

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577697EA/026

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает преимущество предварительных заявок США 63/082555, поданной 24 сентября 2020 года, и 63/242957, поданной 10 сентября 2021 года. Содержания вышеупомянутых заявок включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 17 сентября 2021 года, называется O2057-7017WO_SL.txt и имеет размер 694831 байт.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Неправильная регуляция экспрессии генов является основной причиной многих заболеваний (например, у млекопитающих, например людей). В то время как существуют методики, которые модулируют уровень экспрессии генов в течение коротких периодов времени, лечение многих заболеваний требует стабильной, долгосрочной модуляции уровня экспрессии генов. Существует потребность в новых инструментах, системах и способах для стабильного изменения, например снижения, уровня экспрессии генов, ассоциированных с заболеванием.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, репрессоры экспрессии и системы репрессии экспрессии, которые можно применять для модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени.

В некоторых аспектах репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и домен репрессора, способный модулировать (например, снижать) уровень экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, первый домен репрессора и второй домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора отличается от второго домена репрессора. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора идентичен второму домену репрессора.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает систему репрессии экспрессии, содержащую первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и первый домен репрессора, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и второй домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с первой последовательностью ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК,

специфически связывается со второй последовательностью ДНК, отличающейся от первой последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора отличается от второго домена репрессора. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит (i) первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, первый домен репрессора и второй домен репрессора, и (ii) второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и первый домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления все три домена репрессора отличаются. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два домена репрессора являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит (i) первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, первый домен репрессора и второй домен репрессора, и (ii) второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, первый домен репрессора и второй домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления все четыре домена репрессора отличаются. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два домена репрессора являются идентичными.

Обычно модуляция уровня экспрессии гена-мишени с помощью системы репрессии экспрессии предусматривает связывание первого репрессора экспрессии и второго репрессора экспрессии с соответственно первой и второй последовательностями ДНК. Связывание первой и второй последовательностей ДНК локализует функциональные свойства первого и второго доменов репрессора в этих сайтах. Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления считается, что использование функциональных свойств как первого, так и второго доменов репрессора стабильно репрессирует экспрессию гена-мишени, ассоциированного с первой и/или второй последовательностями ДНК или содержащего их, например, где первая и/или вторая последовательности ДНК представляют собой или содержат последовательности гена-мишени или одного или нескольких функционально связанных элементов контроля транскрипции.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, содержащие нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 1-21, где репрессор экспрессии или система репрессии экспрессии способны снижать уровень экспрессии гена-мишени.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК (где необязательно функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, например каталитически неактивный белок CRISPR/Cas), которая связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом

инициации транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; а также домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК (где необязательно функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, например каталитически неактивный белок CRISPR/Cas), которая связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом инициации транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; первый домен репрессора и второй домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора идентичен второму домену репрессора. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора не идентичен второму домену репрессора.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает систему репрессии экспрессии, которая содержит (i) первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК (где необязательно функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, например каталитически неактивный белок CRISPR/Cas), которая связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом инициации транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; а также первый домен репрессора, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК (где необязательно функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, например каталитически неактивный белок CRISPR/Cas), которая связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом инициации транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; и первый домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления первые домены репрессора первого репрессора экспрессии и вторых репрессоров экспрессии являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления первые домены репрессии первого и второго репрессоров экспрессии отличаются. В некоторых вариантах осуществления первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, отличаются. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК (где необязательно функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, например каталитически неактивный белок CRISPR/Cas), которая

связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом инициации транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции, первый домен репрессора и второй домен репрессора, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК (где необязательно функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, например каталитически неактивный белок CRISPR/Cas), которая связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом инициации транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; первый домен репрессора и второй домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления первые домены репрессора первого репрессора экспрессии и вторых репрессоров экспрессии являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления первые домены репрессии первого и второго репрессоров экспрессии отличаются. В некоторых вариантах осуществления вторые домены репрессора первого репрессора экспрессии и вторых репрессоров экспрессии являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления вторые домены репрессии первого и второго репрессоров экспрессии отличаются.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает нуклеиновую кислоту, кодирующую репрессор экспрессии или его компонент (например, gRNA). В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на нуклеиновую кислоту, кодирующую первый репрессор экспрессии, второй репрессор экспрессии, их оба или их компонент (например, gRNA). В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к клетке, содержащей репрессор экспрессии, систему репрессии экспрессии, нуклеиновую кислоту или вектор, описанные в данном документе. В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на липидную наночастицу, содержащую вектор, нуклеиновую кислоту, систему репрессии экспрессии или репрессор экспрессии, описанные в данном документе. В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на реакционную смесь, содержащую репрессор экспрессии, систему репрессии экспрессии, нуклеиновую кислоту, вектор или липидную наночастицу, описанные в данном документе. В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на фармацевтическую композицию, содержащую систему репрессии экспрессии, нуклеиновую кислоту или вектор, описанные в данном документе.

В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на способ снижения уровня экспрессии гена-мишени, включающий обеспечение репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, описанных в данном документе, и приведение в контакт гена-мишени и/или одного или нескольких функционально связанных элементов контроля транскрипции с репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии со снижением таким образом уровня экспрессии гена-мишени.

В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на способ лечения состояния, ассоциированного с чрезмерной экспрессией гена-мишени у субъекта, включающий введение субъекту репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты или вектора, описанных в данном документе, с обеспечением таким образом лечения состояния.

В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на способ лечения состояния, ассоциированного с нарушением регуляции гена-мишени у субъекта, включающий введение субъекту репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты или вектора, описанных в данном документе, с обеспечением таким образом лечения состояния.

Дополнительные признаки любого из вышеуказанных способов или композиций предусматривают один или несколько из следующих пронумерованных вариантов осуществления.

Специалистам в данной области будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, или они будут способны их установить с помощью проведения не более чем обычных экспериментов. Предполагают, что такие эквиваленты охвачены следующими пронумерованными вариантами осуществления.

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие литературные источники (например, регистрационные номера в базах данных последовательностей), упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме. Например, все последовательности из GenBank, UniGene и Entrez, упомянутые в данном документе, например в любой таблице данного документа, включены посредством ссылки. Если не указано иное, то номера доступа последовательностей, указанные в данном документе, в том числе в любой таблице данного документа, относятся к записям в базах данных по состоянию на 23 сентября 2019 года. Если один ген или белок относится к множеству номеров доступа последовательности, то охвачены все варианты последовательности.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Репрессор экспрессии содержащий

функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и
домен репрессора,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии гена-мишени.

2. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 1, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором, энхансером, суперэнхансером или сайтом инициации транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, или связывается с последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции.

3. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 1 или 2, где домен

репрессора ковалентно связан с функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК.

4. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 1 или 2, где домен репрессора связан с функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, посредством линкера.

5. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где домен репрессора представляет собой С-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

6. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где домен репрессора представляет собой N-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

7. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где домен репрессора кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из любого из SEQ ID NO: 47-56, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

8. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 57-66, 90 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

9. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где домен репрессора представляет собой MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент, например, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57 или 90 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где необязательно домен репрессора представляет собой С-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

10. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где домен репрессора представляет собой DNMT1 или его функциональный вариант или фрагмент, например, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 58 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где необязательно домен репрессора представляет собой С-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

11. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов

осуществления, где домен репрессора представляет собой DNMT3a/3L или его функциональный вариант или фрагмент, например, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59 или 60 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где необязательно домен репрессора представляет собой С-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

12. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где домен репрессора представляет собой KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, например, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где необязательно домен репрессора представляет собой С-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

13. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где домен репрессора представляет собой G9A или его функциональный вариант или фрагмент, например, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где необязательно домен репрессора представляет собой N-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

14. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где домен репрессора представляет собой HDAC8 или его функциональный вариант или фрагмент, например, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где необязательно домен репрессора представляет собой С-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

15. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где домен репрессора представляет собой LSD1 или его функциональный вариант или фрагмент, например, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где необязательно домен репрессора представляет собой С-концевую часть

функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

16. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где домен репрессора представляет собой EZH2 или его функциональный вариант или фрагмент, например, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где необязательно домен репрессора представляет собой N-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

17. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где домен репрессора представляет собой FOG1 или его функциональный вариант или фрагмент, например, где домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

18. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который дополнительно содержит второй домен репрессора.

19. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 18, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, расположена между доменом репрессора и вторым доменом репрессора.

20. Репрессор экспрессии содержащий
функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК,
первый домен репрессора и
второй домен репрессора,
где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии гена-мишени.

21. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором, энхансером, суперэнхансером или сайтом инициации транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, или связывается с последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции.

22. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-21, где первый домен репрессора идентичен второму домену репрессора.

23. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-21, где первый домен репрессора не идентичен второму домену репрессора.

24. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-23, где первый домен репрессора и второй домен репрессора ковалентно связаны с функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК.

25. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-24, где

первый домен репрессора связан с функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, посредством первого линкера, и второй домен репрессора связан с функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, посредством второго линкера.

26. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 25, где первый линкер идентичен второму линкеру.

27. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 25, где первый линкер не идентичен второму линкеру.

28. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-27, где первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

29. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-28, где второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

30. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 25-29, где C-концевая часть первого домена репрессора связана с N-концевой частью функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, посредством первого линкера, и N-концевая часть второго домена репрессора связана с C-концевой частью функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, посредством второго линкера.

31. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-30, где первый домен репрессора представляет собой EZN2 или его функциональный вариант или фрагмент, например, где первый домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора представляет собой KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, например, где второй домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

32. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-30, где первый домен репрессора представляет собой G9A или его функциональный вариант или фрагмент, например, где первый домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с

ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора представляет собой KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, например, где второй домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

33. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-30, где первый домен репрессора представляет собой FOG1 или его функциональный вариант или фрагмент, например, где первый домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора представляет собой FOG1 или его функциональный вариант или фрагмент, например, где второй домен репрессора содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

34. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-33, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-21.

35. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-34, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas (например, каталитически неактивный белок CRISPR/Cas), домен по типу "цинкового пальца" или эффекторную молекулу TAL.

36. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 35, где молекула CRISPR/Cas предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из D10A, D839A, H840A и N863A.

37. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-36, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с промоторной областью гена-мишени, энхансерной областью (например, суперэнхансерной областью) или якорной последовательностью.

38. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-37, где домен репрессора содержит DNMT1, DNMT3a/3L, MQ1, KRAB, G9A, HDAC8, LSD1, EZH2 или FOG1,

39. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-38, где первый домен репрессора содержит DNMT1, DNMT3a/3l, MQ1, KRAB, G9A, HDAC8, LSD1, EZH2 или FOG1, , и второй домен репрессора содержит DNMT1, DNMT3a/3l, MQ1, KRAB, G9A, HDAC8, LSD1, EZH2 или FOG1,

40. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-39, где репрессор экспрессии кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из любого из SEQ ID NO: 22-32, 92, 95, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

41. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-40, где репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 33-36, 38-44, 67-69, 93, 96, или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

42. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-41, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из любого из SEQ ID NO: 45 или 89, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

43. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-42, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 46 или 88 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

44. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-43, где
(i) первый домен репрессора кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из любого из SEQ ID NO: 47-56, 90, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

(ii) второй домен репрессора кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из любого из SEQ ID NO: 47-56, 90, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или

имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

45. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-43, где

(i) первый домен репрессора содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 57-66 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

(ii) второй домен репрессора содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 57-66 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

46. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает эффекторную молекулу TAL, молекулу CRISPR/Cas, домен по типу "цинкового пальца", домен tetR, домен мегануклеазы или олигонуклеотид.

47. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, дополнительно предусматривает gRNA, например gRNA, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-21, например, где gRNA содержит последовательность, которая содержит по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-21.

48. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления 35-47, где домен, целенаправленно воздействующий на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, например каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, и gRNA, например gRNA, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-21, например, где gRNA содержит последовательность, которая содержит по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-21, и домен репрессора содержит функциональную группу, выбранную из DNMT1, DNMT3a/3l, MQ1, KRAB, G9A, HDAC8, LSD1, EZH2 или FOG1.

49. Репрессор экспрессии согласно вариантам осуществления 35-47, где домен, целенаправленно воздействующий на ДНК, содержит молекулу CRISPR/Cas, например каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, и gRNA, например gRNA, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-21, например, где gRNA содержит последовательность, которая содержит по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19

или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-21, первый домен репрессора содержит функциональную группу, выбранную из DNMT1, DNMT3a/3L, MQ1, KRAB, G9A, HDAC8, LSD1, EZH2 или FOG1, и второй домен содержит функциональную группу, выбранную из DNMT1, DNMT3a/3L, MQ1, KRAB, G9A, HDAC8, LSD1, EZH2 или FOG1.

50. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 35-49, где молекула CRISPR/Cas содержит белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

51. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 35-50, где молекула CRISPR/Cas содержит каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, например dCas9.

52. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который (i) содержит одну или несколько сигнальных последовательностей ядерной локализации (NLS) или (ii) не содержит NLS.

53. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий первую NLS на N-конце, например, где первая NLS имеет последовательность под SEQ ID NO: 86.

54. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий NLS, например вторую NLS, на C-конце, например, с последовательностью под SEQ ID NO: 87.

55. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где первая и вторая NLS имеют одинаковую последовательность.

56. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 52-55, где первая и вторая NLS имеют отличающиеся последовательности.

57. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который содержит эпитопную метку.

58. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 57, где эпитопная метка представляет собой HA-метку, например HA-метку, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 80.

59. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 37-58, где якорная последовательность содержит последовательность под SEQ ID NO: 81 или 82 или последовательность с не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением относительно нее.

60. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 37-58, где якорная последовательность содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 83 или 84 или последовательность с не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением относительно нее.

61. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 37-60, где якорная последовательность расположена в той же хромосоме, что и ген.

62. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 37-61, где якорная последовательность расположена выше гена-мишени (например, выше TSS или

выше промотора).

63. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 37-61, где якорная последовательность расположена ниже гена-мишени (например, ниже TSS или выше промотора).

64. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где связывание репрессора экспрессии с локусом гена-мишени снижает уровень экспрессии гена-мишени в клетке на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с экспрессией гена-мишени в отсутствие репрессора экспрессии.

65. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где связывание репрессора экспрессии с локусом гена-мишени значительно снижает уровень экспрессии гена-мишени в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 дня.

66. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-65, где первый и/или второй домен репрессора предусматривает ДНК-метилтрансферазу, гистонметилтрансферазу, гистондеацетилазу, гистондеметилазу или рекрутер гистон-модифицирующего комплекса.

67. Система репрессии экспрессии, содержащая
первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и первый домен репрессора, и

второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и второй домен репрессора,

где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с первой последовательностью ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается со второй последовательностью ДНК, отличающейся от первой последовательности ДНК, и

где первый домен репрессора отличается от второго домена репрессора.

68. Система репрессии экспрессии, содержащая
первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и первый домен репрессора, и

второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и второй домен репрессора,

где первый или второй домен репрессора предусматривает домен MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент,

где первый домен репрессора отличается от второго домена репрессора.

69. Система репрессии экспрессии согласно варианту осуществления 67 или 68, где первый репрессор экспрессии дополнительно содержит третий домен репрессора.

70. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-69, где второй репрессор экспрессии дополнительно содержит четвертый домен репрессора.

71. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-70, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с первой последовательностью ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается со второй последовательностью ДНК, отличающейся от первой последовательности ДНК.

72. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-70, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывают одну и ту же последовательность ДНК.

73. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-72,

где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает первую молекулу CRISPR/Cas, содержащую первый белок CRISPR/Cas и первую направляющую РНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает вторую молекулу CRISPR/Cas, содержащую второй белок CRISPR/Cas и вторую направляющую РНК.

74. Система репрессии экспрессии согласно варианту осуществления 73,

где первый белок CRISPR/Cas не связывается со второй направляющей РНК, например связывается с K_D , составляющей по меньшей мере 10, 20, 50, 100, 1000 или 10000 нМ, и второй белок CRISPR/Cas не связывается с первой направляющей РНК, например связывается с K_D , составляющей по меньшей мере 10, 20, 50, 100, 1000 или 10000 нМ.

75. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 73 или 74,

где первый белок CRISPR/Cas содержит другую аминокислотную последовательность, нежели второй белок CRISPR/Cas.

76. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-75, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

77. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-76, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает первую молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает вторую молекулу CRISPR/Cas, содержащую отличающийся белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

78. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 70-77, где первый, второй, третий или четвертый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью.

79. Система репрессии экспрессии согласно вариантам осуществления 70-78, где первый, второй, третий или четвертый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2 или функционального варианта или фрагмента любого из них, например домен SET любого из них.

80. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 70-79, где первый, второй, третий или четвертый домен репрессора характеризуется гистондеметилазной активностью (например, лизиндеметилазной активностью).

81. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 70-80, где первый, второй, третий или четвертый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66 (или функционального варианта или фрагмента любого из них).

82. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 70-81, где первый, второй, третий или четвертый домен репрессора характеризуется гистондеацетилазной активностью.

83. Система репрессии экспрессии согласно вариантам осуществления 70-82, где первый, второй, третий или четвертый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

84. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 70-83, где первый, второй, второй, третий или четвертый домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью.

85. Система репрессии экспрессии согласно вариантам осуществления 70-84, где первый, второй, третий или четвертый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L или функционального варианта или фрагмента любого из них.

86. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 70-85, где первый, второй, третий или четвертый домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции.

87. Система репрессии экспрессии согласно вариантам осуществления 70-86, где первый, второй, третий или четвертый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

88. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-87, где

первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2,

SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и

второй домен репрессора предусматривает другой белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

89. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 69-88, где

(i) первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и

(ii) третий домен репрессора предусматривает белок (например, другой белок), выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

90. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 69-89, где

(i) первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2,

SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент,

(ii) второй домен репрессора предусматривает белок (например, другой белок), выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и

(iii) третий домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

91. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 70-90, где

(i) первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент,

(ii) второй домен репрессора предусматривает белок (например, другой белок), выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1,

HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент,

(iii) третий домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и

(iv) четвертый домен репрессора предусматривает белок (например, другой белок), выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент,

92. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 70-91, где

(i) второй домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и

(ii) четвертый домен репрессора предусматривает белок (например, другой белок), выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1,

DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

93. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется гистондеметиلاзной активностью.

94. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется гистондеацетилазной активностью.

95. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью.

96. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется ДНК-деметилазной активностью.

97. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции.

98. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью (например, где значения гистонметилтрансферазной активности являются одинаковыми или отличаются друг от друга).

99. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистондеметилазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется гистондеацетилазной активностью.

100. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистондеметилазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью.

101. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистондеметилазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется ДНК-деметилазной активностью.

102. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется гистондеметилазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции.

113. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-92, где первый домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции, и второй домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции (например, где значения активности репрессора транскрипции являются одинаковыми или отличаются друг от друга).

114. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-113, где

первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из KRAB, домена SET (например, домена SET SETDB1, EZH2, G9A или SUV39H1), гистондеметилазы LSD1, FOG1 (например, N-концевых остатков FOG1), KAP1 или функционального варианта или фрагмента любого из них; и

второй домен репрессора предусматривает белок, выбранный из DNMT3A (например, человеческого DNMT3A), DNMT3B, DNMT3L, комплекса DNMT3A/3L, бактериального MQ1 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

115. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-114, где

первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из EZH2, G9A, SUV39H1, FOG1 или функционального варианта или фрагмента любого из них; и

второй домен репрессора предусматривает белок, выбранный из DNMT3A (например, человеческого DNMT3A), DNMT3B, DNMT3L, DNMT3A/3L, DNMT1, LSD1, FOG1, KRAB, HDAC8, бактериального MQ1 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

116. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-115, где

(i) первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KAP1, HDAC8, MQ1, DNMT1, DNMT3A, DNMT3a/3l, или функционального варианта или фрагмента любого из них; и

(ii) второй домен репрессора предусматривает белок, выбранный из KRAB, FOG1, G9A, LSD1, HDAC8, EZH2, DNMT3a/3l, MQ1, DNMT1, DNMT3A, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L или функционального варианта или фрагмента любого из них.

117. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-116, где первый домен репрессора предусматривает KRAB, и второй домен репрессора предусматривает DNMT3A (например, человеческий DNMT3A).

118. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-115, где первый домен репрессора предусматривает G9A или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора предусматривает KRAB или его

функциональный вариант или фрагмент.

119. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-118, где первый домен репрессора предусматривает LSD1 или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

120. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-119, где первый домен репрессора предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора предусматривает бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

121. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-120, где

первый домен репрессора предусматривает G9A или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает EZH2 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой N-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

122. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-120, где

первый домен репрессора предусматривает LSD1 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой C-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает G9A или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой N-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

123. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-120, где

первый домен репрессора предусматривает MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой C-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает HDAC8 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

124. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления

67-120, где

первый домен репрессора предусматривает LSD1 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой С-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает HDAC8 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой С-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

125. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-120, где

первый домен репрессора предусматривает LSD1 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой С-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает EZH2 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой N-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

126. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-120, где

первый домен репрессора предусматривает EZH2 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает HDAC8 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой С-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

127. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-120, где

первый домен репрессора предусматривает G9A или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает HDAC8 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой С-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

128. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления

69-120, где

первый домен репрессора предусматривает EZH2 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК,

третий домен репрессора предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно третий домен репрессора представляет собой C-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

129. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 69-120, где

первый домен репрессора предусматривает G9A или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК,

третий домен репрессора предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно третий домен репрессора представляет собой C-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

130. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 69-120, где

первый домен репрессора предусматривает EZH2 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК,

третий домен репрессора предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно третий домен репрессора представляет собой C-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает HDAC8 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на

ДНК.

131. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 69-120, где

первый домен репрессора предусматривает FOG1 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК,

третий домен репрессора предусматривает FOG1 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно третий домен репрессора представляет собой C-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, и

второй домен репрессора предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

132. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 69-120, где

первый домен репрессора предусматривает EZH2 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК,

третий домен репрессора предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно третий домен репрессора представляет собой C-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает LSD1 или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой C-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

133. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 69-130, где

первый домен репрессора предусматривает G9A или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно первый домен репрессора представляет собой N-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК,

третий домен репрессора предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, где необязательно третий домен репрессора представляет собой C-концевую часть первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК; и

второй домен репрессора предусматривает LSD1 или его функциональный вариант

или фрагмент, где необязательно второй домен репрессора представляет собой С-концевую часть второй функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

134. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-133, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, выбрана из эффекторной молекулы TAL, молекулы CRISPR/Cas, домена по типу "цинкового пальца», домена tetR, мегануклеазы или олигонуклеотида.

135. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-134, где вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, выбрана из эффекторной молекулы TAL, молекулы CRISPR/Cas, домена по типу "цинкового пальца», домена tetR, мегануклеазы или олигонуклеотида.

136. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-135, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas (например, который представляет собой или предусматривает белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них), и направляющую РНК.

137. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-136, где вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas (например, который представляет собой или предусматривает белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них), и направляющую РНК.

138. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-137, где

первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas, который представляет собой или предусматривает белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них, и

вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую отличающийся белок CRISPR/Cas, который представляет собой или предусматривает белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

139. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 135-138, где

первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 45 или 89, и

вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 45 или 89.

140. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления

135-138, где

первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46 или 88, и

вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46 или 88.

141. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-140, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с промоторной последовательностью или с ДНК, проксимальной по отношению к промоторной последовательности, например промоторной последовательности, функционально связанной с геном-мишенью.

142. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-141, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с энхансерной последовательностью или с ДНК, проксимальной по отношению к энхансерной последовательности, например энхансерной последовательности, которая влияет на уровень экспрессии и/или функционально связана с геном-мишенью.

143. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-142, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с геном-мишенью, например последовательностью, содержащейся между сайтом инициации и стоп-кодоном транскрипции гена-мишени.

144. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-143, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с сайтом инициации транскрипции гена-мишени.

145. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-144, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с интроном, например сайтом сплайсинга, ассоциированным с интроном, гена-мишени.

146. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-145, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с экзоном гена-мишени.

147. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-146, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с якорной последовательностью.

148. Система репрессии экспрессии согласно варианту осуществления 147, где якорная последовательность содержит последовательность под SEQ ID NO: 81 или 82 или последовательность с не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением относительно нее.

149. Система репрессии экспрессии согласно варианту осуществления 147, где якорная последовательность содержит последовательность под SEQ ID NO: 83 или 84 или

последовательность с не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением относительно нее.

150. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 147-149, где якорная последовательность расположена в той же хромосоме, что и ген.

151. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 147-149, где якорная последовательность расположена в другой хромосоме, нежели ген.

152. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 147-151, где якорная последовательность расположена выше гена-мишени (например, выше TSS или выше промотора).

153. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 148-151, где якорная последовательность расположена ниже гена-мишени (например, ниже TSS или выше промотора).

154. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-141, где первая последовательность ДНК представляет собой первый сайт, расположенный в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему, и вторая последовательность ДНК представляет собой второй сайт, расположенный в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему.

155. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-142, где первая последовательность ДНК расположена в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему, и вторая последовательность ДНК расположена в пределах энхансера, который влияет на уровень экспрессии или функционально связан с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему.

156. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-142, где первая последовательность ДНК расположена в пределах энхансера, который влияет на уровень экспрессии гена-мишени или функционально связан с ним, или проксимально по отношению к нему, и вторая последовательность ДНК расположена в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему.

157. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-141 или 143, где первая последовательность ДНК содержит сайт инициации транскрипции гена-мишени, и вторая последовательность ДНК расположена в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему.

158. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-140, 142 или 143, где первая последовательность ДНК содержит сайт инициации транскрипции гена-мишени, и вторая последовательность ДНК расположена в пределах энхансера, который влияет на уровень экспрессии или функционально связан с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему.

159. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления

67-141 или 143, где первая последовательность ДНК расположена в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему, и вторая последовательность ДНК представляет собой сайт инициации транскрипции гена-мишени.

160. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-140, 142 или 143, где первая последовательность ДНК расположена в пределах энхансера, который влияет на уровень экспрессии или функционально связан с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему, и вторая последовательность ДНК представляет собой сайт инициации транскрипции гена-мишени.

161. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-160, где расстояние между первой последовательностью ДНК и второй последовательностью ДНК составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 пар оснований или любую величину между этими значениями, например 20-500 пар оснований.

162. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-161, где расстояние между первой последовательностью ДНК и второй последовательностью ДНК составляет не более чем 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 пар оснований или любую величину между этими значениями, например 20-500 пар оснований.

163. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-162, где первая последовательность ДНК и вторая последовательность ДНК расположены в разных нуклеиновых кислотах, например в разных хромосомах.

164. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-163, где ген-мишень представляет собой β -2-микроглобулин, MYC, HSPA1B, GATA1, APOB, FOXP3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL6, CXCL7, и/или CXCL8.

165. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 73-164, где первая направляющая РНК содержит последовательность, специфическую в отношении первой последовательности ДНК, например комплементарную ей, и вторая направляющая РНК содержит последовательность, специфическую в отношении второй последовательности ДНК, например комплементарную ей.

166. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-165, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, не связывается в значительной степени со второй последовательностью ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, не связывается в значительной степени с первой

последовательностью ДНК.

167. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-166, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывает вторую последовательность ДНК с K_D , составляющей по меньшей мере 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 5000, 10000 или 100000 нМ, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с первой последовательностью ДНК с K_D , составляющей по меньшей мере 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 5000, 10000 или 100000 нМ.

168. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-167, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК снижает степень экспрессии гена-мишени в клетке, например гена-мишени, функционально связанного с первой последовательностью ДНК.

169. Система репрессии экспрессии согласно варианту осуществления 168, где уровень экспрессии снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в отсутствие первого репрессора экспрессии, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

170. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-169, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК в значительной степени снижает уровень экспрессии гена-мишени, например гена-мишени, функционально связанного с первой последовательностью ДНК, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

171. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-170, где связывание второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК снижает степень экспрессии гена-мишени в клетке, например гена-мишени, функционально связанного со второй последовательностью ДНК.

172. Система репрессии экспрессии согласно варианту осуществления 171, где уровень экспрессии снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в отсутствие второго репрессора экспрессии, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

173. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-172, где связывание второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК в значительной степени снижает уровень экспрессии гена-мишени, например гена-мишени, функционально связанного со второй последовательностью ДНК, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

174. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-173, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК снижает уровень экспрессии гена-мишени в клетке, например гена-мишени, функционально связанного с первой последовательностью ДНК и/или второй последовательностью ДНК.

175. Система репрессии экспрессии согласно варианту осуществления 174, где уровень экспрессии снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в отсутствие первого и второго репрессоров экспрессии, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

176. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-175, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК в значительной степени снижает уровень экспрессии гена-мишени, например гена-мишени, функционально связанного с первой последовательностью ДНК, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

177. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 174-176, где снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК больше, чем снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК или связывания второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК по отдельности.

178. Система репрессии экспрессии согласно варианту осуществления 177, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК снижает уровень экспрессии в 1,05x (т. е. в 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x или 100x больше, чем либо связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК, либо связывание второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК по отдельности, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

179. Система репрессии экспрессии согласно вариантам осуществления 174-178, где снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК сохраняется в течение более длительного периода времени (например, большего количества часов, дней или клеточных делений), чем снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с первой

последовательностью ДНК или связывания второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК по отдельности.

180. Система репрессии экспрессии согласно варианту осуществления 179, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК снижает уровень экспрессии в 1,05х (т. е. в 1,05 раза), 1,1х, 1,15х, 1,2х, 1,25х, 1,3х, 1,35х, 1,4х, 1,45х, 1,5х, 1,6х, 1,7х, 1,8х, 1,9х, 2х, 3х, 4х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 20х, 50х или 100х дольше (например, при измерении в часах, днях или клеточных делениях), чем либо связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК, либо связывание второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК по отдельности, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

181. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 174-180, где клетка делится со скоростью, составляющей не более чем один раз в 24, 36, 48, 60 или 72 часа (и необязательно по меньшей мере один раз в 24, 36, 48, 60 или 72 часа).

182. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 174-181, где клетка делится со скоростью, составляющей по меньшей мере один раз в 24, 36, 48, 60 или 72 часа (и необязательно не более чем один раз в 24, 36, 48, 60 или 72 часа).

183. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 174-182, где уровень экспрессии в значительной степени снижается в течение неопределенного периода времени (например, в течение периода времени, большего, чем может быть экспериментально измерено).

184. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-183, где

первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит белок CRISPR/Cas *S. pyogenes*, выбранный из таблицы 1, или его вариант (например, мутантный), например dCas9 *S. pyogenes*, например dCas9, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46; или белок CRISPR/Cas *S. aureus*, выбранный из таблицы 1, или его вариант (например, мутантный), например dCas9 *S. aureus*, например dCas9, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 88, и

вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит белок CRISPR/Cas *S. pyogenes*, выбранный из таблицы 1, или его вариант (например, мутантный), например dCas9 *S. pyogenes*, например, dCas9 содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46; или молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas *S. aureus*, выбранный из таблицы 1, или его вариант (например, мутантный), например dCas9 *S. aureus*, например dCas9, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 88.

185. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-184, где

первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas, например каталитически

неактивный dCas9, например dCas9, например dCas9, содержащий одну или несколько мутаций, выбранных из мутаций D10A, D839A, H840A и N863A; и

вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas, например каталитически неактивный dCas9, например dCas9, например dCas9, содержащий одну или несколько мутаций, выбранных из мутаций D10A, D839A, H840A и N863A.

186. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-185, где

первый репрессор экспрессии содержит первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, предусматривающую молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas *S. pyogenes*, выбранный из таблицы 1, или его вариант (например, мутантный), например dCas9 *S. pyogenes*, и первый домен репрессора, предусматривающий KRAB или его функциональный вариант или фрагмент; и

второй репрессор экспрессии содержит вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, предусматривающую молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas *S. aureus*, выбранный из таблицы 1, или его вариант (например, мутантный), например dCas9 *S. aureus*, и второй домен репрессора, предусматривающий бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

187. Полипептид, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК; и домен репрессора, предусматривающий бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

188. Полипептид, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК; первый домен репрессора, предусматривающий MQ1, DNMT1, DNMT3a/3l, KRAB, G9A, HDAC8, LSD1, EZH2, FOG1 или их функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора, предусматривающий MQ1, DNMT1, DNMT3a/3l, KRAB, G9A, HDAC8, LSD1, EZH2, FOG1 или их функциональный вариант или фрагмент.

189. Полипептид согласно варианту осуществления 88а, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, расположена между первым доменом репрессора и вторым доменом репрессора.

190. Нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии системы репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-189.

191. Нуклеиновая кислота, кодирующая второй репрессор экспрессии системы репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-189.

192. Нуклеиновая кислота, кодирующая систему репрессии экспрессии, например первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, согласно любому из вариантов осуществления 67-189.

193. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 190-192, которая представляет собой РНК, например mRNA.

194. Система репрессии экспрессии, содержащая первую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую первый репрессор экспрессии системы репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-189; и вторую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую второй репрессор экспрессии системы репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-189.
195. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид согласно любому из вариантов осуществления 187-189.
196. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 190-193 или 195, где нуклеиновая кислота предусматривает mRNA.
197. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.
198. Липидная наночастица, содержащая репрессор экспрессии, систему репрессии экспрессии, нуклеиновую кислоту, mRNA или вектор согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.
199. Липидная наночастица согласно варианту осуществления 198, содержащая ионизируемый липид, например катионный липид, например MC3, SSOP.
200. Липидная наночастица согласно варианту осуществления 198 или 199, дополнительно содержащая один или несколько из нейтральных липидов, ионизируемых аминокислотных липидов, биоразлагаемых алкиновых липидов, стероидов, фосфолипидов, полиненасыщенных липидов, структурных липидов (например, стеролов), PEG, холестерина или липидов, конъюгированных с полимером.
201. Реакционная смесь, содержащая репрессор экспрессии, систему репрессии экспрессии, нуклеиновую кислоту, вектор или липидную наночастицу согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.
202. Реакционная смесь согласно варианту осуществления 201, дополнительно содержащая клетку.
203. Клетка, содержащая репрессор экспрессии, систему репрессии экспрессии, нуклеиновую кислоту, mRNA, вектор или наночастицу согласно любому из вариантов осуществления 1-202.
204. Клетка согласно варианту осуществления 203, где клетка выбрана из гепатоцита, нейрональной клетки, эндотелиальной клетки, миоцита и лимфоцита.
205. Клетка, полученная с помощью способа, включающего обеспечение i) клетки и ii) репрессора экспрессии, системы репрессии экспрессии, полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора, липидной наночастицы или реакционной смеси согласно любому из вариантов осуществления 1-202; и приведение клетки в контакт с репрессором экспрессии, системой репрессии экспрессии, полипептидом, нуклеиновой кислотой, вектором, липидной наночастицей или

реакционной смесью.

206. Фармацевтическая композиция, содержащая репрессор экспрессии, систему репрессии экспрессии, нуклеиновую кислоту, полипептид, вектор, липидную наночастицу или реакционную смесь согласно любому из вариантов осуществления 1-202 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.

207. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-202, где первый репрессор экспрессии дополнительно содержит дополнительную функциональную группу, выбранную из меченой или контрольной функциональной группы, расщепляемой функциональной группы (например, расщепляемой функциональной группы, расположенной между функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, и доменом репрессора либо на N-, либо на С-концевой части полипептида), малой молекулы, транслоцирующей мембрану полипептида или функциональной группы фармакологического средства.

208. Система репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-202, где второй репрессор экспрессии дополнительно содержит дополнительную функциональную группу, выбранную из меченой или контрольной функциональной группы, расщепляемой функциональной группы (например, расщепляемой функциональной группы, расположенной между функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, и доменом репрессора либо на N-, либо на С-концевой части полипептида), малой молекулы, полипептида, перемещающегося через мембрану, или функциональной группы фармакологического средства.

209. Способ снижения уровня экспрессии геномной последовательности-мишени в клетке, включающий

обеспечение репрессора экспрессии, системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты, полипептида, вектора, липидной наночастицы, реакционной смеси, клетки или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-204 или 206; и

приведение клетки в контакт с репрессором экспрессии, системой репрессии экспрессии, нуклеиновой кислотой, полипептидом, вектором, липидной наночастицей, реакционной смесью, клеткой или фармацевтической композицией,

со снижением таким образом уровня экспрессии геномной последовательности-мишени.

210. Способ эпигенетического модифицирования геномной последовательности-мишени в клетке, включающий

обеспечение репрессора экспрессии, системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида, липидной наночастицы, реакционной смеси, клетки или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-204 или 206; и

приведение клетки в контакт с репрессором экспрессии, системой репрессии

экспрессии, нуклеиновой кислотой, вектором, полипептидом, липидной наночастицей, реакционной смесью, клеткой или фармацевтической композицией,

с модифицированием эпигенетически таким образом геномной последовательности-мишени.

211. Способ согласно вариантам осуществления 209 или 210, где геномная последовательность-мишень представляет собой

ген-мишень (например, сайт в пределах гена-мишени, например экзон, интрон или сайт сплайсинга), например ген, кодирующий β -2-микроглобулин (β 2M), ген, кодирующий MYC, ген, кодирующий HSPA1B, или ген, кодирующий GATA1,

элемент контроля транскрипции, функционально связанный с геном-мишенью, или якорную последовательность, проксимальную по отношению к гену-мишени или ассоциированную с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью.

212. Способ согласно варианту осуществления 211, где эпигенетическая модификация приводит к снижению уровня экспрессии гена-мишени.

213. Репрессор экспрессии, система репрессии экспрессии, клетка, фармацевтическая композиция, нуклеиновая кислота, вектор или способ согласно любому из вариантов осуществления 174-212, где клетка представляет собой клетку млекопитающего, например клетку человека.

214. Способ согласно варианту осуществления 213, где способ осуществляют *ex vivo* (например, в образце, взятом у субъекта) или *in vivo* (например, путем введения субъекту системы репрессии экспрессии).

215. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-214, где уровень экспрессии снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в остальном аналогичной клетки в отсутствие системы репрессии экспрессии.

216. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-214, где уровень экспрессии снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в остальном аналогичной клетки, которая не была приведена в контакт с системой репрессии экспрессии.

217. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-216, где уровень экспрессии снижается в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

218. Способ согласно любому из вариантов осуществления 215-217, где снижение уровня экспрессии предусматривает снижение уровня РНК, например mRNA, кодируемой геном-мишенью.

219. Способ согласно любому из вариантов осуществления 215-218, где снижение уровня экспрессии предусматривает снижение уровня белка, кодируемого геном-

мишенью.

220. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-219, где обеспечение предусматривает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, например вектором, кодирующим систему репрессии экспрессии, с клеткой, содержащей ген-мишень.

221. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-220, где нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии, расположена в первой молекуле нуклеиновой кислоты, и нуклеиновая кислота, кодирующая второй репрессор экспрессии, расположена во второй молекуле нуклеиновой кислоты.

222. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-221, где нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии, расположена в той же молекуле нуклеиновой кислоты, что и нуклеиновая кислота, кодирующая второй репрессор экспрессии.

223. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-222, где введение предусматривает приведение клетки в контакт с первой молекулой нуклеиновой кислоты и второй молекулой нуклеиновой кислоты совместно, например одновременно.

224. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-223, где введение предусматривает приведение клетки в контакт с первой молекулой нуклеиновой кислоты и второй молекулой нуклеиновой кислоты по отдельности, например последовательно.

225. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-224, где обеспечение предусматривает приведение клетки в контакт с везикулой, содержащей систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту, например вектор, кодирующий систему репрессии экспрессии.

226. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-225, где обеспечение предусматривает приведение клетки в контакт с липидной наночастицей (LNP), содержащей систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту, например вектор, кодирующий систему репрессии экспрессии.

227. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-226, где система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, и обеспечение предусматривает введение первого репрессора экспрессии и отдельно введение второго репрессора экспрессии.

228. Способ согласно любому из вариантов осуществления 209-227, где система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, и обеспечение предусматривает введение первого репрессора экспрессии и второго репрессора экспрессии совместно, например одновременно.

229. Способ лечения состояния, ассоциированного с чрезмерной экспрессией гена-мишени у субъекта, включающий

введение субъекту репрессора экспрессии, системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида, липидной наночастицы, реакционной смеси, клетки или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления

1-204 или 206-208,

с обеспечением таким образом лечения у субъекта состояния, ассоциированного с чрезмерной экспрессией гена-мишени.

230. Способ лечения состояния, ассоциированного с нарушением регуляции гена-мишени у субъекта, включающий

введение субъекту репрессора экспрессии, системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида, липидной наночастицы, реакционной смеси, клетки или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-204 или 206-208,

с обеспечением таким образом лечения у субъекта состояния, ассоциированного с нарушением регуляции гена-мишени.

231. Способ получения клетки, содержащей систему репрессии экспрессии, включающий

обеспечение репрессора экспрессии, системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-201 или 206-208; и

приведение клетки в контакт с репрессором экспрессии, системой репрессии экспрессии, нуклеиновой кислотой, вектором или фармацевтической композицией

с получением таким образом клетки, содержащей систему репрессии экспрессии.

232. Способ получения нуклеиновой кислоты, кодирующей систему репрессии экспрессии, включающий

обеспечение первой нуклеиновой кислоты, кодирующей первый репрессор экспрессии системы репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-186, 207 или 208;

обеспечение второй нуклеиновой кислоты, кодирующей второй репрессор экспрессии системы репрессии экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 67-186, 9207 или 208;

комбинирование (например, лигирование или рекомбинирование) первой нуклеиновой кислоты и второй нуклеиновой кислоты в единую молекулу нуклеиновой кислоты,

с получением таким образом нуклеиновой кислоты, кодирующей систему репрессии экспрессии.

233. Клетка, обработанная или полученная с помощью способа согласно любому из вариантов осуществления 209-228 или 230.

234. Клетка согласно варианту осуществления 233, где клетка не содержит систему репрессии экспрессии, например по меньшей мере один компонент (например, все компоненты) системы репрессии экспрессии.

235. Клетка согласно любому из вариантов осуществления 233 или 234, где уровень экспрессии гена-мишени снижается по сравнению с клеткой, которая не приводилась в контакт, не подвергалась обработке или не была получена с помощью

способа согласно любому из вариантов осуществления 209-228 или 230.

236. Набор, содержащий контейнер, содержащий композицию, содержащую репрессор экспрессии, систему репрессии экспрессии, одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих указанные репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, вектор, липидную наночастицу или фармацевтическую композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-208 и набор инструкций, предусматривающий по меньшей мере один способ модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена в пределах клетки с помощью указанной композиции.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Якорная последовательность: термин "якорная последовательность", используемый в данном документе, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, распознаваемой нуклеирующим средством, которая связывается в достаточной степени с образованием объединения, опосредованного якорной последовательностью, например комплекса. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит один или несколько CTCF-связывающих мотивов. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность не расположена в пределах области, кодирующей ген. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность расположена в межгенной области. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность не расположена ни в энхансере, ни в промоторе. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность расположена на расстоянии по меньшей мере 400 п. о., по меньшей мере 450 п. о., по меньшей мере 500 п. о., по меньшей мере 550 п. о., по меньшей мере 600 п. о., по меньшей мере 650 п. о., по меньшей мере 700 п. о., по меньшей мере 750 п. о. по меньшей мере 800 п. о., по меньшей мере 850 п. о., по меньшей мере 900 п. о., по меньшей мере 950 п. о. или по меньшей мере 1 т. п. о. от любого сайта инициации транскрипции. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность расположена в пределах области, которая не ассоциирована с геномным импринтингом, моноаллельной экспрессией и/или моноаллельными эпигенетическими маркерами. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность характеризуется одной или несколькими функциями, выбранными из связывания эндогенного нуклеирующего полипептида (например, CTCF), взаимодействия со второй якорной последовательностью с образованием объединения, опосредованного якорной последовательностью, или изоляции от энхансера, который находится за пределами объединения, опосредованного якорной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены технологии, с помощью которых можно специфически целенаправленно воздействовать на конкретные якорную последовательность или якорные последовательности без целенаправленного воздействия на другие якорные последовательности (например, последовательности, которые могут содержать мотив связывания нуклеирующего средства (например, CTCF) в другом контексте); такие целевые якорные последовательности могут называться "якорными последовательностями-мишенями". В некоторых вариантах осуществления

последовательность и/или активность якорной последовательности-мишени модулируются, в то время как последовательность и/или активность одной или нескольких других якорных последовательностей, которые могут присутствовать в одной и той же системе (например, в одной и той же клетке и/или в некоторых вариантах осуществления в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например в одной и той же хромосоме), что и целевая якорная последовательность не модулируются. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит или представляет собой мотив связывания нуклеирующего полипептида. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность расположена рядом с мотивом связывания нуклеирующего полипептида.

Объединение, опосредованное якорной последовательностью: термин "объединение, опосредованное якорной последовательностью", используемый в данном документе, относится к структуре ДНК, в некоторых случаях к комплексу, которые возникают и/или поддерживаются посредством физического взаимодействия или связывания по меньшей мере двух якорных последовательностей в ДНК с помощью одного или нескольких полипептидов, таких как нуклеирующие полипептиды, или одного или нескольких белков и/или структурной единицы нуклеиновой кислоты (такой как РНК или ДНК), которые связывают якорные последовательности с обеспечением пространственной близости и функциональной связи между якорными последовательностями (см., например, фигуру 1).

Ассоциированный с: два явления или две структурные единицы являются "ассоциированными" друг с другом, как этот термин используется в данном документе, если присутствие, уровень, форма и/или функция одного коррелируют с таковыми другого. Например, в некоторых вариантах осуществления конкретная структурная единица (например, полипептид, генетическая сигнатура, метаболит, микроб и т. д.) считается ассоциированным с конкретным заболеванием, нарушением или состоянием, если ее присутствие, уровень, форма и/или функция коррелируют с заболеваемостью и/или предрасположенностью к заболеванию, нарушению или состоянию (например, в соответствующей популяции). В некоторых вариантах осуществления две или более структурные единицы физически "ассоциированы" друг с другом, если они взаимодействуют, непосредственно или опосредованно таким образом, что они находятся и/или остаются в физической близости друг к другу. В некоторых вариантах осуществления две или более структурные единицы, которые являются физически ассоциированными друг с другом, ковалентно связаны друг с другом; в некоторых вариантах осуществления две или более структурные единицы, которые являются физически ассоциированными друг с другом, не являются ковалентно связанными друг с другом, но являются нековалентно ассоциированными, например, посредством водородных связей, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий, притяжения и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК является "ассоциированной с" геномным или транскрипционным комплексом-

мишенью, когда нуклеиновая кислота по меньшей мере частично находится в геномном или транскрипционном комплексе-мишени, и на экспрессию гена в последовательности ДНК влияет образование или разрушение геномного или транскрипционного комплекса-мишени.

