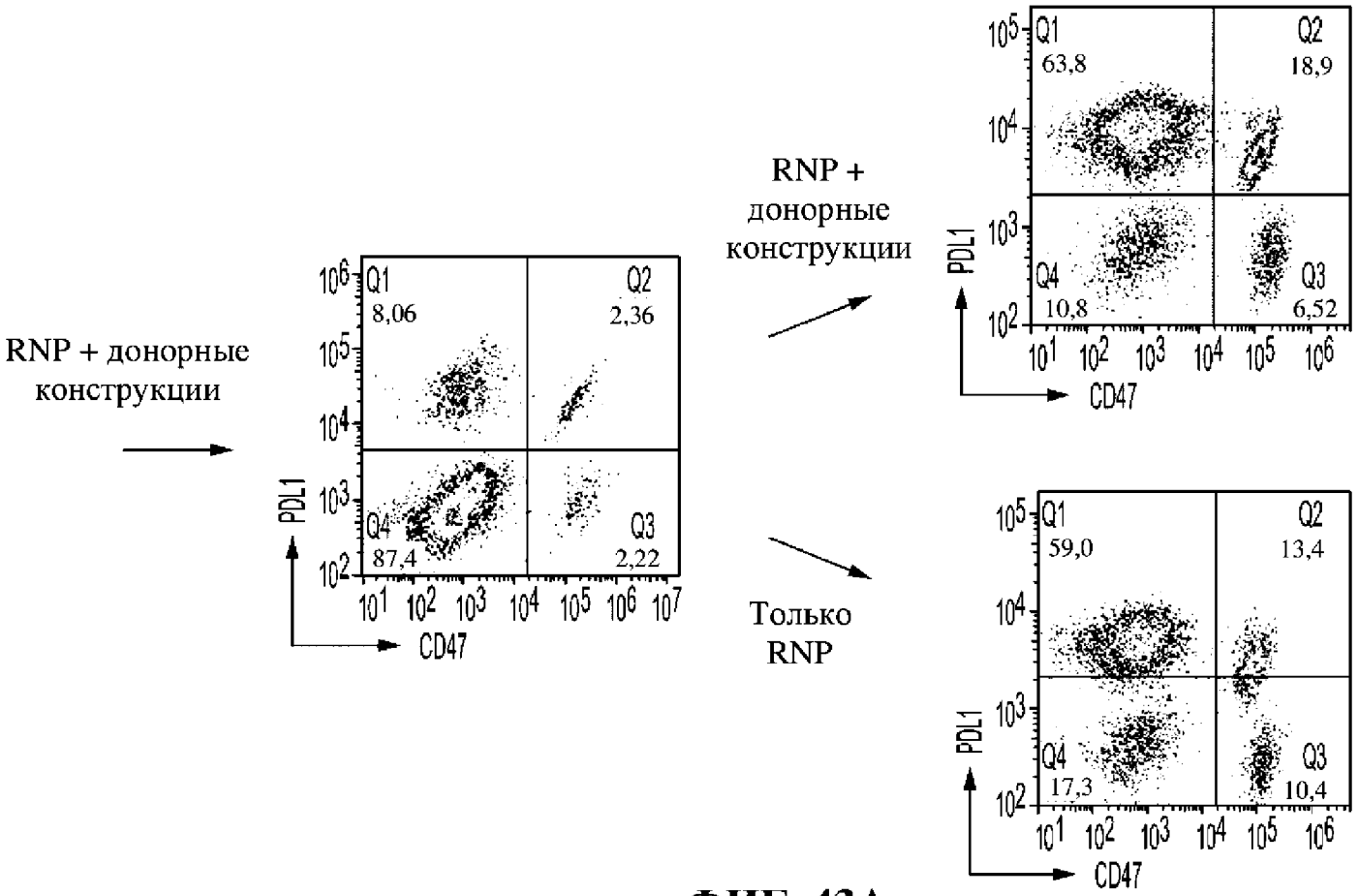
ФИГ. 42B


1829
1832
1834
WT
MFI IL-15Rα
60000
40000
20000
0
1829 homo R1
1829 homo R2
1829 het R1
1829 het R2
1832 homo R1
1832 homo R2
1832 het R1
1832 het R2
1834 homo R1
1834 homo R2
1834 het R1
1834 het R2
WT R1
WT R2