Домен: используемый в данном документе термин "домен" относится к участку или части структурной единицы. В некоторых вариантах осуществления "домен" является ассоциированным с конкретной структурной и/или функциональной особенностью структурной единицы таким образом, что когда домен физически отделен от остальной части его исходной структурной единицы, он по сути или полностью сохраняет конкретную структурную и/или функциональную особенность. В качестве альтернативы или дополнительно в некоторых вариантах осуществления домен может представлять собой или содержать часть структурной единицы, которая при отделении от этой (исходной) структурной единицы и соединении с другой (реципиентной) структурной единицей по сути сохраняет для и/или передает реципиентной структурной единице одну или несколько структурных и/или функциональных особенностей, которые характеризуют ее в исходной структурной единице. В некоторых вариантах осуществления домен представляет собой или содержит участок или часть молекулы (например, малую молекулу, углевод, липид, нуклеиновую кислоту, полипептид и т. д.). В некоторых вариантах осуществления домен представляет собой или содержит участок полипептида. В некоторых таких вариантах осуществления домен характеризуется конкретным структурным элементом (например, конкретной аминокислотной последовательностью или мотивом последовательности, характером альфа-спирали, характером бета-листа, характером суперспирали, характером случайной спирали и т. д.) и/или конкретной функциональной особенностью (например, связывающей активностью, ферментативной активностью, активностью укладки, сигнальной активностью и т. д.).

Репрессор экспрессии: как используется в данном документе, термин "репрессор экспрессии" относится к средству или структурной единице с одним или несколькими функциональными свойствами, которые снижают уровень экспрессии гена-мишени в клетке и которые специфически связываются с последовательностью ДНК (например, последовательностью ДНК, ассоциированной с геном-мишенью, или элементом контроля транскрипции, функционально связанным с геном-мишенью). Репрессор экспрессии содержит по меньшей мере одну функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и по меньшей мере один домен репрессора.

Система репрессии экспрессии: как используется в данном документе, термин "система репрессии экспрессии" относится к множеству репрессоров экспрессии, которые снижают уровень экспрессии гена-мишени в клетке. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии (или нуклеиновые кислоты, кодирующие первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии) присутствуют совместно в одной композиции, смеси или

фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии (или нуклеиновые кислоты, кодирующие первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии) присутствуют в отдельных композициях или фармацевтических композициях. В некоторых вариантах осуществления первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии присутствуют в одной и той же клетке одновременно. В некоторых вариантах осуществления первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии не присутствуют в одной и той же клетке одновременно, например они присутствуют последовательно. Например, первый репрессор экспрессии может присутствовать в клетке в течение первого периода времени, а затем второй репрессор экспрессии может присутствовать в клетке в течение второго периода времени, при этом первый и второй периоды времени могут быть перекрывающимися или неперекрывающимися.

Геномный комплекс: как используется в данном документе, термин "геномный комплекс" представляет собой комплекс, который объединяет два элемента геномной последовательности, которые разнесены друг от друга в одной или нескольких хромосомах посредством взаимодействий между множеством белков и/или других компонентов (потенциально включая элементы геномной последовательности). В некоторых вариантах осуществления элементы геномной последовательности представляют собой якорные последовательности, с которыми связывается один или несколько белковых компонентов комплекса. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс может содержать объединение, опосредованное якорной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления элемент геномной последовательности может представлять собой или содержать CTCF-связывающий мотив, промотор и/или энхансер. В некоторых вариантах осуществления элемент геномной последовательности содержит по меньшей мере один или оба из промотора и/или регуляторного сайта (например, энхансер). В некоторых вариантах осуществления образование комплексов зарождается в элементе(-ах) геномной последовательности и/или путем связывания одного или нескольких белковых компонентов с элементом(-ами) геномной последовательности. Как будет понятно специалистам в данной области, в некоторых вариантах осуществления совместная локализация (например, объединение) геномных сайтов посредством образования комплекса изменяет топологию ДНК в элементе(-ах) геномной последовательности или рядом с ним(-и), в том числе в некоторых вариантах осуществления между ними. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс содержит объединение, опосредованное якорной последовательностью, которое содержит одну или несколько петель. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс, описанный в данном документе, зарождается нуклеирующим полипептидом, таким как, например, CTCF и/или когезин. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс, описанный в данном документе, может содержать, например, одно или несколько из CTCF, когезина, некодирующей РНК (например, eRNA), белков

механизма транскрипции (например, РНК-полимеразы, одного или нескольких факторов транскрипции, например выбранных из группы, состоящей из TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIЕ, TFIIF, TFIIH и т. д.), регуляторов транскрипции (например, медиатора, Р300, энхансер-связывающих белков, репрессор-связывающих белков, модификаторов гистонов и т. д.) и т. д. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс, описанный в данном документе, содержит один или несколько компонентов полипептида и/или один или несколько компонентов нуклеиновой кислоты (например, один или несколько компонентов РНК), которые в некоторых вариантах осуществления могут взаимодействовать друг с другом и/или с одним или несколькими элементами геномной последовательности (например, якорными последовательностями, промоторными последовательностями, регуляторными последовательностями (например, энхансерными последовательностями)) таким образом, чтобы ограничить отрезок геномной ДНК топологической конфигурацией (например, петель), которую он не принимает, когда комплекс не образуется.

Нуклеиновая кислота: как используется в данном документе, в самом широком смысле термин "нуклеиновая кислота" относится к любому соединению и/или веществу, которое включено или может быть включено в олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или вещество, которое включено или может быть включено в олигонуклеотидную цепь посредством фосфодиэфирной связи. Как будет понятно из контекста, в некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" относится к отдельному остатку нуклеиновой кислоты (например, нуклеотиду и/или нуклеозиду); в некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" относится к олигонуклеотидной цепи, содержащей отдельные остатки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" представляет собой или содержит РНК; в некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" представляет собой или содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких остатков природной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты отличается от нуклеиновой кислоты тем, что в нем не используется фосфодиэфирный каркас. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одной или нескольких "пептидных нуклеиновых кислот", которые известны из уровня техники и имеют пептидные связи вместо фосфодиэфирных связей в каркасе, рассматриваются в рамках настоящего изобретения. В качестве альтернативы или дополнительно в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет одну или несколько фосфотиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей вместо фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких природных

нуклеозидов (например, аденозина, тимидина, гуанозина, цитидина, уридина, дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксигуанозина и дезоксицитидина). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеозидов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролопиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, C5-пропинилцитидина, C5-пропинилуридина, 2-аминоаденозина, C5-бромуридина, C5-фторуридина, C5-йодуридина, C5-пропинилуридина, C5-пропинилцитидина, C5-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-дезааденозина, 7-дезагуанозина, 8-оксоаденозина, 8-оксогуанозина, 0(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинаций). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько модифицированных сахаров (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с природными нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько интронов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты получают посредством одного или нескольких из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), размножения в рекомбинантной клетке или системе и химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления длина нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или больше остатков. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью одонитевой; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере один элемент, который кодирует или представляет собой комплементарную последовательность последовательности, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота характеризуется ферментативной активностью.

Функционально связанный: как используется в данном документе, фраза "функционально связанный" относится к сопоставлению, в котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, дающей им возможность функционировать предполагаемым образом. Элемент контроля транскрипции, "функционально связанный" с функциональным элементом, например геном, является ассоциированным таким образом, что экспрессия и/или активность функционального элемента, например гена, достигаются в условиях, совместимых с элементом контроля транскрипции. В некоторых вариантах осуществления "функционально связанные" элементы контроля транскрипции являются

смежными (например, ковалентно связанными) с представляющими интерес кодирующими элементами, например генами; в некоторых вариантах осуществления функционально связанные элементы контроля транскрипции действуют в *транс*-положении или иным образом на расстоянии от представляющего интерес функционального элемента, например гена. В некоторых вариантах осуществления термин "функционально связанный" означает, что две последовательности нуклеиновой кислоты входят в состав одной и той же молекулы нуклеиновой кислоты. В дополнительном варианте осуществления термин "функционально связанный" может дополнительно означать, что две последовательности нуклеиновых кислот расположены проксимально по отношению друг к другу в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например в пределах 1000, 500, 100, 50 или 10 пар оснований друг от друга или непосредственно прилегают друг к другу.

Пептид, полипептид, белок: как используется в данном документе, термины "пептид", "полипептид" и "белок" относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями или посредством связей, отличных от пептидных связей. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и при этом не накладывается никаких ограничений на максимальное число аминокислот, которые могут составлять последовательность белка или пептида. Полипептиды предусматривают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями или посредством связей, отличных от пептидных связей. Как используется в данном документе, термин относится как к коротким цепям, которые в уровне техники также обычно называются, например, пептидами, олигопептидами и олигомерами, так и к более длинным цепям, которые в уровне техники обычно называются белками, которых существует много типов. *Домен репрессора*: как используется в данном документе, термин "домен репрессора" относится к домену с одним или несколькими функциональными свойствами, которые снижают уровень экспрессии гена-мишени в клетке при соответствующей локализации в ядре клетки. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или содержит полипептид и нуклеиновую кислоту. Функциональное свойство, ассоциированное с доменом репрессора, может непосредственно влиять на уровень экспрессии гена-мишени, например блокируя рекрутинг фактора транскрипции, который стимулировал бы экспрессию гена. Функциональное свойство, ассоциированное с доменом репрессора, может косвенно влиять на уровень экспрессии гена-мишени, например, путем введения эпигенетических модификаций или рекрутирования других факторов, которые вносят эпигенетические модификации, которые вызывают изменение в хромосомной топологии, которое подавляет экспрессию гена-мишени.

Специфическое связывание: как используется в данном документе, термин "специфическое связывание" относится к способности различать между возможными

партнерами по связыванию в окружающей среде, в которой должно происходить связывание. В некоторых вариантах осуществления связывающее средство, которое взаимодействует с одной конкретной мишенью, когда присутствуют другие потенциальные мишени, называется "*специфически связывающимся*" с мишенью, с которой оно взаимодействует. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают путем выявления или определения степени ассоциации между связывающим средством и его партнером; в некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают путем выявления или определения степени диссоциации комплекса связывающее средство-партнер. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают путем выявления или определения способности связывающего средства конкурировать с альтернативным взаимодействием между его партнером и другой структурной единицей. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают, выполняя такие выявления или определения в диапазоне концентраций.

По сути: как используется в данном документе, термин "по сути" относится к качественному состоянию проявления полной или почти полной меры или степени характеристики или свойства, представляющих интерес. Специалисту в данной области будет понятно, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или выполняются до завершения, или достигают, или избегают абсолютного результата. Таким образом, термин "по сути" может использоваться в некоторых вариантах осуществления в данном документе для отражения потенциальной неполноты, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

Симптомы уменьшаются: как используется в данном документе, фраза "симптомы уменьшаются" может использоваться, когда один или несколько симптомов конкретного заболевания, нарушения или состояния уменьшаются по величине (например, интенсивности, тяжести и т. д.) и/или частоте проявления. В некоторых вариантах осуществления задержка в появлении конкретного симптома считается одной из форм снижения частоты проявления этого симптома.

Целенаправленно воздействующий: средство или структурная единица считаются "целенаправленно воздействующими" на другое средство или структурную единицу в соответствии с настоящим изобретением, если они конкретно связываются с целевыми средством или структурной единицей в условиях, в которых они приходят в контакт друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, например, антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) целенаправленно воздействует на родственный ему эпитоп или антиген. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, имеющая конкретную последовательность, целенаправленно воздействует на нуклеиновую кислоту, по сути комплементарную последовательности.

Ген-мишень: как используется в данном документе, термин "ген-мишень" означает ген, который подвергается целенаправленному воздействию для модуляции, например экспрессии. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень является частью целевого

геномного комплекса (например, гена, который содержит по меньшей мере часть его геномной последовательности в виде части геномного комплекса-мишени, например внутри объединения, опосредованного якорной последовательностью), при этом данный геномный комплекс подвергается целенаправленному воздействию со стороны одного или нескольких модулирующих средств, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модуляция предусматривает подавление экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень модулируют путем приведения в контакт гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, с системой репрессии экспрессии, например репрессором(-ами) экспрессии, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень абберрантно экспрессируется (например, чрезмерно экспрессируется) в клетке, например клетке у субъекта (например, пациента).

Функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК: как используется в данном документе, в контексте репрессоров экспрессии термин "функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК" означает домен, который специфически связывается с последовательностью ДНК (например, последовательностью ДНК, ассоциированной с геном-мишенью или элементом контроля транскрипции, функционально связанным с геном-мишенью).

Терапевтическое средство: как используется в данном документе, фраза "терапевтическое средство" относится к средству, которое при введении субъекту оказывает терапевтическое эффект и/или вызывает требуемый биологический и/или фармакологический эффект. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой любое вещество, которое можно использовать для облегчения, уменьшения интенсивности, ослабления, подавления, предупреждения, отсрочки возникновения, уменьшения тяжести и/или снижения частоты возникновения одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство содержит систему репрессии экспрессии, например репрессор экспрессии, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую систему репрессии экспрессии, например репрессор экспрессии, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство предусматривает фармацевтическую композицию, описанную в данном документе.

Терапевтически эффективное количество: как используется в данном документе, термин "терапевтически эффективное количество" означает количество вещества (например, терапевтического средства, композиции и/или состава), которое вызывает требуемый биологический ответ при введении в виде части терапевтической схемы. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вещества представляет собой количество, достаточное при введении субъекту, страдающему заболеванием, нарушением и/или состоянием или предрасположенному к ним, для

лечения, постановки диагноза, предупреждения и/или отсрочки возникновения заболевания, нарушения и/или состояния. Как будет понятно специалистам средней квалификации в данной области, эффективное количество вещества может варьироваться в зависимости от таких факторов, как требуемая биологическая конечная точка(-и), вещество, подлежащее доставке, клетка- или ткань-мишень(-и) и т. д. Например, в некоторых вариантах осуществления эффективное количество соединения в составе для лечения заболевания, нарушения и/или состояния представляет собой количество, которое облегчает, уменьшает интенсивность, ослабляет, подавляет, предупреждает, отсрочивает возникновение, уменьшает тяжесть и/или снижает частоту возникновения одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вводят в виде однократной дозы; в некоторых вариантах осуществления требуется несколько стандартных доз для доставки терапевтически эффективного количества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Следующее подробное описание вариантов осуществления настоящего изобретения будет лучшим образом понято при прочтении вместе с прилагаемыми графическими материалами. С целью иллюстрации настоящего изобретения в графических материалах показаны варианты осуществления, которые представлены на примере в данном документе. Однако необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничено точной компоновкой и техническими средствами вариантов осуществления, показанных в графических материалах.

На фигуре 1 показано графическое представление генома, на котором показаны ключевые признаки области рядом с сайтом инициации транскрипции $\beta 2M$. RNAseq (верхний уровень) показывает экспрессию mRNA из гена $\beta 2M$. Вышеописанный положительный контроль (Cas9 с целенаправленным воздействием, GD-21547) показан зеленым цветом. Синие направляющие (GD-28228 и GD-28229) применяли для нацеливания Sp-dCas9-KRAB, а оранжевые направляющие (GD-28171, GD-28172 и GD-28173) применяли для нацеливания Sa-dCas9-MQ1 на CpG-островок в промоторной области гена $\beta 2M$ (второй уровень сверху). Направляющие выбрали на основе статуса гипометилирования промоторной области (изображено на дорожке метилирования CpG, нижний уровень), где метилирование проходит от 0 до 1 (от 0 до 100%), а более высокое метилирование изображено красными столбцами. Каждый столбец представляет сайт CpG.

На фигуре 2 показан график процентного изменения степени экспрессии β -2-микроглобулина (mRNA) в клетках HepG2 при обработке различными репрессорами экспрессии или контролями. Показанные уровни mRNA $\beta 2M$ относятся к необработанному контролю (серым). Точки показывают биологические повторы. Столбцы показывают среднее значение, а планки погрешностей указывают на стандартное отклонение. Номер ID направляющей показан на оси x. Образцы, обработанные с помощью dCas9, показаны пурпурным цветом; dCas9-KRAB - зеленым; sa-dCas9-MQ1 -

голубым; комбинация dCas9-KRAB и sa-dCas9-MQ1 - темно-синим. Положительный контроль с нокаутом $\beta 2M$ с помощью Cas9 показан оранжевым.

На фигуре 3 показан график процентного изменения mRNA $\beta 2M$ -микроглобулина при обработке различными репрессорами экспрессии или контролями через 72 часа (слева) и график данных проточной цитометрии уровней белка $\beta 2M$ -микроглобулина при обработке различными репрессорами экспрессии или контролями через 72 часа (справа). (Слева) Обработка с помощью эффекторов dCas9-KRAB (зеленым) и Sa-dCas9-MQ1 (голубым) по отдельности и совместно (темно-синим) приводит к снижению содержания mRNA $\beta 2M$ по сравнению с необработанными клетками (серым) и клетками, обработанными с помощью dCas9 (пурпурным). (Справа) С помощью проточной цитометрии выявили популяции со сниженной иммунофлуоресценцией $\beta 2M$ в клетках, обработанных с помощью dCas9-KRAB и Sa-dCas9-MQ1, по сравнению с необработанными клетками и клетками, обработанными с помощью dCas9.

На фигуре 4 показан график кратности изменения содержания mRNA $\beta 2M$ -микроглобулина при обработке различными репрессорами экспрессии или контролями в течение 22-дневного периода. В течение 22-дневного периода нетрансфицированные (синяя линия) и трансфицированные dCas9 (красная линия) клетки не изменяют экспрессию $\beta 2M$, тогда как клетки, трансфицированные dCas9-KRAB (зеленая линия), характеризуются репрессией $\beta 2M$ в первые дни после трансфекции, при этом максимальный эффект достигается в день 2, но репрессия теряется после дня 5. Клетки, трансфицированные SadCas9-MQ1 (фиолетовая линия), демонстрируют значительную реессию (не более 85% к дню 4), и при этом репрессия сохраняется, а затем медленно исчезает, как видно по линии, остающейся сразу под пунктирной линией на фигуре. Комбинированная трансфекция dCas9-KRAB+SadCas9-MQ1 (оранжевая линия) не давала никакой дополнительной репрессии по сравнению с той, которую уже наблюдали только для SadCas9 (фиолетовая линия).

На фигуре 5 показан график кратности изменения содержания mRNA $\beta 2M$ -микроглобулина при обработке различными репрессорами экспрессии или контролями в течение 18-дневного периода. В течение 18-дневного периода в необработанных клетках не изменяется экспрессия $\beta 2M$, тогда как клетки, трансфицированные dCas9-MQ1, dCas9-DNMT3a/3L (m), dCas9-DNMT3a/3L (hs), dCas9-DNMT1 и dCas9-DNMT3B, проявляют значительную реессию $\beta 2M$ после трансфекции.

На фигуре 6 показан график кратности изменения уровня экспрессии MYC в клетках K-562 при обработке отличающимися репрессорами экспрессии или системами репрессии экспрессии, целенаправленно воздействующими на сайт CTCF, расположенный выше гена MYC. Из данных видно, что по меньшей мере клетки, обработанные с помощью dCas9-DNMT3a/3L (h), dCas9-KRAB, FOG1-dCas9-FOG1, G9A-dCas9+EZH2-dCas9, dCas9-MQ1+EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-LSD1+G9A-dCas9, dCas9-MQ1+dCas9-HDAC8 и dCas9-MQ1+G9A-dCas9-KRAB, продемонстрировали реессию экспрессии MYC через 48 часов и/или 72 часа.

На фигуре 7 показан график кратности изменения экспрессии $\beta 2M$ в клетках K-562 при обработке отличающимися репрессорами экспрессии или системами репрессии экспрессии, которые целенаправленно воздействуют на область, расположенную выше промотора $\beta 2M$. Из данных видно, что по меньшей мере клетки, обработанные с помощью dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1, dCas9-MQ1, FOG1-dCas9- FOG1, G9A-dCas9-KRAB, dCas9-DNMT3a/3L (h), G9A-dCas9, EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-KRAB, EZH2-dCas9-KRAB+dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1+EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-LSD1+dCas9-HDAC8, dCas9-KRAB+FOG1-dCas9- FOG1, dCas9-MQ1+G9A-dCas9-KRAB, G9A-dCas9+EZH2-dCas9, dCas9-MQ1+EZH2-dCas9-KRAB и dCas9-MQ1+dCas9-HDAC8, продемонстрировали репрессию экспрессии $\beta 2M$ через 48 часов, 72 часа и/или 144 часа.

На фигуре 8 показан график кратности изменения экспрессии HSPA1B в клетках K-562 при обработке отличающимися репрессорами экспрессии или системами репрессии экспрессии, которые целенаправленно воздействуют на область, расположенную ниже промотора HSPA1B. Из данных видно, что по меньшей мере клетки, обработанные с помощью dCas9-HDAC8, EZH2-dCas9, dCas9-MQ1, dCas9-DNMT1, dCas9-DNMT3a/3L (h), dCas9-DNMT3a/3L (m), G9A-dCas9-KRAB, FOG1-dCas9-FOG1, G9A-dCas9, dCas9-KRAB, G9A-dCas9+dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1+G9A-dCas9-KRAB, dCas9-LSD1+EZH2-dCas9, G9A-dCas9+EZH2-dCas9, dCas9-LSD1+EZH2-dCas9-KRAB, EZH2-dCas9+dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1+dCas9-HDAC8, dCas9-MQ1+EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-MQ1+dCas9-HDAC8, G9A-dCas9-KRAB+EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-LSD1+G9A-dCas9 и dCas9-MQ1+G9A-dCas9-KRAB, продемонстрировали репрессию экспрессии гена HSPA1B через 48 часов, 72 часа и/или 144 часа.

На фигуре 9 показан график кратности изменения экспрессии GATA1 в клетках K-562 при обработке отличающимися репрессорами экспрессии или системами репрессии экспрессии. Из данных видно, что по меньшей мере клетки, обработанные с помощью dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1+dCas9-HDAC8, dCas9-MQ1+dCas9-HDAC8 и G9A-dCas9+dCas9-HDAC8, продемонстрировали репрессию экспрессии гена GATA1 через 48 часов, 72 часа и/или 144 часа.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Настоящее изобретение предусматривает технологии для модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени в клетке, например у субъекта или пациента, посредством использования репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит ДНК-связывающий фрагмент и по меньшей мере один домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит два домена репрессора. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит два идентичных домена репрессора. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит два неидентичных домена репрессора.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит

два или более репрессора экспрессии, при этом каждый содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и по меньшей мере один домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления функциональные группы, целенаправленно воздействующие на ДНК, целенаправленно воздействуют на две или больше отличающихся последовательностей ДНК (например, каждый репрессор экспрессии может целенаправленно воздействовать на отличающуюся последовательность ДНК). Без ограничения какой-либо теорией, использование системы репрессии экспрессии, содержащей репрессоры экспрессии, целенаправленно воздействующие на две или больше отличающихся последовательностей ДНК, может давать преимущество по сравнению с аналогичными системами, целенаправленно воздействующими на одиночную последовательность ДНК, поскольку отдельные репрессоры экспрессии не будут конкурировать друг с другом или будут меньше конкурировать друг с другом за связывания друг друга с их последовательностями ДНК-мишенями с достижением таким образом превосходной локализации различных функциональных свойств доменов репрессора. В некоторых вариантах осуществления может оказаться выгодным использовать две отличающиеся функциональные группы, целенаправленно воздействующие на ДНК, для точного целенаправленного воздействия двух отличающихся репрессоров на два отличающихся определенных местоположения, например первый репрессор экспрессии на первое местоположение выше сайта инициации транскрипции, и второй репрессор экспрессии на второе местоположение, содержащее сайт инициации транскрипции. В некоторых вариантах осуществления репрессоры экспрессии содержат два или более отличающихся доменов репрессора (например, каждый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, отличающийся от каждого другого репрессора экспрессии). Без ограничения какой-либо теорией, использование системы репрессии экспрессии, содержащей репрессоры экспрессии, которые содержат два или более доменов репрессора, может давать преимущество перед аналогичными системами, содержащими одиночный домен репрессора, вследствие синергетических эффектов в отношении экспрессии гена-мишени, ассоциированного с согласованным действием двух или более доменов репрессора.

Репрессоры экспрессии

Репрессоры экспрессии по настоящему изобретению могут содержать функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и по меньшей мере один домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше доменов репрессора. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии целенаправленно воздействует на две или более отличающихся последовательностей ДНК (например, на 1^{-ую} и 2^{-ую}, 3^{-ью}, 4^{-ую}, 5^{-ую}, 6^{-ую}, 7^{-ую}, 8^{-ую}, 9^{-ую}, 10^{-ую}, 11^{-ую}, 12^{-ую} и/или дальнейшую последовательность ДНК и необязательно на не более чем 20^{-ую}, 19^{-ую}, 18^{-ую}, 17^{-ую}, 16^{-ую}, 15^{-ую}, 14^{-ую}, 13^{-ую}, 12^{-ую}, 11^{-ую}, 10^{-ую}, 9^{-ую}, 8^{-ую}, 6^{-ую}, 5^{-ую}, 4^{-ую}, 3^{-ью} или 2^{-ую} последовательность ДНК). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу,

нацеливающуюся на ДНК, и множество доменов репрессора (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше доменов репрессора (и необязательно менее чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 домена репрессора)), каждый из которых может быть одинаковым или отличающимся от другого из более чем одного домена репрессора.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит первый домен репрессора и второй домен репрессора, где первый домен репрессора не идентичен второму домену репрессора. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит первый домен репрессора и второй домен репрессора, где первый домен репрессора идентичен второму домену репрессора. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, расположена между первым доменом репрессора и вторым доменом репрессора.

Репрессор экспрессии может содержать множество доменов репрессора, где каждый домен репрессора характеризуется отличающимся функциональным свойством по сравнению с другими доменами репрессора. Например, репрессор экспрессии может содержать два домена репрессора, где первый домен репрессора характеризуется функциональным свойством ДНК-метилазы, а второй домен репрессора характеризуется функциональным свойством репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит домены репрессора, функциональные свойства которых комплементарны друг другу в отношении снижения уровня экспрессии гена-мишени, где функциональные свойства совместно обеспечивают подавление экспрессии и необязательно не подавляют или незначительно подавляют экспрессию, когда присутствуют по отдельности. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит множество доменов репрессора, где каждый домен репрессора дополняет другие домены репрессора, каждый домен репрессора снижает уровень экспрессии гена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит комбинацию доменов репрессора, функциональные свойства которых действуют синергически друг с другом в отношении снижения уровня экспрессии гена-мишени. Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления эпигенетические модификации геномного локуса являются кумулятивными в том смысле, что множественные эпигенетические маркеры, активирующие транскрипцию (например, несколько отличающихся типов эпигенетических маркеров и/или более обширная маркировка данного типа) по отдельности, совместно подавляют экспрессию более эффективно, чем только отдельные модификации (например, вызывая большее снижение уровня экспрессии и/или более продолжительное снижение уровня экспрессии). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит множество доменов репрессора, где каждый домен репрессора действует синергически с другими доменами репрессора, например каждый домен репрессора снижает уровень экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии (содержащий

множество доменов репрессора, которые действуют синергически друг с другом) более эффективно подавляет экспрессию гена-мишени, чем репрессор экспрессии, содержащий отдельный домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, содержащий указанное множество доменов репрессора, в по меньшей мере 1,05х (т. е. в 1,05 раза), 1,1х, 1,15х, 1,2х, 1,25х, 1,3х, 1,35х, 1,4х, 1,45х, 1,5х, 1,55х, 1,6х, 1,65х, 1,7х, 1,75х, 1,8х, 1,85х, 1,9х, 1,95х, 2х, 3х, 4х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 20х, 30х, 40х, 50х, 60х, 70х, 80х, 90х или 100х эффективнее снижает уровень экспрессии гена-мишени, чем репрессор экспрессии, содержащий отдельный домен репрессора.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и домен репрессора, которые являются ковалентно связанными, например пептидной связью. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, и домен репрессора расположены в одной и той же полипептидной цепи, например соединены одной или несколькими пептидными связями и/или линкером. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии представляет собой или предусматривает слитую молекулу, например, содержащую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и домен репрессора, связанные пептидной связью и/или линкером. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу и множество эффекторных функциональных групп, где нацеливающаяся функциональная группа и множество эффекторных функциональных групп являются ковалентно связанными, например пептидными связями (например, нацеливающаяся функциональная группа и множество эффекторных функциональных групп все соединены серией ковалентных связей, хотя каждая отдельная функциональная группа может не иметь ковалентной связи с каждой другой эффекторной функциональной группой). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связана с N-концевой частью домена репрессора в той же полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связана с C-концевой частью домена репрессора в той же полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связана с C-концевой частью первого домена репрессора и связана с N-концевой частью второго домена репрессора в той же полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая расположена на N-концевой части домена репрессора в той же полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая расположена на C-концевой части домена репрессора в той же полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и домен репрессора, которые являются ковалентно связанными непептидной связью. В некоторых вариантах

осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, конъюгирована с доменом репрессора непептидной связью. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и множество доменов репрессора, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, и множество доменов репрессора являются ковалентно связанными, например пептидными связями (например, все из функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, и множества доменов репрессора соединены серией ковалентных связей, хотя каждые отдельные домен или функциональная группа может не иметь ковалентной связи с каждым другими доменом или функциональной группой).

В других вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и домен репрессора, которые являются нековалентно связанными, например которые являются нековалентно ассоциированными друг с другом. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая нековалентно связывается с доменом репрессора или наоборот. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и множество доменов репрессора, где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, и по меньшей мере один домен репрессора являются нековалентно связанными, например являются нековалентно ассоциированными друг с другом, и где функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, и по меньшей мере один другой домен репрессора являются ковалентно связанными, например пептидной связью.

Как правило, репрессор экспрессии, описанный в данном документе, связывает (например, посредством функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК) элемент геномной последовательности, проксимальной по отношению к гену-мишени и/или функционально связанной с ним. В некоторых вариантах осуществления связывание репрессора экспрессии с элементом геномной последовательности модулирует (например, снижает) уровень экспрессии гена-мишени. Например, связывание репрессора экспрессии, содержащего домен репрессора, который рекрутирует или подавляет рекрутинг компонентов механизма транскрипции с элементом геномной последовательности, может модулировать (например, снижать) уровень экспрессии гена-мишени. В качестве дополнительного примера связывание репрессора экспрессии, содержащего домен репрессора с ферментативной активностью (например, эпигенетической модифицирующей функциональной группы), может модулировать (например, снижать) уровень экспрессии гена-мишени) посредством локализованной ферментативной активности домена репрессора. В качестве дополнительного примера как связывание репрессора экспрессии с элементом геномной последовательности, так и локализованная ферментативная активность репрессора экспрессии могут способствовать возникающей в результате модуляции (например, снижению) уровня экспрессии гена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит домен

репрессора, где домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора предусматривает другой белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит первый домен репрессора, где домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора предусматривает другой белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора, где домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4,

SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора предусматривает другой белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и домен репрессора, где С-концевая часть домена репрессора, например домена репрессора, выбранного из EZH1, EZH2, G9A, SUV39H1, FOG1, SETDB1 или SETDB2, и N-концевая часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, являются ковалентно связанными. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и домен репрессора, где N-концевая часть домена репрессора, например домена репрессора, выбранного из LSD1, HDAC8, MQ1, DNMT1, DNMT3a/3L, FOG1 или KRAB, и С-концевая часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, являются ковалентно связанными. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, первый домен репрессора и второй домен репрессора, где С-концевая часть первого домена репрессора, например домена репрессора, выбранного из EZH1, EZH2, G9A, SUV39H1, FOG1, SETDB1 или SETDB2, и N-концевая часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, являются ковалентно связанными, и С-концевая часть функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, и N-концевая часть второго домена репрессора, например домена репрессора, выбранного из LSD1, HDAC8, MQ1, DNMT1, DNMT3a/3L, FOG1 или KRAB, являются ковалентно связанными.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, который раскрыт в данном документе, присутствует в композиции, фармацевтической композиции или смеси.

Хотя в некоторых из вариантов осуществления в данном документе описаны системы, содержащие множество репрессоров экспрессии, следует понимать, что настоящая заявка также предусматривает репрессоры экспрессии по отдельности, например, для применения в качестве отдельного средства или для применения в комбинации с общим вторым терапевтическим средством, которое нет необходимости подробно описывать в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, является частью системы репрессии экспрессии, например, которая описана ниже.

Системы репрессии экспрессии

Системы репрессии экспрессии по настоящему изобретению могут содержать два или более репрессоров экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше репрессоров экспрессии (и необязательно не более чем 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2). В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии целенаправленно воздействует на две или больше отличающихся последовательностей ДНК (например, на 1^{-ую} и 2^{-ую}, 3^{-ью}, 4^{-ую}, 5^{-ую}, 6^{-ую}, 7^{-ую}, 8^{-ую}, 9^{-ую}, 10^{-ую}, 11^{-ую}, 12^{-ую} и/или дальнейшую последовательность ДНК и необязательно на не более чем 20^{-ую}, 19^{-ую}, 18^{-ую}, 17^{-ую}, 16^{-ую}, 15^{-ую}, 14^{-ую}, 13^{-ую}, 12^{-ую}, 11^{-ую}, 10^{-ую}, 9^{-ую}, 8^{-ую}, 6^{-ую}, 5^{-ую}, 4^{-ую}, 3^{-ью} или 2^{-ую} последовательность ДНК). В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит множество репрессоров экспрессии, где каждый член из множества репрессоров экспрессии не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другим членом из множества репрессоров экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии не связывается выявляемым образом, например не связывается, со вторым репрессором экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии по настоящему изобретению содержит два или больше репрессоров экспрессии, где репрессоры экспрессии присутствуют совместно в композиции, фармацевтической композиции или смеси. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии по настоящему изобретению содержит два или больше репрессоров экспрессии, где один или более репрессоров экспрессии не смешиваются с по меньшей мере одним другим репрессором экспрессии. Например, система репрессии экспрессии может содержать первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где присутствие первого репрессора экспрессии в ядре клетки не перекрывается с присутствием второго репрессора экспрессии в ядре той же клетки, где система репрессии экспрессии обеспечивает снижение уровня экспрессии гена-мишени за счет случаев неперекрывающегося присутствия первого и второго репрессоров экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления каждый из репрессоров экспрессии системы репрессии экспрессии содержит отличающуюся функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК (например, каждый из первого, второго, третьего или дополнительных репрессоров экспрессии содержит отличающиеся друг от друга функциональные группы, целенаправленно воздействующие на ДНК). Например, система репрессии экспрессии может содержать первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК (например, молекулу Cas9, эффекторную молекулу TAL или

домен по типу "Zn-пальца"), и второй репрессор экспрессии содержит вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК (например, молекулу Cas9, эффекторную молекулу TAL или домен по типу "Zn-пальца"), отличающуюся от первой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК. В некоторых вариантах осуществления "отличающийся" может означать содержащий различные типы функциональных групп, целенаправленно воздействующих на ДНК, например первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу Cas9, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает эффекторную молекулу TAL. В других вариантах осуществления "отличающийся" может означать содержащий различные варианты одного и того же типа функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, например первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает первую молекулу Cas9 (например, из первого вида), и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает вторую молекулу Cas9 (например, из второго вида). В одном варианте осуществления, когда система репрессии экспрессии содержит две или больше функциональных групп, целенаправленно воздействующих на ДНК, одного и того же типа, например две или больше молекулы Cas9, тогда функциональные группы, целенаправленно воздействующие на ДНК, специфически связывают две или больше различных последовательностей ДНК. Например, в системе репрессии экспрессии, содержащей две или больше молекул Cas9, две или больше молекул Cas9 могут быть выбраны или изменены таким образом, что они в значительной степени связывают только gRNA, соответствующую их последовательности ДНК-мишени (например, и в значительной степени не связывают gRNA, соответствующую мишени для другой молекулы Cas9). В дополнительном примере в системе репрессии экспрессии, содержащей две или больше эффекторных молекул TAL, две или больше эффекторных молекул TAL могут быть выбраны или изменены таким образом, чтобы они в значительной степени связывают только свою последовательность ДНК-мишень (например, и в значительной степени не связывают последовательность ДНК-мишень для другой эффекторной молекулы TAL).

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит три или больше репрессоров экспрессии, и при этом два или больше репрессоров экспрессии содержат одну и ту же функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. Например, система репрессии экспрессии может содержать три репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и третий репрессор экспрессии содержит вторую отличающуюся функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В качестве дополнительного примера система репрессии экспрессии может содержать четыре репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, а третий и четвертый репрессоры экспрессии содержат вторую отличающуюся функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В качестве дополнительного примера система репрессии

экспрессии может содержать пять репрессоров экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, оба из третьего и четвертого репрессоров экспрессии содержат вторую отличающуюся функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и пятый репрессор экспрессии содержит третью отличающуюся функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. Как описано выше, отличающиеся может означать, что они содержат различные типы функциональных групп, целенаправленно воздействующих на ДНК, или содержат различные варианты одного и того же типа функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

В некоторых вариантах осуществления каждый из репрессоров экспрессии системы репрессии экспрессии связывается с отличающейся последовательностью ДНК (например, каждый из первого, второго, третьего или дополнительных репрессоров экспрессии связывают последовательности ДНК, которые отличаются друг от друга). Например, система репрессии экспрессии может содержать первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии связывается с первой последовательностью ДНК, и второй репрессор экспрессии связывается со второй последовательностью ДНК. В некоторых вариантах осуществления отличающаяся может означать то, что существует по меньшей мере одно положение, которое является неидентичным между последовательностью ДНК, связанной одним репрессором экспрессии, и последовательностью ДНК, связанной другим репрессором экспрессии, или что присутствует по меньшей мере одно положение в последовательности ДНК, связанной одним репрессором экспрессии, которое не присутствует в последовательности ДНК, связанной другим репрессором экспрессии. Например, первый репрессор экспрессии может связываться с первой иллюстративной последовательностью ДНК 5'-ATGATTGGATTТА-3' (SEQ ID NO: 97), и второй репрессор экспрессии может связываться со второй иллюстративной последовательностью ДНК 5'-TGATTGGATTТАG-3' (SEQ ID NO: 98); в указанном примере первая и вторая иллюстративные последовательности ДНК являются отличающимися. В качестве дополнительного примера первый репрессор экспрессии может связываться с первой иллюстративной последовательностью ДНК 5'-ATGATTgGATTТА-3' (SEQ ID NO: 99), и второй репрессор экспрессии может связываться со второй иллюстративной последовательностью ДНК 5'-ATGATTcGATTТА-3' (SEQ ID NO: 100); в указанном примере первая и вторая иллюстративные последовательности ДНК являются отличающимися. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность ДНК может быть расположена в первой нити геномной ДНК, и вторая последовательность ДНК может быть расположена во второй нити геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность ДНК может быть расположена в той же цепи геномной ДНК, что и вторая последовательность ДНК.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит три или больше репрессоров экспрессии, и при этом два или больше репрессоров

экспрессии связывают одну и ту же последовательность ДНК. Например, система репрессии экспрессии может содержать три репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии связывают первую последовательность ДНК, и третий репрессор экспрессии связывает вторую отличающуюся последовательность ДНК. В качестве дополнительного примера система репрессии экспрессии может содержать четыре репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии связывают первую последовательность ДНК, а оба из третьего и четвертого репрессоров экспрессии связывают вторую последовательность ДНК. В качестве дополнительного примера система репрессии экспрессии может содержать пять репрессоров экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии связывают первую последовательность ДНК, оба из третьего и четвертого репрессоров экспрессии связывают вторую последовательность ДНК, и пятый репрессор экспрессии связывает третью последовательность ДНК. Как описано выше, отличающаяся может означать то, что существует по меньшей мере одно положение, которое является неидентичным между последовательностью ДНК, связанной одним репрессором экспрессии, и последовательностью ДНК, связанной другим репрессором экспрессии, или что присутствует по меньшей мере одно положение в последовательности ДНК, связанной одним репрессором экспрессии, которое не присутствует в последовательности ДНК, связанной другим репрессором экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше (например, два) репрессоров экспрессии, и множество (например, два) репрессоров экспрессии содержат функциональные группы, целенаправленно воздействующие на ДНК, которые связываются с отличающимися последовательностями ДНК. В таких вариантах осуществления первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, может связываться с первой последовательностью ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, может связываться со второй последовательностью ДНК, где первая и вторая последовательности ДНК являются отличающимися и не перекрываются. В некоторых таких вариантах осуществления первая последовательность ДНК отделена от второй последовательности ДНК по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 парами оснований (и необязательно не более чем 500, 400, 300, 200, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55 или 50 парами оснований). В некоторых таких вариантах осуществления первая последовательность ДНК отделена от второй последовательности ДНК не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 парами оснований (и необязательно никакими парами оснований, например первая и вторая последовательности непосредственно прилегают друг к другу).

В некоторых вариантах осуществления каждый из репрессоров экспрессии системы репрессии экспрессии содержит отличающийся домен репрессора (например, каждый из первого, второго, третьего или дополнительных репрессоров экспрессии

содержит отличающийся друг от друга домен репрессора). Например, система репрессии экспрессии может содержать первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит первый домен репрессора (например, предусматривающий гистонметилтрансферазу или ее функциональный фрагмент), и второй репрессор экспрессии содержит второй домен репрессора (например, предусматривающий ДНК-метилтрансферазу или ее функциональный фрагмент), отличающийся от первого домена репрессора. В некоторых вариантах осуществления "отличающийся" может означать, что он содержит различные типы домена репрессора, например первый домен репрессора предусматривает гистонметилтрансферазу, и второй домен репрессора предусматривает ДНК-метилтрансферазу, или первый домен репрессора предусматривает гистонметилтрансферазу, и второй домен репрессора предусматривает низкомолекулярный ингибитор фермента. В других вариантах осуществления отличающиеся может означать, что они содержат различные варианты одного и того же типа домена репрессора, например первый домен репрессора предусматривает первую гистонметилтрансферазу (например, имеющую первые сайт специфичности или аминокислотную последовательность), и второй домен репрессора предусматривает вторую гистонметилтрансферазу (например, имеющую вторые сайт специфичности или аминокислотную последовательность).

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первый домен репрессора, и второй репрессор экспрессии, содержащий второй домен репрессора, где первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора предусматривает отличающийся белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первый домен репрессора, и второй репрессор

экспрессии, содержащий второй домен репрессора, где первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, второй домен репрессора предусматривает отличающийся белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и третий домен репрессора предусматривает отличающийся белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит (i) первый репрессор экспрессии, содержащий первый домен репрессора и третий домен репрессора, и (ii) второй репрессор экспрессии, содержащий второй домен репрессора и необязательно четвертый домен репрессора, где первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, второй домен репрессора предусматривает отличающийся белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8,

SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, третий домен репрессора предусматривает отличающийся белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и четвертый домен репрессора предусматривает отличающийся белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью (например, SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2 или функциональный вариант или фрагмент любого из них, например домен SET любого из них), и второй домен репрессора характеризуется гистондеметиلاзной активностью (например, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66 или функциональный вариант или фрагмент любого из них). В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется гистондеацетилазной активностью (например, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9 или функциональный вариант или фрагмент любого из них). В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется гистонметилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью (например, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2,

[illegible]

вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется ДНК-деметиلاзной активностью. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется отличающейся ДНК-метилтрансферазной активностью. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется такой же ДНК-метилтрансферазной активностью. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется ДНК-деметилазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется ДНК-деметилазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется отличающейся ДНК-деметилазной активностью. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется ДНК-деметилазной активностью, и второй домен репрессора характеризуется такой же ДНК-деметилазной активностью. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции, и второй домен репрессора характеризуется отличающейся активностью репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции, и второй домен репрессора характеризуется такой же активностью репрессора транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит три или больше репрессоров экспрессии, и при этом два или больше репрессоров экспрессии содержат одну и ту же функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. Например, система репрессии экспрессии может содержать три репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первый домен репрессора, и третий репрессор экспрессии содержит второй отличающийся домен репрессора. В качестве дополнительного примера система репрессии экспрессии может содержать четыре репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первый домен репрессора, а третий и четвертый репрессоры экспрессии содержат второй отличающийся домен репрессора. В качестве дополнительного примера система репрессии экспрессии может содержать пять репрессоров экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первый домен репрессора, оба из третьего и четвертого репрессоров экспрессии содержат второй отличающийся домен репрессора, и пятый репрессор экспрессии содержит третий отличающийся домен репрессора. Как описано выше, отличающиеся может означать, что они содержат отличающиеся типы доменов репрессора или содержат различные варианты одного и того же типа домена репрессора.

В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистонметилтрансферазной активностью (например, SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2 или функциональный вариант или фрагмент любого из них, например домен SET любого из них), и другой домен репрессора характеризуется гистондеметиلاзной активностью (например, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66 или функциональный вариант или фрагмент любого из них). В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистонметилтрансферазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется гистондеацетилазной активностью (например, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9 или функциональный вариант или фрагмент любого из них). В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистонметилтрансферазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью (например, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L или функциональный вариант или фрагмент любого из них). В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистонметилтрансферазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется ДНК-деметилазной активностью. В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистонметилтрансферазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции (например, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функциональный вариант или фрагмент любого из них). В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистонметилтрансферазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется отличающейся гистонметилтрансферазной активностью. В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистонметилтрансферазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется такой же гистонметилтрансферазной активностью. В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистондеметилазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется гистондеацетилазной активностью. В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистондеметилазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется ДНК-метилтрансферазной активностью. В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистондеметилазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется ДНК-деметилазной активностью. В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистондеметилазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется активностью репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления два домена репрессора характеризуются гистондеметилазной активностью, и другой домен репрессора характеризуется отличающейся

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления два или больше (например, все) репрессоров экспрессии системы репрессии экспрессии являются нековалентно

ассоциированными друг с другом, например каждый репрессор экспрессии является нековалентно ассоциированным с каким-либо другим репрессором экспрессии. В другом варианте осуществления два или больше репрессоров экспрессии системы репрессии экспрессии являются ковалентно ассоциированными друг с другом. В одном варианте осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, расположенные в одном и том же полипептиде, например, в виде слитой молекулы, например соединенные пептидной связью и необязательно линкером. В одном варианте осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, которые соединены непептидной связью, например конъюгированы друг с другом.