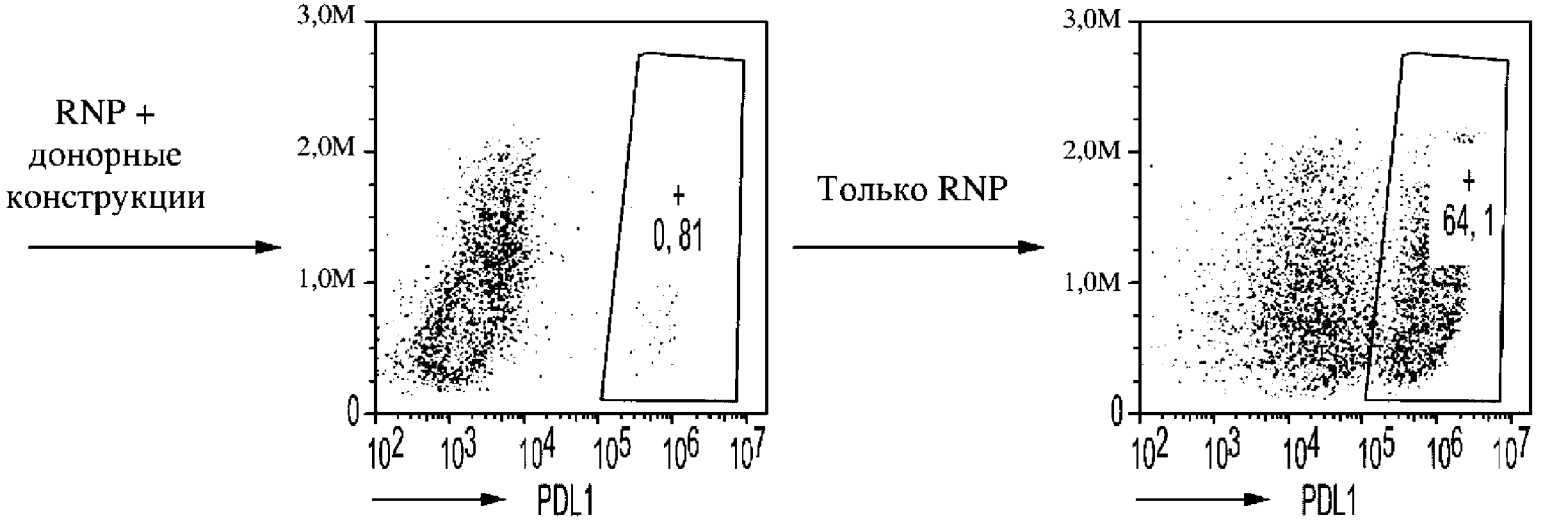
ФИГ. 42C


MFI CD16
150000
100000
50000
0
1829 homo R1
1829 homo R2
1829 het R1
1829 het R2
1832 homo R1
1832 homo R2
1832 het R1
1832 het R2
1834 homo R1
1834 homo R2
1834 het R1
1834 het R2
WT R1
WT R2
1829
1832
1834
WT

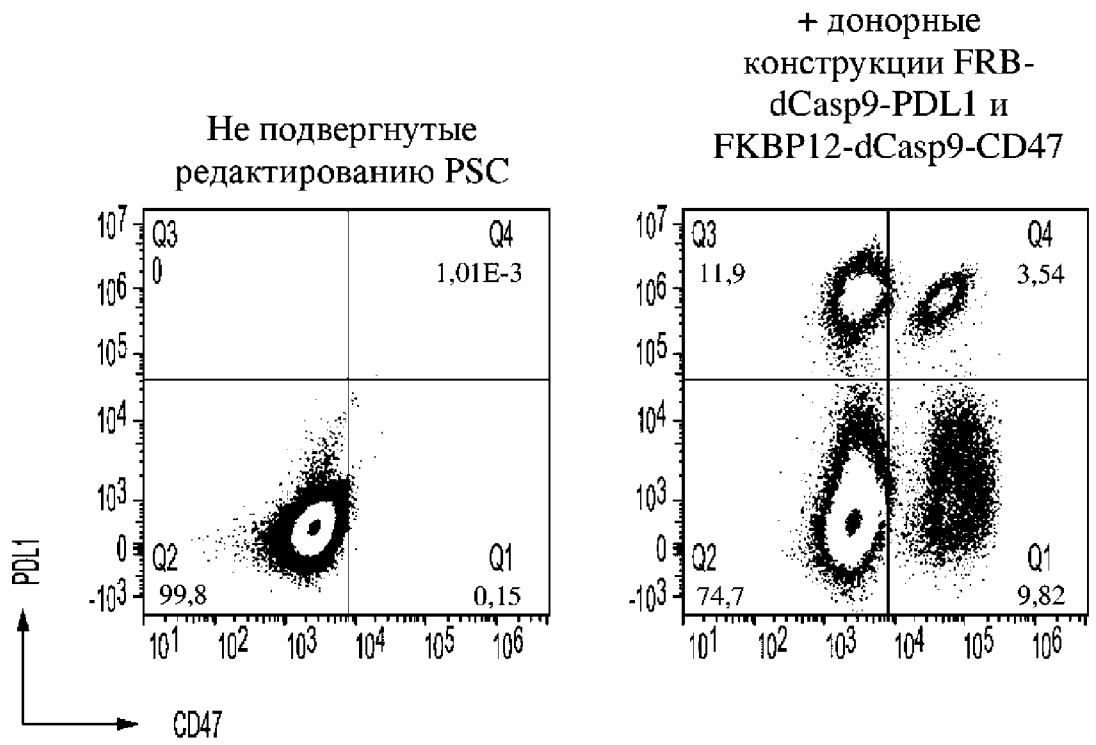
ФИГ. 42D


RNP + донорные конструкции
RNP + донорные конструкции
Только RNP
Q1
8,06
Q2
2,36
Q4
87,4
Q3
2,22
Q1
63,8
Q2
18,9
Q4
10,8
Q3
6,52
Q1
59,0
Q2
13,4
Q4
17,3
Q3
10,4
PDL1
CD47

ФИГ. 43A


RNP +
донорные
конструкции
3,0M
2,0M
1,0M
0
+
0, 81
10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7
PDL1
Только RNP
3,0M
2,0M
1,0M
0
+
64, 1
10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7
PDL1

ФИГ. 43B


Не подвергнутые редактированию PSC
+ донорные конструкции FRB-dCasp9-PDL1 и FKBP12-dCasp9-CD47
Q3
0
Q4
1,01E-3
Q2
99,8
Q1
0,15
Q3
11,9
Q4
3,54
Q2
74,7
Q1
9,82
PDL1
CD47

ФИГ. 44