Линкеры

Репрессор экспрессии или система репрессии экспрессии, раскрытые в данном документе, могут содержать один или несколько линкеров. Линкер может соединять функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, с доменом репрессора, домен репрессора с другим доменом репрессора или функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, с другой функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК. Линкер может представлять собой химическую связь, например одну или несколько ковалентных связей или нековалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер является ковалентным. В некоторых вариантах осуществления линкер является нековалентным. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. Такой линкер может иметь длину, составляющую 2-30, 5-30, 10-30, 15-30, 20-30, 25-30, 2-25, 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 2-20, 5-20, 10-20, 15-20, 2-15, 5-15, 10-15, 2-10, 5-10 или 2-5 аминокислот, или большую чем 2, 5, 10, 15, 20, 25 или 30 аминокислот или равную указанным значениям (и необязательно длину не более 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 или 5 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления линкер можно применять для отделения первых домена или функциональной группы от вторых домена или функциональной группы, например функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, от домена репрессора. В некоторых вариантах осуществления, например, линкер может быть расположен между функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, и доменом репрессора, например, с обеспечением молекулярной гибкости вторичных и третичных структур. Линкер может предусматривать гибкие, жесткие и/или расщепляемые линкеры, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит по меньшей мере одну аминокислоту глицин, аланин и серин с обеспечением гибкости. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гидрофобный линкер, такой как в том числе отрицательно заряженную сульфонатную группу, полиэтиленгликольную группу (PEG) или пиродифосфатную сложноэфирную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым с селективным высвобождением функциональной группы (например, полипептида) из модулирующего средства, но достаточно стабильным для предупреждения преждевременного расщепления.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из функциональных групп и/или доменов репрессора экспрессии, описанных в данном документе, связаны с одним или несколькими линкерами. В некоторых вариантах осуществления репрессия экспрессии может предусматривать линкер, расположенный между функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, и доменом репрессора. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии может содержать первый линкер, расположенный между функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, и первым доменом репрессора, и второй линкер, расположенный между функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, и вторым доменом репрессора. В некоторых вариантах осуществления первый и второй линкеры могут быть идентичными. В некоторых вариантах осуществления первый и второй линкеры могут быть отличающимися.

Как будет известно специалисту в данной области, обычно используемые гибкие линкеры имеют последовательности, состоящие в основном из отрезков остатков Gly и Ser ("GS"-линкер). Гибкие линкеры могут быть применимы для соединения доменов/функциональных групп, которые требуют определенной степени подвижности или взаимодействия, и могут содержать небольшие неполярные (например, Gly) или полярные (например, Ser или Thr) аминокислоты. Включение Ser или Thr также может обеспечивать поддержание стабильности линкера в водных растворах благодаря образованию водородных связей с молекулами воды и, следовательно, уменьшение неблагоприятных взаимодействий между линкером и функциональными группами/доменами.

Жесткие линкеры применимы для сохранения фиксированного расстояния между доменами/функциональными группами и поддержания их независимых функций. Жесткие линкеры также могут быть применимы, если пространственное разделение доменов является критически важным для сохранения стабильности или биологической активности одного или нескольких компонентов в продукте слияния. Жесткие линкеры могут иметь альфа-спиральную структуру или Pro-богатую последовательность (XP)_n, при этом X обозначает любую аминокислоту, предпочтительно Ala, Lys или Glu.

Расщепляемые линкеры могут высвобождать свободные функциональные домены *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления линкеры могут расщепляться в специфических условиях, таких как присутствие восстанавливающих реагентов или протеаз. В расщепляемых *in vivo* линкерах может использоваться обратимая природа дисульфидной связи. Один пример включает в себя последовательность, чувствительную к тромбину (например, PRS), между двумя остатками Cys. Обработка тромбином CPRSC *in vitro* приводит к расщеплению чувствительной к тромбину последовательности, тогда как обратимая дисульфидная связь остается интактной. Такие линкеры известны и описаны, например, в Chen et al., 2013. Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv Drug Deliv. Rev. 65(10): 1357-1369. Расщепление линкеров *in vivo* в продуктах слияния может также осуществляться протеазами, которые экспрессируются *in*

vivo при определенных условиях в конкретных клетках или тканях или ограничены определенными клеточными компартментами. Специфичность многих протеаз обеспечивает более медленное расщепление линкера в ограниченных компартментах.

Примеры молекул, подходящих для использования в линкерах, описанных в данном документе, включают отрицательно заряженную сульфонатную группу; липиды, такие как поли(--CH₂--)углеводородные цепи, такие как полиэтиленгликолевая (PEG) группа, их ненасыщенные варианты, их гидроксильные варианты, их амидированные или иным образом N-содержащие варианты; неуглеродные линкеры; углеводные линкеры; сложные фосфодиэфирные линкеры или другие молекулы, способные ковалентно связывать два или более компонентов репрессора экспрессии. Также включены нековалентные линкеры, такие как гидрофобные липидные глобулы, с которыми связывается полипептид, например, посредством гидрофобной области полипептида или гидрофобного удлинения полипептида, такого как ряд остатков, богатый лейцином, изолейцином, валином или возможно также аланином, фенилаланином или даже тирозином, метионином, глицином или другим гидрофобным остатком. Компоненты репрессора экспрессии могут быть связаны с использованием химического взаимодействия зарядов, так что положительно заряженный компонент репрессора экспрессии связан с отрицательным заряженным другим компонентом.

Нуклеиновые кислоты

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие репрессор экспрессии, систему репрессии экспрессии, функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и/или домен репрессора, которые описаны в данном документе. Квалифицированному специалисту известно, что последовательности нуклеиновых кислот РНК являются идентичными соответствующим последовательностям ДНК, за исключением того, что обычно тимин (Т) заменен урацилом (U). Следует понимать, что когда нуклеотидная последовательность представлена последовательностью ДНК (например, содержащей А, Т, G, C), тогда настоящее изобретение также предусматривает соответствующую последовательность РНК (например, содержащую А, U, G, C) в которой "U" заменяет "Т". Для описания полинуклеотидных последовательностей в данном документе используются общепринятые обозначения: левый конец одонитевой полинуклеотидной последовательности является 5'-концом; левостороннее направление двухнитевой полинуклеотидной последовательности называется 5'-направлением.

Специалистам в данной области должно будет понятно, что вследствие вырожденности генетического кода может быть получено множество нуклеотидных последовательностей, кодирующих репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и/или домен репрессора, которые описаны в данном документе, некоторые из которых имеют сходство, например 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность, с последовательностями нуклеиновой кислоты, раскрытыми в данном документе. Например, все из кодонов AGA, AGG, CGA, CGC, CGG и CGU

кодируют аминокислоту аргинин. Таким образом, в каждом положении в молекулах нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, где аргинин определяется кодоном, этот кодон может быть изменен на любой из описанных выше соответствующих кодонов без изменения кодируемого полипептида.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и/или один или несколько доменов репрессора, могут представлять собой часть или всю кодирующую кодон-оптимизированную область, оптимизированную в соответствии с использованием кодонов у млекопитающих, например человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и/или один или несколько доменов репрессора, является кодон-оптимизированной для повышения уровня экспрессии белка и/или увеличения продолжительности экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления уровень белка, продуцируемого кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% выше по сравнению с уровнями белка при кодировании последовательностью нуклеиновой кислоты, которая не является кодон-оптимизированной.

В одном аспекте настоящее изобретение направлено на полипептид, содержащий одну или несколько (например, одну) функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и один или несколько доменов репрессора, например, где домен репрессора представляет собой или предусматривает MQ1, например бактериальный MQ1, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления MQ1 представляет собой MQ1 *Spiroplasma monobiae*, например MQ1 из штамма ATCC 33825 и/или соответствующий записи в Uniprot ID P15840. В некоторых вариантах осуществления домен MQ1 репрессора кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 47 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

AGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTTCGAGGCCTTCGCC
GGCATCGGCGCCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGA
TCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACA
ACAACCTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGAC
TACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTA
CTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGA
GCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCCTGAAG
AACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATC

CAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCG
 AGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAG
 AACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAGTGGAAGC
 AGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGAC
 TTCGGCAGCAGCCAGGCCCGCGCGGGTGTTCATGATCAGCACCTGAACGAGTT
 CGTGGAGCTGCCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAAC
 AAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGA
 GTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGT
 TCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCC
 AGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGA
 ACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTG
 AACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAACAGCAT
 CAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGC (SEQ ID NO: 47)

В некоторых вариантах осуществления MQ1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления MQ1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен, описанный в данном документе, содержит SEQ ID NO: 90 или 57 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

MSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIH
 IHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLS
 EKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALD
 STEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARR
 RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKAS
 LIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKR
 VNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIDKIGG (SEQ ID NO: 90)

SKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIH
 NNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEK
 EGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDST
 EKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRR
 VFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLI
 GYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRV
 NEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIDKIGG (SEQ ID NO: 57)

В некоторых вариантах осуществления MQ1 для применения в полипептиде, описанном в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с MQ1 дикого типа (например, под SEQ ID NO: 90 или SEQ ID NO: 57). В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с MQ1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1

предусматривает замену K297P. В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замену N299C. В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замену E301Y. В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замену Q147L (например, и характеризуется сниженным уровнем ДНК-метилтрансферазной активности по сравнению с MQ1 дикого типа). В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замены K297P, N299C и E301Y (например, и характеризуется сниженной аффинностью связывания ДНК по сравнению с MQ1 дикого типа). В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замены Q147L, K297P, N299C и E301Y (например, и характеризуется сниженными уровнем ДНК-метилтрансферазной активности и аффинностью связывания ДНК по сравнению с MQ1 дикого типа). В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит один или несколько линкеров, описанных в данном документе, например, соединяющих функциональную группу/домен с другими функциональной группой/доменом. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, например содержащую белок CRISPR/Cas, например белок dCas9. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает MQ1, и функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, например содержащую белок CRISPR/Cas, например белок dCas9. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит дополнительную функциональную группу, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид обеспечивает снижение уровня экспрессии гена-мишени (например, гена-мишени, описанного в данном документе). В некоторых вариантах осуществления полипептид можно применять в способах модулирования, например снижения, уровня экспрессии генов, способах лечения состояния или способах эпигенетического модифицирования гена-мишени или элемента контроля транскрипции, описанных в данном документе, например, вместо системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, предусматривающий MQ1, например бактериальный MQ1, или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) целенаправленно действующих функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает крупнопель-ассоциированный блок доменов (KRAB), например такой, как в соответствии с NP_056209.2, или белок, кодируемый NM_015394.5, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления KRAB

представляет собой синтетическую конструкцию KRAB. В некоторых вариантах осуществления KRAB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61.

DAKSLTAWSRITLVTFKDVFDFTREEWKLDDTAQQILYRNVMLNENYKNLVSLG
YQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREINQETHPDSETAFEIKSSV (SEQ ID NO: 61)

В некоторых вариантах осуществления домен KRAB репрессора кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 51 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

GACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACG
TGTTCTGTTGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATC
CTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCA
GCTGACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGG
TGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATC
AAGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 51)

В некоторых вариантах осуществления KRAB для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью KRAB под SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления вариант KRAB предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляют собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает KRAB, и функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии содержат дополнительную функциональную группу, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии обеспечивают снижение уровня экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии можно применять в способах модулирования, например снижения, уровня экспрессии генов, способах лечения состояния или способах эпигенетического модифицирования гена-мишени, например элемента контроля транскрипции, описанного в данном документе, например, вместо системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, предусматривающий последовательность KRAB под SEQ ID NO: 61, или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) функциональных групп,

целенаправленно воздействующих на ДНК, и один или несколько доменов репрессора, где домен репрессора представляет собой или предусматривает DNMT1, например человеческий DNMT1, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DNMT1 представляет собой человеческий DNMT1, например соответствующий записи в Gene ID 1786, например соответствующий записи в UniPort ID P26358.2. В некоторых вариантах осуществления DNMT1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора, описанный в данном документе, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

VDLRTLDFVSGCGGLSEGFHQAGISDTLWAIEMWDPAAQAFRLNPNPGSTVFTED
CNILLKLVMAGETTNSRGQRLPQKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFNRSRTYSKFKNSLV
VSFLSYCDYYRPRFFLLENVRNFVSFKRSMVLKLTLRCLVRMGYQCTFGVLQAGQYGV
AQTRRRRAIILAAAPGEKLPFPEPLHVFAPRACQLSVVVDKFKVSNITRLSSGPFRTITV
RDTMSDLPEVRNGASALEISYNGEPQSWFQRQLRGAQYQPILRDHICKDMSALVAARM
RHIPLAPGSDWRDLNIEVRLSDGTMARKLRYTHHDRKNRSGSSGALRGVCSCVEAGK
ACDPAARQFNTLIPWCLPHTGNRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVL
HPEQHRVSVRECARSQGFDPDITYRLFGNILDKHRQVGNAVPPPLAKAIGLEIKLCMLAK
ARESASAKIKEEEAAKD (SEQ ID NO: 58)

В некоторых вариантах осуществления DNMT1 кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 48 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

GTGGATCTGAGGACACTCGACGTGTTTAGCGGATGCGGCGGACTCTCCGAAG
GCTTCCACCAAGCCGGAATTTCCGACACACTCTGGGCCATTGAGATGTGGGACCCCG
CCGCTCAAGCCTTCAGACTGAATAATCCCGGCTCCACCGTGTTACCGAGGACTGCA
ACATTCTGCTGAAGCTGGTGATGGCTGGCGAAACCACCAACTCTAGAGGCCAGAGG
CTGCCCCAGAAGGGAGATGTGGAAATGCTCTGTGGAGGCCCTCCTTGCCAAGGCTTC
TCCGGCATGAACAGGTTCAACTCTAGAACATACAGCAAGTTCAAGAACTCTCTGGTC
GTGAGCTTTCTGAGCTACTGCGACTACTATAGACCTAGGTTCTTTCTGCTGGAGAAC
GTGAGAAATTTCTGTGTCCTTCAAGAGGAGCATGGTGCTGAAGCTGACACTGAGGTG
TCTGGTGAGGATGGGCTACCAAGTGACATTCGGAGTGCTGCAAGCTGGCCAGTACG
GCGTGGCCCAGACCAGAAGGAGGGCCATCATTCTGGCTGCTGCCCCCGGCGAGAAA
CTCCCTCTGTTCCCCGAGCCCCTCCACGTGTTGCCCCCTAGAGCTTGCCAGCTGAGC
GTGGTGGTTCGACGATAAGAAGTTCGTGAGCAACATCACAAGGCTGTCCAGCGGACC
CTTCAGAACCATTACCGTGAGGGATACCATGTCCGACCTCCCCGAGGTGAGGAATG
GCGCCAGCGCTCTGGAGATTTCTACAACGGCGAACCTCAGAGCTGGTTCCAAAGG

CAGCTGAGAGGGCGCTCAGTATCAGCCCATTTCTGAGGGACCACATCTGCAAAGATAT
 GAGCGCTCTGGTGGCCGCTAGAATGAGACATATTCCTCTGGCCCCCGGCAGCGACTG
 GAGAGATCTGCCCAATATTGAGGTGAGACTCAGCGACGGAACAATGGCTAGAAAAC
 TGAGGTACACCCATCATGATAGAAAGAACGGAAGGAGCAGCAGCGGCGCTCTGAG
 AGGAGTGTGTAGCTGCGTGGAAGCTGGCAAGGCTTTCGATCCCGCCGCTAGGCAGT
 TCAATACCCTCATCCCTTGGTGTCTGCCTCACACCGGCAACAGACACAATCATTTGGG
 CTGGACTGTATGGAAGGCTCGAATGGGACGGCTTTTTTCAGCACCAACCGTGACCAATC
 CCGAACCTATGGGCAAGCAAGGAAGGGTGCTCCACCCCGAGCAGCATAGAGTCGTG
 TCCGTGAGAGAATGCGCTAGAAGCCAAGGCTTCCCCGACACCTATAGACTGTTCCG
 CAACATTCTGGATAAGCACAGACAAGTGGGAAATGCTGTCCCTCCTCCTCTGGCCAA
 GGCTATCGGACTGGAGATCAAGCTGTGTATGCTCGCCAAAGCTAGGGAGAGCGCTT
 CCGCCAAGATTAAGGAGGAGGAGGCCGCCAAGGAC (SEQ ID NO: 48)

В некоторых вариантах осуществления DNMT1 для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью DNMT под SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с DNMT1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает DNMT1 и нацеливающуюся функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, предусматривающий DNMT1 или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) функциональных групп, целенаправленно воздействующих на ДНК, и один или несколько доменов репрессора, где домен репрессора представляет собой или предусматривает комплекс DNMT3a/3L или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления комплекс DNMT3a/3L представляет собой слитую конструкцию. В некоторых вариантах осуществления комплекс DNMT3a/3L содержит DNMT3A, например человеческий DNMT3A (например такой, как в соответствии с NP_072046.2,

или белок, кодируемый NM_022552.4). В некоторых вариантах осуществления комплекс DNMT3a/3L содержит мышинный DNMT3A, например такой, как в соответствии с NP_031898, или белок, кодируемый NM_007872. В некоторых вариантах осуществления комплекс DNMT3a/3L содержит человеческий DNMT3L (например такой, как в соответствии с NP_787063.1, или белок, кодируемый NM_175867.3). В некоторых вариантах осуществления комплекс DNMT3a/3L содержит мышинный DNMT3L (например такой, как в соответствии с NP_001075164, или белок, кодируемый NM_001081695). В некоторых вариантах осуществления DNMT3a/3L содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 59 или 60. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора, описанный в данном документе, содержит SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

NHDQEFDPKVVYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCE
DSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEG
TGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEV
SAAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGGK
DQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLF
APLKEYFACVSSGNSNANSRGPSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFTVPVWRRQPVRVLS
LFEDIKKELTSLGFLESGSDPGQLKHVVDVTDTVRKDVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCD
RPPSWYLFQFHRLLQYARPKGPSRPFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPV TIPDV
HGGSLQNAV RVWSNIPAIRSRHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLA AKWPTKLVKNCFLP
LREYFKYFSTELTSSL (SEQ ID NO: 59)

NHDQEFDPKVVYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCE
DSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEG
TGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEV
SAAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGGK
DQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLF
APLKEYFACVSSGNSNANSRGPSFSSGLVPLSLRGSHMGPMIYKTVSAWKRPVRVLS
LFRNIDKVLKSLGFLESGSGSGGGTLKYVEDVTNVVRRDVEKWGPFDLVYGSTQPLGSS
CDRCPGWYMFQFHRILQYALPRQESQRPFFWIFMDNLLLTEDDQETTTRFLQTEAVTLQ
DVRGRDYQNAMRVWSNIPGLKSKHAPLTPKEEEYLQAQVRSRSKLDAPKVDLLVKNC
LLPLREYFKYFSQNSLPL (SEQ ID NO: 60)

В некоторых вариантах осуществления DNMT3a/3L кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 49 или 50 или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

AACCACGACCAGGAGTTCGACCCCCCAAGGTGTACCCCCCGTGCCCCGCCG
AGAAGCGGAAGCCCATCCGGGTGCTGAGCCTGTTCGACGGCATCGCCACCGGCCTG
CTGGTGCTGAAGGACCTGGGCATCCAGGTGGACCGGTACATCGCCAGCGAGGTGTG
CGAGGACAGCATCACCGTGGGCATGGTGCGGCACCAGGGCAAGATCATGTACGTGG
GCGACGTGCGGAGCGTGACCCAGAAGCACATCCAGGAGTGGGGCCCCCTTCGACCTG
GTGATCGGCGGCAGCCCCCTGCAACGACCTGAGCATCGTGAACCCCGCCCGGAAGGG
CCTGTACGAGGGCACCGGCCGGCTGTTCTTCGAGTTCTACCGGCTGCTGCACGACGC
CCGGCCCAAGGAGGGCGACGACCGGCCCTTCTTCTGGCTGTTCGAGAACGTGGTGG

CCATGGGCGTGAGCGACAAGCGGGACATCAGCCGGTTCCTGGAGAGCAACCCCGTG
 ATGATCGACGCCAAGGAGGTGAGCGCCGCCACCGGGCCCGGTACTTCTGGGGCAA
 CCTGCCCCGGCATGAACCGGCCCTGGCCAGCACCGTGAAACGACAAGCTGGAGCTGC
 AGGAGTGCCTGGAGCACGGCCGGATCGCCAAGTTCAGCAAGGTGCGGACCATCACC
 ACCCGGAGCAACAGCATCAAGCAGGGCAAGGACCAGCACTTCCCCGTGTTTCATGAA
 CGAGAAGGAGGACATCCTGTGGTGCACCGAGATGGAGCGGGTGTTTCGGCTTCCCCG
 TGACTACACCGACGTGAGCAACATGAGCCGGCTGGCCCGGCAGCGGCTGCTGGGC
 CGGAGCTGGAGCGTGCCCGTGATCCGGCACCTGTTCGCCCCCCTGAAGGAGTACTTC
 GCCTGCGTGAGCAGCGGCAACAGCAACGCCAACAGCCGGGGCCCCAGCTTCAGCAG
 CGGCCTGGTGCCCTGAGCCTGCGGGGCAGCCACATGAATCCTCTGGAGATGTTTGA
 GACAGTGCCCGTGTTGGAGAAGGCAACCCGTGAGGGTGCTGAGCCTCTTCGAGGACA
 TTAAGAAGGAGCTGACCTCTCTGGGCTTTCTGGAATCCGGCAGCGACCCCGGCCAGC
 TGAAACACGTGGTGACGTGACCGACACAGTGAGGAAGGACGTGGAAGAGTGGGG
 CCCCTTTGACCTCGTGTATGGAGCCACACCTCCTCTCGGCCACACATGCGATAGGCC
 TCCAGCTGGTATCTCTTCCAGTTCACAGACTGCTCCAGTACGCCAGACCTAAGCC
 CGGCAGCCCCAGACCCTTCTTCTGGATGTTTCGTGGACAATCTGGTGCTGAACAAGGA
 GGATCTGGATGTGGCCAGCAGATTTCTGGAGATGGAACCCGTGACAATCCCCGACG
 TGCATGGCGGCTCTCTGCAGAACGCCGTGAGAGTGTGGTCCAACATCCCCGCCATTA
 GAAGCAGACACTGGGCTCTGGTGAGCGAGGAGGAAGTGTCTCTGCTGGCCCAGAAT
 AAGCAGTCCTCCAAGCTGGCCGCCAAGTGGCCCACCAAGCTGGTGAAGAACTGCTT
 TCTGCCTCTGAGGGAGTATTTCAAGTATTTTCAGCACCGAACTGACCAGCAGCCTG
 (SEQ ID NO: 49)

AACCACGACCAGGAGTTCGACCCCCCAAGGTGTACCCCCCGTGCCCCGCCG
 AGAAGCGGAAGCCCATCCGGGTGCTGAGCCTGTTCGACGGCATCGCCACCGGCCTG
 CTGGTGCTGAAGGACCTGGGCATCCAGGTGGACCGGTACATCGCCAGCGAGGTGTG
 CGAGGACAGCATCACCGTGGGCATGGTGCGGCACCAGGGCAAGATCATGTACGTGG
 GCGACGTGCGGAGCGTGACCCAGAAGCACATCCAGGAGTGGGGGCCCTTCGACCTG
 GTGATCGGCGGCAGCCCCTGCAACGACCTGAGCATCGTGAACCCCGCCCGGAAGGG
 CCTGTACGAGGGCACCGGCCGGCTGTTCTTCGAGTTCTACCGGCTGCTGCACGACGC
 CCGGCCCAAGGAGGGCGACGACCGGCCCTTCTTCTGGCTGTTTCGAGAACGTGGTGG
 CCATGGGCGTGAGCGACAAGCGGGACATCAGCCGGTTCCTGGAGAGCAACCCCGTG
 ATGATCGACGCCAAGGAGGTGAGCGCCGCCACCGGGCCCGGTACTTCTGGGGCAA
 CCTGCCCCGGCATGAACCGGCCCTGGCCAGCACCGTGAAACGACAAGCTGGAGCTGC
 AGGAGTGCCTGGAGCACGGCCGGATCGCCAAGTTCAGCAAGGTGCGGACCATCACC
 ACCCGGAGCAACAGCATCAAGCAGGGCAAGGACCAGCACTTCCCCGTGTTTCATGAA
 CGAGAAGGAGGACATCCTGTGGTGCACCGAGATGGAGCGGGTGTTTCGGCTTCCCCG
 TGACTACACCGACGTGAGCAACATGAGCCGGCTGGCCCGGCAGCGGCTGCTGGGC
 CGGAGCTGGAGCGTGCCCGTGATCCGGCACCTGTTCGCCCCCCTGAAGGAGTACTTC
 GCCTGCGTGAGCAGCGGCAACAGCAACGCCAACAGCCGGGGCCCCAGCTTCAGCAG
 CGGCCTGGTGCCCTGAGCCTGCGGGGCAGCCACATGGGCCCCATGGAGATCTACA

AGACCGTGAGCGCCTGGAAGCGGCAGCCCGTGCGGGTGCTGAGCCTGTTCCGGAAC
 ATCGACAAGGTGCTGAAATCCCTGGGCTTCCTGGAGAGCGGCAGCGGCAGCGGCGG
 CGGCACCCTGAAGTACGTGGAGGACGTGACCAACGTGGTGCGGCGGGACGTGGAGA
 AGTGGGGCCCCCTTCGACCTGGTGTACGGCAGCACCCAGCCCCTGGGCAGCAGCTGC
 GACCGGTGCCCCGGCTGGTACATGTTCCAGTTCACCGGATCCTGCAGTACGCCCTG
 CCCCAGGAGAGCCAGCGGCCCTTCTTCTGGATCTTCATGGACAACCTGCTGCTG
 ACCGAGGACGACCAGGAGACCACCCCGGTTCTGCAGACCGAGGCCGTGACCCCT
 GCAGGACGTGCGGGGCCGGGACTACCAGAACGCCATGCGGGTGTGGAGCAACATCC
 CCGGCCTGAAATCCAAGCACGCCCCCCTGACCCCCAAGGAGGAGGAGTACCTGCAG
 GCCCAGGTGCGGAGCCGGAGCAAGCTGGACGCCCCCAAGGTGGACCTGCTGGTGAA
 GAACTGCCTGCTGCCCCTGCGGGAGTACTTCAAGTACTTCAGCCAGAACAGCCTGCC
 CCTG (SEQ ID NO: 50)

В некоторых вариантах осуществления DNMT3a/3L для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с DNMT3a/3L под SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления вариант DNMT3a/3L предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляют собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает DNMT3a/3L, и функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, предусматривающий DNMT3a/3L или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) функциональных групп, целенаправленно воздействующих на ДНК, и один или несколько доменов репрессора, где домен репрессора представляет собой или предусматривает DNMT3b, например человеческий DNMT3b, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DNMT3b представляет собой человеческий DNMT3b, например такой, как в соответствии с NP_008823.1 или

AOX21819.1, или белок кодируемый NM_006892.4 или KX447429). В некоторых вариантах осуществления DNMT3b содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора, описанный в данном документе, содержит SEQ ID NO: 85 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

DNMT3b

MKGDTRHLNGEEDAGGREDSSILVNGACSDQSSDSPPILEAIRTPAIRGRSSSRLS
 KREVSSLLSYTQDLTGDDGEDGDGSDTPVMPKLFRETRTRSESPAVRTRNNNSVSSRE
 RHRPSRSTRGRQGRNHVDESPVEFPATRLRRRATASAGTPWPSPSSSYLTIDLTDDTE
 DTHGTPQSSSTPYARLAQDSQQGGMESPQVEADSGDGSSEYQVSADKLVALGLFSQH
 FNLATFNKLVSARKAMYLEKARVRAGKTFPSSPGDSLEDQLKPMLEWAHGGFKPTG
 IEGLKPNNTQPENKTRRRRTADDSATSDYCPAPKRLKTNCYNNGKDRGDEDQSREQMAS
 DVANNKSSLEDGCLSCGRKNPVSFHPLFEGGLCQTCRDRFLELFYMYDDDGYQSYCTV
 CCEGRELLCSNTSCCRFCFCVECLEVLVGTGTAAEAKLQEPWSCYMCLPQRCHGVLR
 RKDWNVRLQAFFTSDTGLEYEAPKLYPAIPAARRRPIRVLSLFDGIATGYLVKELGIKV
 GKYVASEVCEESIAVGTVKHEGNIKYVNDVRNITKKNIEEWGPFDLVIGGSPCNDLSNV
 NPARKGLYEGTGRLFFEFYHLLNYSRPKEGDDRPFFWMFENVVAMKVGDKRDISRFL
 CNPVMIDAIVSAAHRARYFWGNLPGMNRPVIAASKNDKLELQDCLEYNRIAKLKKVQT
 ITTKSNSIKQGKNQLFPVVMNGKEDVLWCTELERIFGFPVHYTDVSNMGRGARQKLLG
 RSWSVPVIRHLFAPLKDYFACE (SEQ ID NO: 85)

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) целенаправленно воздействующих функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает G9A, например такой, как в соответствии с NP_001350618.1, или белок, кодируемый NM_001363689.1, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления G9A содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62.

GNRAIRTEKIICRDVARGYENVPIPCVNGVDGEPCPEDYKYISENCETSTMNIDRN
 ITHLQHCTCVDDCSSNCLCGQLSIRCWYDKDGRLLQEFNKIEPPLIFECNQACSCWRNC
 KNRVVQSGIKVRLQLYRTAKMGWGVRLALQTIPQGTFIGEYVYVGLISDAEADVREDDSYL
 FDLNKGDEVYCIDARYYGNISRFINHLCDPNIIPVRVFMHLHQDLRFPRIAFFSSRDITGE
 ELGFDYGDRFWDIKSKYFTCQCGSEKCKHSAEIALEQSRLARLD (SEQ ID NO: 62)

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора G9A кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 52 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

GGAAATAGGGCTATCAGAACCGAGAAGATCATCTGTAGGGACGTGGCTAGA
 GGCTACGAGAACGTGCCCCATTCCTTGCGTGAATGGCGTGGATGGCGAACCTTGCCCC
 GAGGACTACAAATACATCTCCGAGAACTGCGAAACCAGCACAATGAACATCGACAG
 AAACATCACCCACCTCCAGCACTGCACATGTGTGGATGACTGCTCCTCCAGCAACTG
 TCTGTGCGGCCAGCTCTCCATCAGATGCTGGTACGACAAGGACGGCAGACTGCTGC
 AAGAGTTCAACAAGATCGAACCCCTCTCATCTTCGAGTGTAACCAAGCTTGCAGCT

GCTGGAGAAACTGCAAGAATAGAGTGGTCCAGAGCGGCATCAAGGTGAGACTGCA
 ACTGTACAGAACCGCCAAGATGGGATGGGGAGTGAGGGCTCTGCAAACCATTTCCC
 AAGGCACCTTCATCTGCGAATACGTGGGCGAAGTATCTCCGACGCCGAAGCTGAC
 GTGAGAGAGGACGACAGCTATCTCTTCGATCTGGACAATAAGGACGGCGAGGTGTA
 CTGCATCGACGCTAGATATTACGGCAACATCTCTAGATTTCATCAACCACCTCTGCGA
 TCCCAACATCATTTCCCGTGAGGGTGTTCATGCTGCACCAAGATCTGAGGTTCCCTAG
 AATCGCCTTCTTCAGCTCTAGAGACATCAGAACCGGCGAGGAGCTGGGCTTCGATTA
 CGGCGATAGATTCTGGGACATCAAGTCCAAGTACTTCACATGCCAGTGCGGCAGCG
 AGAAGTGTAAGCACAGCGCTGAGGCCATTGCTCTGGAGCAGTCTAGACTGGCCAGA
 CTGGAT (SEQ ID NO: 52)

В некоторых вариантах осуществления G9A для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью G9A под SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления вариант G9A предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляют собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает G9A, и функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии содержат дополнительную функциональную группу, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии обеспечивают снижение уровня экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии можно применять в способах модулирования, например снижения, уровня экспрессии генов, способах лечения состояния или способах эпигенетического модифицирования гена-мишени, например элемента контроля транскрипции, описанного в данном документе, например, вместо системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, предусматривающий последовательность G9A под SEQ ID NO: 62, или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) целенаправленно действующих функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает HDAC8, например такой, как в соответствии с NP_001159890, или белок, кодируемый NM_001166418, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления HDAC8 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63.

EEPEEPADSGQSLVPVYIYSPEYVSMCDLAKIPKRASMVHSLIEAYALHKQMRI

VKPKVASMEEMATFHTDAYLQHLQKVSQEGDDDDHPDSIEYGLGYDCPATEGIFDYAAA
 IGGATITAAQCLIDGMCKVAINWSGGWHHAKKDEASGFCYLNDVGLGILRLRRKFERIL
 YVDLDLHHGDGVEDAFSFTSKVMTVSLHKFSPGFFPGTGDVSDVGLGKGRYYSVNVPI
 QDGIQDEKYYQICESVLKEVYQAFNPKAVVLQLGADTIAGDPMCSFNMTVPVGIGKCLK
 YILQWQLATLILGGGGYNLANTARCWTYLTGVILGKTLSSSEIPDHEFFTAYGPDYVLEIT
 PSCRPDREPHRIQQILNYIKGNLKHVV (SEQ ID NO: 63)

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора HDAC8 кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 53 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

GAGGAGCCCCGAGGAGCCCCGCCGATAGCGGACAATCTCTGGTGCCCCGTCTACA
 TCTACAGCCCCGAATATGTGAGCATGTGTGATTCCCTCGCCAAGATCCCTAAGAGAG
 CCAGCATGGTGCAATTCTCTGATCGAGGCCTACGCTCTGCATAAGCAAATGAGGATCG
 TGAAGCCCCAAGGTCGCCAGCATGGAAGAGATGGCCACCTTTCACACCGATGCCTAC
 CTCCAACATCTCCAGAAGGTGTCCCAAGAGGGCGACGACGACCACCCCGACTCCAT
 TGAGTACGGACTGGGCTATGATTGCCCCGCCACCGAGGGCATCTTTGACTATGCCGC
 CGCTATCGGCGGAGCTACCATCACAGCCGCCAGTGTCTGATTGATGGCATGTGCAA
 GGTCGCCATCAACTGGTCCGGAGGCTGGCATCATGCCAAGAAGGATGAGGCCTCCG
 GCTTCTGTTATCTGAATGACGCCGTGCTGGGCATTCTGAGACTGAGGAGGAAATTCTG
 AGAGGATTCTGTACGTGGATCTGGATCTGCATCACGGAGATGGAGTCGAAGATGCC
 TTCAGCTTCACCAGCAAGGTGATGACAGTCTCTCTGCACAAGTTCTCCCCCGGCTTC
 TTTCCCGGAACCGGCGACGTGTCCGACGTGGGACTGGGCAAGGGAAGGTACTACAG
 CGTGAACGTGCCCATTCAAGACGGCATCCAAGACGAGAAGTACTACCAGATCTGCG
 AGTCCGTGCTCAAGGAGGTCTACCAAGCCTTCAATCCTAAGGCTGTGCTGCTCCAAC
 TGGGAGCTGATACCATTTGCTGGCGATCCCATGTGCAGCTTCAATATGACACCCGTCG
 GAATCGGCAAGTGCCCTCAAGTACATCCTCCAGTGGCAGCTCGCCACCCTCATTCTCG
 GAGGAGGCGGATACAATCTGGCTAATACCGCCAGATGCTGGACCTATCTGACCGGC
 GTGATTCTGGGCAAAACACTGAGCAGCGAAATCCCCGACCACGAGTTTTTTCACCGCT
 TACGGCCCCGACTACGTGCTGGAGATCACCCCCAGCTGCAGACCCGATAGAAACGA
 ACCCCATAGAATCCAGCAAATTCTGAACTATATCAAGGGCAACCTCAAGCACGTCG
 TG (SEQ ID NO: 53)

В некоторых вариантах осуществления HDAC8 для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью HDAC8 под SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления вариант HDAC8 предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляют собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает HDAC8, и функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии содержат дополнительную функциональную группу, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии обеспечивают снижение уровня экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии можно применять в способах модулирования, например снижения, уровня экспрессии генов, способах лечения состояния или способах эпигенетического модифицирования гена-мишени, например элемента контроля транскрипции, описанного в данном документе, например, вместо системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, предусматривающий последовательность HDAC8 под SEQ ID NO: 63, или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) целенаправленно воздействующих функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает LSD1, например такой, как в соответствии с NP_055828.2, или белок, кодируемый NM_015013.4, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления KRAB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64.

LSGKKAAAAAAAAAAAAATGTEAGPGTAGGSENGSEVAAQPAGLSGPAEVGPGA
VGERTPRKKEPPRASPPGGLAEPPGSAGPQAGPTVVPGSATPMETGIAETPEGRRTSRRK
RAKVEYREMDESLANLSEDEYYSEEERNAKAEKEKKLPPPPPQAPPEEENESEPEPSGV
EGAAFQSRLPHDRMTSQEAACFPDIISGPQQTQKVFLFIRNRTLQLWLDNPKIQLTFEATL
QQLEAPYNSDVTVLVHRVHSYLERHGLINFGIYKRIKPLPTKKTGKVIHIGSGVSGLAARQ
LQSFQMDVTLLLEARDRVGGRVATFRKGNVYVADLGAMVVTGLGGNPMVVSQVNME
LAKIKQKCPLYEANGQAVPKEKDEMVEQEFNRLLEATSYLSHQLDFNVLNKHHVSLGQ
ALEVVIQLQEKHVKDEQIEHWKKIVKTQEELKELLNKMNVLKEKIKELHQQYKEASEV
KPPRDITAEFLVKSKHRDLTALCKEYDELAETQGKLEELQELEANPPSDVYLSSRDRI
LDWHFANLEFANATPLSTLSLKHWDQDDDFEFTGSHLTVRNGYSCVPVALAEGLDIKL
NTAVRQVRYTASGCEVIAVNTRSTSQTFIYKCDVAVLCTLPLGVLKQQPPAVQFVPPLPE
WKTSVAVQRMFGNLNKVVLCFDRVFWDPVNLFGHVGSTTASRGELFLFWNLYKAPIL
LALVAGEAAGIMENISDDVIVGRCLAILEKGIFGSSAVPQPKETVVSRRWRADPWARGSYS
YVAAGSSGNDYDLMAQPITPGPSIPGAPQPIRLFFAGEHTIRNYPATVHGALLSGLREA
GRIADQFLGAMYTLPQATPGVPAQQSPSM (SEQ ID NO: 64)

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора LSD1 кодируется

нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 54 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

CTCTCCGGAAAGAAAGCCGCGCTGCCGCTGCCGCGCTGCTGCTGCCGCTA
CCGGCACAGAAGCTGGCCCCGGAACAGCTGGCGGAAGCGAAAACGGAAGCGAAGT
GGCTGCCCAGCCCCGCCGACTGTCCGGACCCGCCGAGGTGGGACCCGGCGCTGTCTG
GCGAAAGGACCCCCAGAAAAAAGGAGCCTCCTAGAGCCAGCCCTCCCGGCGGACTC
GCCGAACCTCCCGGCAGCGCTGGACCTCAAGCCGGACCTACAGTGGTGCCCGGCAG
CGCTACACCTATGGAGACCGGCATCGCTGAGACCCCCGAGGGAAGGAGAACCAGCA
GAAGGAAGAGAGCCAAGGTGGAGTACAGAGAGATGGATGAGTCTCTGGCTAACCTC
AGCGAGGACGAGTACTACTCCGAGGAGGAAAGGAATGCCAAGGCCGAGAAGGAGA
AGAAGCTGCCCCCTCCTCCCCCTCAAGCCCCCCCCGAGGAGGAGAACGAGTCCGAG
CCCGAGGAACCCAGCGGAGTGGAAGGAGCCGCCTTTCAGTCCAGACTGCCCCACGA
CAGAATGACATCCCAAGAGGCCGCTTGCTTTCCCGACATTATTTCCGGCCCTCAGCA
GACCCAGAAGGTGTTTCTGTTCATTAGAAATAGAACACTCCAGCTGTGGCTCGACAA
CCCCAAGATCCAGCTGACCTTCGAGGCTACCCTCCAACAGCTGGAGGCCCCCTACAA
TAGCGATACCGTGCTGGTGACAGAGTGACAGCTATCTGGAGAGGCACGGCCTCA
TTAACTTCGGCATTTACAAGCGGATCAAGCCCCTGCCACCAAGAAAACAGGCAAG
GTGATCATCATCGGCAGCGGCGTGAGCGGCCTGGCCGCCGCCCGGCAGCTGCAGAG
CTTCGGCATGGACGTGACCCTGCTGGAGGCCCGGGACCGGGTGCGCGGCCGGGTGG
CCACCTTCCGGAAGGGCAACTACGTGGCCGACCTGGGCGCCATGGTGGTGACCGGC
CTGGGCGGCAACCCCATGGCCGTGGTGAGCAAGCAGGTGAACATGGAGCTGGCCAA
GATCAAGCAGAAGTGCCCCCTGTACGAGGCCAACGGCCAGGCCGTGCCCAAGGAGA
AGGACGAGATGGTGAGCAGGAGTTCAACCGGCTGCTGGAGGCCACCAGCTACCTG
AGCCACCAGCTGGACTTCAACGTGCTGAACAACAAGCACGTGAGCCTGGGCCAGGC
CCTGGAGGTGGTGATCCAGCTGCAGGAGAAGCACGTGAAGGACGAGCAGATCGAG
CACTGGAAGAAGATCGTGAAAACACAGGAGGAGCTGAAGGAGCTGCTGAACAAGA
TGGTGAACCTGAAGGAGAAGATCAAGGAGCTGCACCAGCAGTACAAGGAGGCCAG
CGAGGTGAAGCCCCCCCCGGGACATCACCGCCGAGTTCCTGGTCAAAAGCAAGCACC
GGGACCTGACCGCCCTGTGCAAGGAGTACGACGAGCTGGCCGAGACCCAGGGCAAG
CTGGAGGAGAAGCTGCAGGAGCTGGAGGCCAACCCCCCAGCGACGTGTACCTGAG
CAGCCGGGACCGGCAGATCCTGGACTGGCACTTCGCCAACCTGGAGTTCGCCAACG
CCACCCCCCTGAGCACCTGAGCCTGAAGCACTGGGACCAGGACGACGACTTCGAG
TTCACCGGCAGCCACCTGACCGTGCGGAACGGCTACAGCTGCGTGCCCGTGGCCCTG
GCCGAGGGCCTGGACATCAAGCTGAACACCGCCGTGCGGCAGGTGCGGTACACCGC
CAGCGGCTGCGAGGTGATCGCCGTGAACACCGGAGCACCAGCCAGACCTTCATCT
ACAAGTGCGACGCCGTGCTGTGCACCCTGCCCCTGGGCGTGCTGAAGCAGCAGCCC

CCCGCCGTGCAGTTCGTGCCCCCCTGCCCCGAGTGGAAAACAAGCGCCGTGCAGCG
 GATGGGCTTCGGCAACCTGAACAAGGTGGTGCTGTGCTTCGACCGGGTGTCTGGGA
 CCCCAGCGTGAACCTGTTCGGCCACGTGGGCAGCACCAACCGCCAGCCGGGGCGAGC
 TGTTCTGTCTGGAACCTGTACAAGGCCCCCATCCTGCTGGCCCTGGTGGCCGGCG
 AGGCCGCCGGCATCATGGAGAACATCAGCGACGACGTGATCGTGGGCCGGTGCCTG
 GCCATCCTGAAGGGCATCTTCGGCAGCAGCGCCGTGCCCCAGCCCAAGGAGACCGT
 GGTGAGCCGGTGGCGGGCCGACCCCTGGGGCCCGGGGCAGCTACAGCTACGTGGCCG
 CCGGCAGCAGCGGCAACGACTACGACCTGATGGCCCAGCCCATCACCCCCGGCCCC
 AGCATCCCCGGCGCCCCCAGCCCATCCCCCGGCTGTTCTTCGCCGGCGAGCACACC
 ATCCGGAACCTACCCCGCCACCGTGCACGGCGCCCTGCTGAGCGGCCTGCGGGAGGC
 AGGACGGATCGCCGACCAGTTCCTGGGCGCCATGTACACCCTGCCCCGGCAGGCCA
 CCCCCGGCGTGCCCGCCCAGCAGAGCCCCAGCATG (SEQ ID NO: 54)

В некоторых вариантах осуществления LSD1 для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью LSD1 под SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления вариант LSD1 предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляют собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает LSD1, и функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии содержат дополнительную функциональную группу, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии обеспечивают снижение уровня экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии можно применять в способах модулирования, например снижения, уровня экспрессии генов, способах лечения состояния или способах эпигенетического модифицирования гена-мишени, например элемента контроля транскрипции, описанного в данном документе, например, вместо системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, предусматривающий последовательность LSD1 под SEQ ID NO: 64, или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) целенаправленно действующих функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает EZH2, например такой, как в соответствии с NP-004447.2, или белок, кодируемый NM_004456.5, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления EZH2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ

ID NO: 65:

GQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEI
LNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPL
QQNFMVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVVHGDRECGFINDEIFVELV
NALGQYNDDDDDDDDDGDDPEEREKQKQDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDK
GTAEELKEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDC
FLHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGR
RRGRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEEKKDETSSSSEANSR
CQTPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVIGTYNDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKE
SSIIAPAPAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDS
SCPCVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAA
DHWDSKNVSKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEISQDEA
DRRGKVYDKYMCNFLNNDNFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHR
IGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP (SEQ ID NO: 65)

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора EZH2 кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 55 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

GGCCAGACCGGCAAGAAGAGCGAGAAGGGCCCCGTGTGCTGGCGGAAGCGG
GTGAAGAGCGAGTACATGCGGCTGCGGCAGCTGAAGCGGTTCCGGCGGGCCGACGA
GGTGAAGAGCATGTTTCAGCAGCAACCGGCAGAAGATCCTGGAGCGGACCGAGATCC
TGAACCAGGAGTGGAAGCAGCGGCGAATCCAGCCCGTGACATCCTGACCAGCGTG
AGCAGCCTGCGGGGCACCCGGGAGTGACGCGTGACCAGCGACCTGGACTTCCCCAC
CCAGGTGATCCCCCTAAAGACCCTGAACGCCGTGGCCAGCGTGCCCATCATGTACA
GCTGGAGCCCCCTGCAGCAGAACTTCATGGTGGAGGACGAGACCGTGCTGCACAAC
ATCCCCTACATGGGCGACGAGGTGCTGGACCAGGACGGCACCTTCATCGAGGAGCT
GATCAAGAACTACGACGGCAAGGTGCACGGCGACCGGGAGTGCGGCTTCATCAACG
ACGAGATCTTCGTGGAGCTGGTGAACGCCCTGGGCCAGTACAACGACGACGACGAC
GACGACGACGGCGACGACCCCGAGGAGCGGGAGGAGAAGCAGAAGGACCTGGAGG
ACCACCGGGACGACAAGGAGAGCCGGCCCCCCCCCGGAAGTTCCCCAGCGACAAGATC
TTCGAGGCCATCAGCAGCATGTTCCCCGACAAGGGCACCGCCGAGGAGCTGAAGGA
GAAGTACAAGGAGCTGACCGAGCAGCAGCTGCCCGGCGCCCTGCCCCCGAGTGCA
CCCCAACATCGACGGCCCCAACGCCAAGAGCGTGACGCGGGAGCAGAGCCTGCAC
AGCTTCCACACCCTGTTCTGCCGGCGGTGCTTCAAGTACGACTGCTTCTGCACCCCT
TCCACGCCACCCCCAACACCTACAAGCGGAAGAACACCGAGACCGCCCTGGACAAC
AAGCCCTGCGGCCCCCAGTGCTACCAGCACCTGGAGGGCGCCAAGGAGTTCGCCGC
CGCCCTGACCGCCGAGCGGATCAAGACCCCCCCCCAAGCGGCCCGGCGGCGGCGGC

GGGGCCGGCTGCCCAACAACAGCAGCCGGGCCAGCACCCCCACCATCAACGTGCTG
 GAGAGCAAGGACACCGACAGCGACCGGGAGGCCGGCACCGAGACCGGCGGGCGAGA
 ACAACGACAAGGAGGAGGAGGAGAAGAAGGACGAGACCAGCAGCAGCAGCGAGG
 CCAACAGCCGGTGCCAGACCCCCATCAAGATGAAGCCCAACATCGAGCCCCCGAG
 AACGTGGAGTGGAGCGGCGCCGAGGCCAGCATGTTCCGGGTGCTGATCGGCACCTA
 CTACGACAACCTTCTGCGCCATCGCCCCGGCTGATCGGCACCAAGACCTGCCGGCAGGT
 GTACGAGTTCCGGGTGAAGGAGAGCAGCATCATCGCCCCCGCCCCCGCCGAGGACG
 TGGACACCCCCCCCCGGAAGAAGAAGCGGAAGCACCGGCTGTGGGGCCGCCCACTGC
 CGGAAGATCCAGCTGAAGAAGGACGGCAGCAGCAACCACGTGTACAACCTACCAGCC
 CTGCGACCACCCCCGGCAGCCCTGCGACAGCAGCTGCCCCCTGCGTGATCGCCCAGA
 ACTTCTGCGAGAAGTTCTGCCAGTGCAGCAGCGAGTGCCAGAACCGGTTCCCCGGCT
 GCCGGTGCAAGGCCCAAGTGCAACACCAAGCAGTGCCCCCTGCTACCTGGCCGTGCGG
 GAGTGCGACCCCCGACCTGTGCCTGACCTGCGGCGCCGCCGACCACTGGGACAGCAA
 GAACGTGAGCTGCAAGAAGTGCAGCATCCAGCGGGGCAGCAAGAAGCACCTGCTGC
 TGGCCCCCAGCGACGTGGCCGGCTGGGGCATCTTCATCAAGGACCCCGTGCAAGAAG
 AACGAGTTCATCAGCGAGTACTGCGGCGAGATCATCAGCCAGGACGAGGCCGACCG
 GCGGGGCAAGGTGTACGACAAGTACATGTGCAGCTTCCTGTTCAACCTGAACAACG
 ACTTCGTGGTGGACGCCACCCGGAAGGGCAACAAGATCCGGTTCGCCAACCACAGC
 GTGAACCCCAACTGCTACGCCAAGGTGATGATGGTGAACGGCGACCACCGGATCGG
 CATCTTCGCCAAGCGGGCCATCCAGACCGGCGAGGAGCTGTTCTTCGACTACCGGTA
 CAGCCAGGCCGACGCCCTGAAGTACGTGGGCATCGAGCGGGAGATGGAGATCCCC
 (SEQ ID NO: 55)

В некоторых вариантах осуществления EZH2 для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью EZH2 под SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления вариант EZH2 предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляют собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает EZH2, и функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии содержат дополнительную функциональную группу, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии обеспечивают снижение уровня экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии можно применять в способах модулирования, например снижения, уровня экспрессии генов, способах лечения состояния или способах эпигенетического модифицирования гена-мишени, например элемента контроля транскрипции, описанного в данном документе, например, вместо системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше

(например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, предусматривающий последовательность EZH2 под SEQ ID NO: 65, или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) целенаправленно воздействующих функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает FOG1, например такой, как в соответствии с NP_722520.2, или белок, кодируемый NM_153813.3, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления FOG1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66.

SRRKQSNPRQIKRSLGDMEAREEVQLVGASHMEQKATAPEAPSP (SEQ ID NO: 66)

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора FOG1 кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 56 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

AGCAGAAGGAAGCAGAGCAACCCCAGACAAATCAAGAGATCTCTGGGCGAC
ATGGAGGCCAGAGAGGAAGTGCAGCTGGTGGGCGCCAGCCACATGGAGCAGAAGG
CTACAGCCCCCGAGGCCCCCAGCCCC (SEQ ID NO: 56)

В некоторых вариантах осуществления FOG1 для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью FOG 1 под SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления вариант FOG1 предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляют собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает FOG1, и функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии содержат дополнительную функциональную группу, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии обеспечивают снижение уровня экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии можно применять в способах модулирования, например снижения, уровня экспрессии генов, способах лечения состояния или способах эпигенетического модифицирования гена-мишени, например элемента контроля транскрипции, описанного в данном документе, например, вместо системы репрессии экспрессии. В некоторых

вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или больше (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, предусматривающий последовательность FOG1 под SEQ ID NO: 66, или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления представленные технологии описаны как предусматривающие gRNA, которая специфически целенаправленно воздействует на ген-мишень. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень представляет собой онкоген, супрессор опухоли или ген, связанный с нарушением, представляющим собой неправильную регуляцию MYC. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень представляет собой MYC. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень представляет собой молекулу МНС I класса, например $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень кодирует белок теплового шока, например HSPA1B. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень представляет собой фактор транскрипции, например GATA1.

В некоторых вариантах осуществления технологии, представленные в данном документе, включают способы доставки субъекту одного или нескольких из репрессоров экспрессии или систем репрессии экспрессии, описанных в данном документе, например в ядро клетки или ткань субъекта, путем связывания такой функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, в качестве части слитой молекулы.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит NLS, например NLS SV40 на N-конце. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит NLS, например NLS нуклеоплазмина на C-конце. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит первую NLS на N-конце и вторую NLS на C-конце. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая NLS имеют одинаковую последовательность. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая NLS имеют отличающиеся последовательности. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит NLS SV40, например репрессор экспрессии содержит последовательность в соответствии с PKKKRK (SEQ ID NO: 86). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит эпитопную метку, например HA-метку: YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 80). Например, репрессор экспрессии может содержать две копии эпитопной метки.

Хотя эпитопная метка полезна во многих исследовательских контекстах, иногда необходимо исключить эпитопную метку в терапевтическом контексте. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления у репрессора экспрессии отсутствует эпитопная метка. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит последовательность, предусмотренную в данном документе (или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее), но с отсутствующей HA-меткой под

SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность, предусмотренную в данном документе (или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее), но с отсутствующей областью, кодирующей HA-метку под SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит NLS нуклеоплазмينا, например репрессор экспрессии содержит последовательность KRPAATKKAGQAKKK (SEQ ID NO: 87). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии не содержит NLS. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии не содержит эпитопную метку. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии не содержит HA-метку. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии не содержит последовательность HA-метки в соответствии с SEQ ID NO: 80.

Функциональные группы, целенаправленно воздействующие на ДНК

Функциональные группы, целенаправленно воздействующие на ДНК, могут специфически связывать последовательность ДНК, например последовательность ДНК, ассоциированную с геном-мишенью, например связывать, элемент геномной последовательности (например, промотор, TSS или якорную последовательность), в гене-мишени, проксимальный по отношению к нему и/или функционально связанный с ним. Любые молекулу или соединение, которые специфически связываются с последовательностью ДНК, можно применять в качестве функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК.

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, целенаправленно воздействует, например связывает, на компонент геномного комплекса (например, ASMC). В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, целенаправленно воздействует, например связывает, на последовательность контроля экспрессии (например, промотор или энхансер), функционально связанную с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, целенаправленно воздействует, например связывает, на ген-мишень или часть гена-мишени. Мишень функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК, может называться ее целевым компонентом. Целевой компонент может представлять собой любой элемент геномной последовательности, функционально связанный с геном-мишенью, или сам ген-мишень, в том числе без ограничения промотор, энхансер, якорную последовательность, экзон, интрон, последовательность, кодирующую UTR, сайт сплайсинга или сайт инициации транскрипции. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с одной или несколькими якорными последовательностями-мишенями (например, в пределах клетки), а не с нецелевыми якорными последовательностями (например, в пределах той же клетки).

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся

на ДНК, может представлять собой или предусматривать молекулу CRISPR/Cas, эффекторную молекулу TAL, домен по типу "Zn-пальца", пептидную нуклеиновую кислоту (PNA) или молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит одну функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит множество репрессоров экспрессии, где каждый член из множества репрессоров экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, где каждая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, не связывается выявляемым образом, например не связывается, со второй функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой первой функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой второй функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, для применения в композициях и способах, описанных в данном документе, является функциональной (например, связывается с последовательностью ДНК) в мономерном состоянии, например отличным от димерного.

В некоторых вариантах осуществления связывание целенаправленно воздействующей функциональной группы с целевым компонентом снижает аффинность связывания целевого компонента с другим фактором транскрипции, компонентом геномного комплекса или элементом геномной последовательности. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается со своей последовательностью-мишенью с K_D , меньшей или равной 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002 или 0,001 нМ (и необязательно K_D , составляющей по меньшей мере 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002 или 0,001 нМ). В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается со своей последовательностью-мишенью с K_D ,

составляющей от 0,001 нМ до 500 нМ, например от 0,1 нМ до 5 нМ, например приблизительно 0,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с последовательностью, не являющейся мишенью, с K_D , составляющей по меньшей мере 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 5000, 10,000 или 100,000 нМ (и необязательно не связывается в значительной степени с последовательностью, не являющейся мишенью). В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, не связывается с последовательностью, не являющейся мишенью.

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевому компоненту, например промотору гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% комплементарной компоненту-мишени.

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, репрессора экспрессии содержит не более чем 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 или 20 нуклеотидов (и необязательно по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или домен репрессора слитой молекулы содержат не более чем 2000, 1900, 1800, 1700, 1600, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 или 100 аминокислот (и необязательно по меньшей мере 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 или 1900 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или эффекторная функциональная группа слитой молекулы содержат 100-2000, 100-1900, 100-1800, 100-1700, 100-1600, 100-1500, 100-1400, 100-1300, 100-1200, 100-1100, 100-1000, 100-900, 100-800, 100-700, 100-600, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200, 200-2000, 200-1900, 200-1800, 200-1700, 200-1600, 200-1500, 200-1400, 200-1300, 200-1200, 200-1100, 200-1000, 200-900, 200-800, 200-700, 200-600, 200-500, 200-400, 200-300, 300-2000, 300-1900, 300-1800, 300-1700, 300-1600, 300-1500, 300-1400, 300-1300, 300-1200, 300-1100, 300-1000, 300-900, 300-800, 300-700, 300-600, 300-500, 300-400, 400-2000, 400-1900, 400-1800, 400-1700, 400-1600, 400-1500, 400-1400, 400-1300, 400-1200, 400-1100, 400-1000, 400-900, 400-800, 400-700, 400-600, 400-500, 500-2000, 500-1900, 500-1800, 500-1700, 500-1600, 500-1500, 500-1400, 500-1300, 500-1200, 500-1100, 500-1000, 500-900, 500-800, 500-700, 500-600, 600-2000, 600-1900, 600-1800, 600-1700, 600-1600, 600-1500, 600-1400, 600-1300, 600-1200, 600-1100, 600-1000, 600-900, 600-800, 600-700, 700-2000, 700-1900, 700-1800, 700-1700, 700-1600, 700-1500, 700-1400, 700-1300, 700-1200, 700-1100, 700-1000, 700-900, 700-800, 800-2000, 800-1900, 800-1800, 800-1700, 800-1600, 800-1500, 800-1400, 800-1300, 800-1200, 800-1100, 800-1000, 800-900, 900-2000, 900-1900, 900-1800, 900-1700, 900-1600, 900-1500, 900-1400, 900-1300, 900-1200, 900-1100, 900-1000, 1000-2000, 1000-1900, 1000-1800, 1000-1700, 1000-1600, 1000-1500, 1000-1400, 1000-1300,

1000-1200, 1000-1100, 1100-2000, 1100-1900, 1100-1800, 1100-1700, 1100-1600, 1100-1500, 1100-1400, 1100-1300, 1100-1200, 1200-2000, 1200-1900, 1200-1800, 1200-1700, 1200-1600, 1200-1500, 1200-1400, 1200-1300, 1300-2000, 1300-1900, 1300-1800, 1300-1700, 1300-1600, 1300-1500, 1300-1400, 1400-2000, 1400-1900, 1400-1800, 1400-1700, 1400-1600, 1400-1500, 1500-2000, 1500-1900, 1500-1800, 1500-1700, 1500-1600, 1600-2000, 1600-1900, 1600-1800, 1600-1700, 1700-2000, 1700-1900, 1700-1800, 1800-2000, 1800-1900 или 1900-2000 аминокислот.

Репрессор экспрессии или система репрессии экспрессии, раскрытые в данном документе, могут содержать нуклеиновую кислоту, например одну или несколько нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой или предусматривает РНК; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой или предусматривает ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой или содержит более чем 50% рибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких остатков природной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты отличается от нуклеиновой кислоты тем, что в нем не используется фосфодиэфирный каркас. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одной или нескольких пептидных нуклеиновых кислот. В качестве альтернативы или дополнительно в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет одну или несколько фосфотиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей вместо фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких природных нуклеозидов (например, аденозина, тимидина, гуанозина, цитидина, уридина, дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксигуанозина и дезоксицитидина). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеозидов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролопиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, C5-пропинилцитидина, C5-пропинилуридина, 2-аминоаденозина, C5-бромуридина, C5-фторуридина, C5-йодуридина, C5-пропинилуридина, C5-пропинилцитидина, C5-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-дезааденозина, 7-дезагуанозина, 8-оксоаденозина, 8-оксогуанозина, O(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинаций). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько модифицированных сахаров (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с природными нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт,

такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько интронов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты получают посредством одного или нескольких из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), размножения в рекомбинантной клетке или системе и химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления длина нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или больше остатков. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты могут иметь длину от приблизительно 2 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 150 нуклеотидов, от приблизительно 100 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 150 до приблизительно 250 нуклеотидов, от приблизительно 200 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 250 до приблизительно 350 нуклеотидов, от приблизительно 300 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 100 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000 нуклеотидов, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000 нуклеотидов, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 нуклеотидов, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов или в любом диапазоне между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью однонитевой; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере один элемент, который кодирует или представляет собой комплементарную последовательность последовательности, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота характеризуется ферментативной активностью.

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит или представляет собой нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, которая может быть включена в функциональную группу, может представлять собой или предусматривать ДНК, РНК и/или искусственную или синтетическую нуклеиновую кислоту или аналог или имитатор нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может представлять собой или предусматривать одно или несколько из геномной ДНК (gDNA), комплементарной ДНК (cDNA), пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), смеси пептид-нуклеиновая кислота, конъюгата пептид-олигонуклеотид, запертой нуклеиновой кислоты (LNA), мостиковой нуклеиновой кислоты (BNA),

полиамида, триплекс-образующего олигонуклеотида, антисмыслового олигонуклеотида, tRNA, mRNA, rRNA, miRNA, gRNA, siRNA или другой молекулы RNAi (например, которая целенаправленно воздействует на некодирующую РНК, которая описана в данном документе, и/или которая целенаправленно воздействует на продукт экспрессии конкретного гена, ассоциированного с целевым геномным комплексом, который описан в данном документе) и т. д. Последовательность нуклеиновой кислоты может содержать модифицированные олигонуклеотиды (например, химические модификации, такие как модификации, которые изменяют каркасные связи, молекулы сахара и/или основания нуклеиновых кислот) и/или искусственные нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает без ограничения геномную ДНК, cDNA, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) или конъюгаты пептидных олигонуклеотидов, запертые нуклеиновые кислоты (LNA), мостиковые нуклеиновые кислоты (BNA), полиамиды, триплекс-образующие олигонуклеотиды, модифицированную ДНК, антисмысловые олигонуклеотиды ДНК, tRNA, mRNA, rRNA, модифицированные РНК, miRNA, gRNA и siRNA или другие молекулы РНК или ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать один или несколько остатков, которые не являются встречающимися в природе остатками ДНК или РНК, может содержать одну или несколько связей, которые не являются сложными фосфодиэфирными связями (например, это могут быть, например, тиофосфатные связи и т. д.), и/или может предусматривать одну или несколько модификаций, таких как, например, модификация 2'О, такая как 2'-ОМер. Из уровня техники известны различные структуры нуклеиновых кислот, пригодные для получения синтетических нуклеиновых кислот (см., например, WO 2017/062862I и WO 2014/012081), при этом специалисты в данной области поймут, что их можно применять в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит один или несколько аналогов нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты может включать, в дополнение или вместо одного или нескольких природных нуклеозидов, например пуринов или пиримидинов, например аденина, цитозина, гуанина, тимина и урацила, один или несколько аналогов нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит один или несколько аналогов нуклеозидов. Аналог нуклеозида может предусматривать без ограничения аналог нуклеозида, такой как 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 4-метилбензимидазол, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламин метил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламин метилурацил, дигидроурацил, дигидроуридин, бета-D-галактозилквеуозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламин метилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил,

бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил, (аср3)w, 2,6-диаминопурин, 3-нитропиррол, инозин, тиоуридин, квеуозин, виозин, диаминопурин, изогуанин, изоцитозин, диаминопиримидин, 2,4-дифтортолуол, изохинолин, пирроло[2,3- β]пиридин и любые другие, которые могут образовывать пары оснований с пуриновой или пиримидиновой боковой цепью.

Домены CRISPR/Cas

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas. Молекула CRISPR/Cas содержит белок, участвующий в системе коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), например белок Cas, и необязательно направляющую РНК, например одиночную направляющую РНК (sgRNA). В некоторых вариантах осуществления gRNA, содержащаяся в молекуле CRISPR/Cas, нековалентно связана с белком CRISPR/Cas.

Системы CRISPR представляют собой адаптивные системы защиты, изначально обнаруженные у бактерий и архей. В системах CRISPR используются РНК-направляемые нуклеазы, называемые CRISPR-ассоциированными эндонуклеазами или эндонуклеазами "Cas" (например, Cas9 или Cpf1), для расщепления чужеродной ДНК. Например, в типичной системе CRISPR/Cas эндонуклеаза направляется на нуклеотидную последовательность-мишень (например, сайт в геноме, который подлежит редактированию последовательности) с помощью специфичных в отношении последовательности некодирующих "направляющих РНК", которые целенаправленно воздействуют на одно- или двухнитевые последовательности ДНК. Идентифицированы три класса (I-III) систем CRISPR. В системах CRISPR II класса используется одна эндонуклеаза Cas (вместо нескольких белков Cas). Одна система CRISPR II класса содержит эндонуклеазу Cas II типа, такую как Cas9, CRISPR-РНК ("crRNA") и транс-активирующую crRNA ("tracrRNA"). crRNA содержит "направляющую РНК". обычно последовательность РНК длиной приблизительно 20 нуклеотидов, которая соответствует последовательности ДНК-мишени. crRNA также содержит область, которая связывается с tracrRNA с образованием частично двухнитевой структуры, которая расщепляется РНКазой III с получением в результате гибрида crRNA/tracrRNA. Затем гибрид crRNA/tracrRNA направляет эндонуклеазу Cas9 для распознавания и расщепления последовательности ДНК-мишени. Последовательность ДНК-мишень, как правило, должна прилегать к "мотиву, прилежащему к протоспейсеру" (PAM), который является специфическим для рассматриваемой эндонуклеазы Cas; однако последовательности PAM встречаются по всему рассматриваемому геному. Эндонуклеазы CRISPR, идентифицированные у различных видов прокариот, имеют уникальные требования к

последовательности PAM; примеры последовательностей PAM включают 5'-NGG (*Streptococcus pyogenes*), 5'-NNAGAA (CRISPR1 *Streptococcus thermophilus*), 5'-NGGNG (CRISPR3 *Streptococcus thermophilus*) и 5'-NNNGATT (*Neisseria meningitidis*). Некоторые эндонуклеазы, например эндонуклеазы Cas9, ассоциированы с G-богатыми сайтами PAM, например с 5'-NGG, и осуществляют расщепление ДНК-мишени с образованием "тупых" концов в местоположении на 3 нуклеотида выше сайта PAM (с 5'-стороны от него). Другая система CRISPR II класса содержит эндонуклеазу Cpf1 V типа, которая имеет меньший размер, чем Cas9; примеры включают AsCpf1 (из *Acidaminococcus* sp.) и LbCpf1 (из *Lachnospiraceae* sp.). Cpf1-ассоциированные матрицы CRISPR подвергаются процессингу в зрелые crRNA без потребности в tracrRNA; другими словами, в случае системы Cpf1 для расщепления последовательности ДНК-мишени требуется только нуклеаза Cpf1 и crRNA. Эндонуклеазы Cpf1 ассоциированы с T-богатыми сайтами PAM, например с 5'-TTN. Cpf1 также может распознавать PAM-мотив 5'-CTA. Cpf1 расщепляет ДНК-мишень посредством введения смещенного или ступенчатого двухнитевого разрыва с образованием выступающего 5'-конца длиной 4 или 5 нуклеотидов, например посредством расщепления ДНК-мишени с образованием смещенного или ступенчатого разреза, охватывающего 5 нуклеотидов, расположенного на 18 нуклеотидов ниже сайта PAM (с 3'-стороны от него) на кодирующей нити и на 23 нуклеотида ниже сайта PAM на комплементарной нити; при этом выступающий конец длиной 5 нуклеотидов, который образуется в результате такого смещенного расщепления, обеспечивает возможность более точного редактирования генома за счет вставки ДНК посредством гомологичной рекомбинации по сравнению со вставкой в ДНК при расщеплении с образованием тупых концов. См., например, Zetsche et al. (2015) *Cell*, 163:759-771.

Различные CRISPR-ассоциированные (Cas) гены или белки можно применять в технологиях, предусмотренных настоящим изобретением, и выбор белка Cas будет зависеть от конкретных условий способа. Конкретные примеры белков Cas включают системы класса II, в том числе Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9, Cas10, Cpf1, C2C1 или C2C3. В некоторых вариантах осуществления белок Cas, например белок Cas9, можно получать из любого из разнообразных видов прокариот. В некоторых вариантах осуществления конкретный белок Cas, например конкретный белок Cas9, выбран для распознавания конкретной последовательности мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM). В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит последовательность, нацеливающуюся на полипептид, такую как белка Cas, например Cas9. В определенных вариантах осуществления белок Cas, например белок Cas9, можно получать из бактерий или архей или синтезировать с применением известных способов. В определенных вариантах осуществления белок Cas можно получать из грамположительной бактерии или грамотрицательной бактерии. В определенных вариантах осуществления белок Cas можно получать из бактерий рода *Streptococcus* (например, *S. pyogenes* или *S. thermophilus*), *Francisella* (например, *F. novicida*), *Staphylococcus* (например, *S. aureus*), *Acidaminococcus*

(например, BV3L6 *Acidaminococcus* sp.), *Neisseria* (например, *N. meningitidis*), *Cryptococcus*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Eubacterium*, *Pasteurella*, *Prevotella*, *Veillonella* или *Marinobacter*.

В некоторых вариантах осуществления в случае белка Cas требуется, чтобы мотив, прилегающий к протоспейсеру (PAM), присутствовал в последовательности ДНК-мишени или прилегал к ней для того, чтобы белок Cas мог связываться и/или функционировать. В некоторых вариантах осуществления PAM представляет собой или содержит, в направлении от 5'- к 3'-концу, следующее: NGG, YG, NNGRRT, NNNRRT, NGA, TYCV, TATV, NTTN или NNGATT, где N означает любой нуклеотид, Y означает C или T, R означает A или G, а V означает A, C или G. В некоторых вариантах осуществления белок Cas представляет собой белок, указанный в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит одну или несколько мутаций, обеспечивающих изменение его PAM. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации E1369R, E1449H и R1556A или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации E782K, N968K и R1015H или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации D1135V, R1335Q и T1337R или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации S542R и K607R или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации S542R, K548V и N552R или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям.

Таблица 1

Название	Фермент	Вид	Количество а.к.	PAM	Мутации для изменения распознавания PAM	Мутации для обеспечения каталитической инертности
FnCas9	Cas9	<i>Francisella novicida</i>	1629	5'-NGG-3'	Wt	D11A/H969A/ N995A
FnCas9 RHA	Cas9	<i>Francisella novicida</i>	1629	5'-YG-3'	E1369R/E1449 H/R1556A	D11A/H969A/ N995A
SaCas9	Cas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	1053	5'- NNGRRT -3'	Wt	D10A/H557A
SaCas9 KKH	Cas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	1053	5'- NNNRRT -3'	E782K/N968K/ R1015H	D10A/H557A

SpCas9	Cas9	Streptococcus pyogenes	1368	5'-NGG-3'	Wt	D10A/D839A/ H840A/N863A
SpCas9 VQR	Cas9	Streptococcus pyogenes	1368	5'-NGA-3'	D1135V/R1335 Q/T1337R	D10A/D839A/ H840A/N863A
AsCpf1 RR	Cpf1	Acidaminococcus sp. BV3L6	1307	5'-TYCV-3'	S542R/K607R	E993A
AsCpf1 RVR	Cpf1	Acidaminococcus sp. BV3L6	1307	5'-TATV-3'	S542R/K548V/ N552R	E993A
FnCpf1	Cpf1	Francisella novicida	1300	5'-NTTN-3'	Wt	D917A/E1006A/ D1255A
NmCas9	Cas9	Neisseria meningitidis	1082	5'- NNNGAT T-3'	Wt	D16A/D587A/ H588A/N611A

В некоторых вариантах осуществления белок Cas модифицируют с деактивацией нуклеазы, например Cas9 с дефицитом нуклеазы. В то время как Cas9 дикого типа генерирует двухцепочечные разрывы (DSB) в определенных последовательностях ДНК, являющихся мишенями для gRNA, доступен ряд эндонуклеаз CRISPR с модифицированными функциональными свойствами, например: "никазная" версия Cas9 образует только односторонний разрыв; каталитически неактивная Cas9 ("dCas9") не разрезает ДНК-мишень. В некоторых вариантах осуществления связывание dCas9 с последовательностью ДНК может препятствовать транскрипции в этом сайте за счет создания стерического препятствия. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или содержит каталитически неактивный Cas9, например dCas9. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или содержит каталитически неактивный мутантный Cas9, например Cas9m4. Из уровня техники известно много каталитически неактивных белков Cas9. В некоторых вариантах осуществления dCas9 содержит мутации в каждом домене эндонуклеазы белка Cas, например мутации D10A и H840A.

В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию D11A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию H969A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию N995A или аналогичную замену аминокислоты,

E1006A и D1255A или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям.

В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию D16A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию D587A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию H588A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию N611A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутации D16A, D587A, H588A и N611A или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) функциональных групп, целенаправленно воздействующих на ДНК, и один или несколько доменов репрессора, где одна или несколько функциональных групп, целенаправленно воздействующих на ДНК, представляют собой или предусматривают молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок Cas, например каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, например dCas9m4, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления dCas9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46 или 88.

DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSG
ETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHER
HPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLN
PDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKN
GLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK
NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEIFFDQS
KNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIH
LGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGM
RKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT
YHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRR
RYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS
GQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKG
QKNSRERMKRIIEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINR
LSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAK
LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKQRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI
REVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFV

YGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGET
 GEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD
 KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGY
 KEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
 GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQA
 ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD
 (SEQ ID NO: 46)

AKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARR
 LKRRRRHRIRVKKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLS QKLSEEEFSAALLHLAKR
 RGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTS
 DYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQS FIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEM
 LMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEYEFQIIENVFKQK
 KKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIA
 KILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQ
 IAFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIEL
 AREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEII RTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS
 LEAIPLEDLLNPNFNYEVD AII PRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSK
 ISYETFKKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMN
 LLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHH AEDALI ANADFIFKE
 WKKLDKAKKVMENQMFE EKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVD
 KKP NRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDP
 QTYQKLKLIMEQYGD EKNPLYKY YEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLD
 ITDDYPNSRNKVVKLSLKP YRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEA
 KKLKKISNQA EFIASFYKNDLIKINGEL YRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMND
 KRPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG (SEQ ID NO: 88)

В некоторых вариантах осуществления dCas9 кодируется последовательностью
 нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 45 или 89.

GACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGG
 GCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAA
 CACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCG
 GCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGG
 CGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGT
 GGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGA
 AGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAG
 AAGTACCCCAACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGC
 CGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTT
 CCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCC
 AGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGC
 GTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAA
 CCTGATCGCCAGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCG

CCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGAC
GCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACG
CCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTG
AGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAA
GGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGA
GCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAA
GCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCC
CCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGGCAGGAGGACTTC
TACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGAT
CCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCG
GAAATCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCG
CCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCCAAC
GAGAAGGTGCTGCCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGA
GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCG
GCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACC
GTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGA
GATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGC
TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTG
GAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCG
GCTGAAAACCTACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC
GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGAC
AAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCG
GAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGA
AGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCC
GGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCT
GGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGG
AGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGAT
CGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAG
AACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGA
CATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCG
CCATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACC
CGGAGCGACAAGGCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGA
AGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATACCCAGCGG
AAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGG
CCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCG
GGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACT
TCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTAC

CTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGA
GTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAAC
TTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCCTGAT
CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCC
ACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGT
GCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAG
CTGATCGCCCCGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCC
CACCGTGCCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAG
AAGCTGAAATCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTT
CGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAG
GACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAA
GCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCA
GCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGC
CCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGA
CGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCA
ACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAG
CAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCC
TTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGT
GCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCG
ACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGAC (SEQ ID NO: 45)

GCCAAGCGGAACCTACATCCTGGGCCTGGCCATCGGCATCACCAGCGTGGGCT
ACGGCATCATCGACTACGAGACCCGGGACGTGATCGACGCCGGCGTGCGGCTGTTC
AAGGAGGCCAACGTGGAGAACAACGAGGGCCGGCGGAGCAAGCGGGGCGCCCCGGC
GGCTGAAGCGGCGGCGGCGGCACCGGATCCAGCGGGTGAAGAAGCTGCTGTTTCGAC
TACAACCTGCTGACCGACCACAGCGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGCCCCG
GGTGAAGGGCCTGAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAGGAGTTCAGCGCCGCCCTGCTGC
ACCTGGCCAAGCGGCGGGGCGTGCACAACGTGAACGAGGTGGAGGAGGACACCGG
CAACGAGCTGAGCACCAAGGAGCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAGGAG
AAGTACGTGGCCGAGCTGCAGCTGGAGCGGCTGAAGAAGGACGGCGAGGTGCGGG
GCAGCATCAACCGGTTCAAGACCAGCGACTACGTGAAGGAGGCCAAGCAGCTGCTG
AAGGTGCAGAAGGCCTACCACCAGCTGGACCAGAGCTTCATCGACACCTACATCGA
CCTGCTGGAGACCCGGCGGACCTACTACGAGGGCCCCGGCGAGGGCAGCCCCTTCG
GCTGGAAGGACATCAAGGAGTGGTACGAGATGCTGATGGGCCACTGCACCTACTTC
CCCGAGGAGCTGCGGAGCGTGAAGTACGCCTACAACGCCGACCTGTACAACGCCCT
GAACGACCTGAACAACCTGGTGATCACCCGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAGTACT
ACGAGAAGTTCCAGATCATCGAGAACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCACCCTG
AAGCAGATCGCCAAGGAGATCCTGGTGAACGAGGAGGACATCAAGGGCTACCGGG
TGACCAGCACCGGCAAGCCCGAGTTCACCAACCTGAAGGTGTACCACGACATCAAG
GACATCACCGCCCGGAAGGAGATCATCGAGAACGCCGAGCTGCTGGACCAGATCGC

CAAGATCCTGACCATCTACCAGAGCAGCGAGGACATCCAGGAGGAGCTGACCAACC
TGAACAGCGAGCTGACCCAGGAGGAGATCGAGCAGATCAGCAACCTGAAGGGCTA
CACCGGCACCCACAACCTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGT
GGCACACCAACGACAACCAGATCGCCATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAG
AAGGTGGACCTGAGCCAGCAGAAGGAGATCCCCACCACCCTGGTGGACGACTTCAT
CCTGAGCCCCGTGGTGAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAAGGTGATCAACGCCA
TCATCAAGAAGTACGGCCTGCCCAACGACATCATCATCGAGCTGGCCCCGGGAGAAG
AACAGCAAGGACGCCCAGAAGATGATCAACGAGATGCAGAAGCGGAACCGGCAGA
CCAACGAGCGGATCGAGGAGATCATCCGGACCACCGGCAAGGAGAACGCCAAGTA
CCTGATCGAGAAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAGGGCAAGTGCCTGTACAGCC
TGGAGGCCATCCCCCTGGAGGACCTGCTGAACAACCCCTTCAACTACGAGGTGGAC
GCCATCATCCCCCGGAGCGTGAGCTTCGACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTGGT
GAAGCAGGAGGAGAACAGCAAGAAGGGCAACCGGACCCCCCTTCCAGTACCTGAGC
AGCAGCGACAGCAAGATCAGCTACGAGACCTTCAAGAAGCACATCCTGAACCTGGC
CAAGGGCAAGGGCCGGATCAGCAAGACCAAGAAGGAGTACCTGCTGGAGGAGCGG
GACATCAACCGGTTTCAGCGTGCAGAAGGACTTCATCAACCGGAACCTGGTGGACAC
CCGGTACGCCACCCGGGGCCTGATGAACCTGCTGCGGAGCTACTTCCGGGTGAACA
ACCTGGACGTGAAGGTGaaatccATCAACGGCGGGCTTCACCAGCTTCCTGCGGCGGAAG
TGGAAGTTCAAGAAGGAGCGGAACAAGGGCTACAAGCACCACGCCGAGGACGCCC
TGATCATCGCCAACGCCGACTTCATCTTCAAGGAGTGGAAGAAGCTGGACAAGGCC
AAGAAGGTGATGGAGAACCAGATGTTTCGAGGAGAAGCAGGCCGAGAGCATGCCCG
AGATCGAGACCGAGCAGGAGTACAAGGAGATCTTCATCACCCCCCACCAGATCAAG
CACATCAAGGACTTCAAGGACTACAAGTACAGCCACCGGGTGGACAAGAAGCCCAA
CCGGAAGCTGATCAACGACACCCTGTACAGCACCCGGAAGGACGACAAGGGCAAC
ACCCTGATCGTGAACAACCTGAACGGCCTGTACGACAAGGACAACGACAAGCTGAA
GAAGCTGATCAACAAGAGCCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACCACGACCCCCAGA
CCTACCAGAAGCTGAAGCTGATCATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAACCCCTG
TACAAGTACTACGAGGAGACCGGCAACTACCTGACCAAGTACAGCAAGAAGGACA
ACGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAAGTACTACGGCAACAAGCTGAACGCCACCTG
GACATCACCGACGACTACCCCAACAGCCGGAACAAGGTGGTGAAGCTGAGCCTGAA
GCCCTACCGGTTTCGACGTGTACCTGGACAACGGCGTGTACAAGTTCGTGACCGTGAA
GAACCTGGACGTGATCAAGAAGGAGAACTACTACGAGGTGAACAGCAAGTGCTACG
AGGAGGCCAAGAAGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTCATCGCCAGCTTC
TACAAGAACGACCTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTACCGGGTGATCGGCGTGAA
CAACGACCTGCTGAACCGGATCGAGGTGAACATGATCGACATCACCTACCGGGAGT
ACCTGGAGAACATGAACGACAAGCGGCCCCCCCCACATCATCAAGACCATCGCCAGC
AAGACCCAGAGCATCAAGAAGTACAGCACCGACATCCTGGGCAACCTGTACGAGGT
GaaatccAAGAAGCACCCCCAGATCATCAAGAAGGGC (SEQ ID NO: 89)

Направляющая РНК (gRNA)

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся

на ДНК, может предусматривать молекулу Cas, содержащую gRNA или связанную (например, ковалентно) с ней. gRNA представляет собой короткую синтетическую РНК, состоящую из "каркасной" последовательности, необходимой для связывания Cas-белка, и определяемой пользователем целенаправленно воздействующей последовательности из ~20 нуклеотидов для геномной мишени. На практике последовательности направляющих РНК, как правило, разрабатывают таким образом, чтобы они имели длину 17-24 нуклеотида (например, 19, 20 или 21 нуклеотид) и были комплементарными целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Специализированные генераторы и алгоритмы для создания gRNA являются коммерчески доступными для применения в конструировании эффективных направляющих РНК. Редактирование генов также осуществляли с помощью химерных "одиночных направляющих РНК" ("sgRNA"), сконструированной (синтетической) одиночной молекулы РНК, которая имитирует встречающийся в природе комплекс crRNA-tracrRNA и содержит как tracrRNA (для связывания с нуклеазой), так и по меньшей мере одну crRNA (для направления нуклеазы к целевой последовательности для редактирования). Также было продемонстрировано, что химически модифицированные sgRNA являются эффективными для использования с белками Cas; см., например, Hendel et al. (2015) *Nature Biotechnol.*, 985-991.

В некоторых вариантах осуществления gRNA содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной последовательности ДНК, ассоциированной с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК представляет собой, содержит или перекрывает элемент контроля экспрессии, который функционально связан с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления gRNA содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90, 95, 99 или 100% комплементарна последовательности ДНК, ассоциированной с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения с функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, которая предусматривает молекулу Cas, представляет собой sgRNA.

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения с молекулой CRISPR/Cas специфически связывается с последовательностью-мишенью, ассоциированной с экспрессией β -2-микроглобулина. Такая gRNA может содержать мишень-связывающую последовательность, выбранную из:

- GD-28228: TCTCCTTGGTGGCCCGCCGT (SEQ ID NO: 1),
- GD-28229: GTCCCAAAGGCGCGGCGCTG (SEQ ID NO: 2),
- GD-28171: CCCTGCTCCCCGCCGAAAGGG (SEQ ID NO: 3),
- GD-28172: CTCTGGCTCCCCCAGCGCAGC (SEQ ID NO: 4) или
- GD-28173: GTGAACGCGTGGAGGGGCGCT (SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения с доменом CRISPR/Cas специфически связывает последовательность-мишень, ассоциированную с CTCF. В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения с доменом CRISPR/Cas специфически связывает последовательность-мишень, ассоциированную с

промотором. В некоторых вариантах осуществления gRNA связывается с последовательностью-мишенью, перечисленной в таблице 3.

Таблица 3. Иллюстративные последовательности gRNA

Направляющая	Мишень	Последовательность-мишень	Координаты в геноме	SEQ ID NO:
GD-29639	MYC	AGGGTGATGTTTCATTAGCAG	chr8:128746082-128746104	11
GD-29640	MYC	TGCAGAAGGTCCGAAGAAAG	chr8:128746177-128746199	12
GD-27634	β 2M	GAGACAGGTGACGGTCCCTG	chr15:45003632-45003654	13
GD-29500	β 2M	GAGTCTCGTGATGTTTAAGA	chr15:45003545-45003567	14
GD-29542	HSPA1B	CCTGCCCTCTGATTGGTCCA	chr6:31795352-31795374	17
GD-29544	HSPA1B	GCCTCATCGAGCTTGGTGAT	chr6:31795429-31795451	18
GD-29536	GATA1	CTGTGGTGTCAAAAGCACCA	chrX:48641126-48641148	19
GD-29693	GATA1	GAACCCCAGAAGATGCCAGG	chrX:48641245-48641267	20
GD-29499	Промотор β 2M	GGCGCGCACCCCAGATCGGA	chr15:45003481-45003503	21

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает или представляет собой первую молекулу CRISPR/Cas, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает или представляет собой вторую молекулу CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления первая молекула CRISPR/Cas содержит первый белок CRISPR/Cas и первую направляющую РНК, и вторая молекула CRISPR/Cas содержит второй белок CRISPR/Cas и вторую направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления первый белок CRISPR/Cas не связывается в значительной степени (например, не связывается) со второй направляющей РНК, например связывается с K_D , составляющей по меньшей мере 10, 20, 50, 100, 1000 или 10000 нМ, и второй белок CRISPR/Cas не связывается в значительной степени (например, не связывается) с первой направляющей

РНК, например связывается с K_D , составляющей по меньшей мере 10, 20, 50, 100, 1000 или 10000 нМ.

Эффекторные домены TAL

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или содержит эффекторную молекулу TAL. Эффекторная молекула TAL, например эффекторная молекула TAL, которая специфически связывается с последовательностью ДНК, содержит множество эффекторных доменов TAL или их фрагментов и необязательно одну или несколько дополнительных частей встречающихся в природе эффекторов TAL (например, N- и/или C-концевая часть множества эффекторных доменов TAL). Многие эффекторы TAL известны специалистам в данной области и коммерчески доступны, например, от Thermo Fisher Scientific.

TALE представляют собой природные эффекторные белки, секретируемые многочисленными видами бактериальных патогенов, включая патоген растений *Xanthomonas*, который модулирует экспрессию генов в растениях-хозяевах и способствует бактериальной колонизации и выживанию. Специфичное связывание эффекторов TAL определяется центральным доменом повторов из tandemно расположенных почти идентичных повторов, обычно состоящих из 33 или 34 аминокислот (вариабельных диостатков повторов, домена RVD).

Представители семейства эффекторов TAL различаются в основном количеством и порядком своих повторов. Количество повторов находится в диапазоне от 1,5 до 33,5 повтора, и при этом C-концевой повтор обычно короче по длине (например, приблизительно 20 аминокислот) и, как правило, называется "полуповтором". Каждый повтор эффектора TAL характеризуется корреляцией "один повтор - одна пара оснований", при этом разные типы повторов демонстрируют разную специфичность в отношении пары оснований (один повтор распознает одну пару оснований в последовательности гена-мишени). Как правило, чем меньше количество повторов, тем слабее взаимодействия белок-ДНК. Было показано, что количество 6,5 повтора достаточно для активации транскрипции репортерного гена (Scholze et al., 2010).

Вариации от повтора к повтору происходят преимущественно в положениях аминокислот 12 и 13, которые поэтому были названы "гипервариабельными" и которые отвечают за специфичность взаимодействия с последовательностью промотора ДНК-мишенью, которая показана в таблице 2, в которой указаны иллюстративные вариабельные диостатки повторов (RVD) и их соответствие основаниям нуклеиновых кислот-мишеням.

Таблица 2 - RVD и специфичность в отношении оснований нуклеиновых кислот

Мишень	Возможные комбинации аминокислот RVD												
A	NI	NN	CI	HI	KI								
G	NN	GN	SN	VN	LN	DN	QN	EN	HN	RH	NK	AN	FN
C	HD	RD	KD	ND	AD								

T	NG	HG	VG	IG	EG	MG	YG	AA	EP	VA	QG	KG	RG
---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Соответственно, можно модифицировать повторы эффектора TAL для целенаправленного воздействия на определенные последовательности ДНК. Дополнительные исследования показали, что RVD НК может целенаправленно воздействовать на G. Сайты-мишени эффекторов TAL также, как правило, содержат T, фланкирующий целевое 5'-основание для первого повтора, но точный механизм этого распознавания неизвестен. На сегодняшний день известно более 113 эффекторных последовательностей TAL. Неограничивающие примеры эффекторов TAL из *Xanthomonas* включают Nah2, Nah3, Nah4, AvrXa7, AvrXa10 и AvrBs3.

Соответственно, эффекторный домен TAL эффекторной молекулы TAL по настоящему изобретению может быть получен из эффектора TAL любого вида бактерий (например, *Xanthomonas*, таких как африканский штамм *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Yu et al. 2011), штамм 756C *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* и штамм BLS256 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Bogdanove et al. 2011). Как используется в данном документе, эффекторный домен TAL в соответствии с настоящим изобретением содержит домен RVD, а также фланкирующую последовательность(-и) (последовательности на N-концевой и/или C-концевой стороне домена RVD), также из встречающегося в природе эффектора TAL. Он может содержать больше или меньше повторов, чем RVD встречающегося в природе эффектора TAL. Эффекторная молекула TAL по настоящему изобретению разработана для целенаправленного воздействия на данную последовательность ДНК на основе приведенного выше кода и других кодов, известных из уровня техники. Количество эффекторных доменов TAL (например, повторов (мономеров или модулей)) и их конкретная последовательность выбирают на основе требуемой последовательности ДНК-мишени. Например, эффекторные домены TAL, например повторы, могут быть удалены или добавлены, чтобы соответствовать специфической последовательности-мишени. В одном варианте осуществления эффекторная молекула TAL по настоящему изобретению содержит от 6,5 до 33,5 эффекторного домена TAL, например повтора. В одном варианте осуществления эффекторная молекула TAL по настоящему изобретению содержит от 8 до 33,5 эффекторного домена TAL, например повтора, например от 10 до 25 эффекторных доменов TAL, например повторов, например от 10 до 14 эффекторных доменов TAL, например повторов.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная молекула TAL содержит эффекторные домены TAL, которые соответствуют последовательности ДНК-мишени до абсолютного совпадения. В некоторых вариантах осуществления допускается несовпадение между повтором и парой оснований-мишенью в последовательности ДНК-мишени, если это позволяет осуществлять функцию системы репрессии экспрессии, например репрессора экспрессии, содержащей эффекторную молекулу TAL. Как правило, связывание TALE обратно коррелирует с количеством ошибок спаривания. В некоторых вариантах осуществления эффекторная молекула TAL репрессора экспрессии по

настоящему изобретению содержит не более чем 7 ошибок спаривания, 6 ошибок спаривания, 5 ошибок спаривания, 4 ошибки спаривания, 3 ошибки спаривания, 2 ошибки спаривания или 1 ошибку спаривания и необязательно не содержит ошибок спаривания с последовательностью ДНК-мишенью. Без ограничения какой-либо теорией, как правило, чем меньше число эффекторных доменов TAL в эффекторной молекуле TAL, тем меньшее число ошибок спаривания будет допустимо и все еще будет позволять осуществлять функцию системы репрессии экспрессии, например репрессора экспрессии, содержащей эффекторную молекулу TAL. Считается, что аффинность связывания зависит от суммы совпадающих комбинаций повтор-ДНК. Например, эффекторные молекулы TAL, имеющие 25 или более эффекторных доменов TAL, могут допускать до 7 ошибок спаривания.

В дополнение к эффекторным доменам TAL, эффекторная молекула TAL по настоящему изобретению может содержать дополнительные последовательности, полученные из встречающегося в природе эффектора TAL. Длина С-концевой и/или N-концевой последовательности(-ей), включенных с каждой стороны от части, представляющей собой эффекторный домен TAL эффекторной молекулы TAL, может варьироваться и может быть выбрана специалистом в данной области, например на основании исследований Zhang et al. (2011). Zhang et al. охарактеризовали ряд усеченных на С-конце и N-конце мутантных форм в белках на основе TAL-эффекторов, полученных из *Нах3*, и идентифицировали ключевые элементы, которые способствуют оптимальному связыванию с последовательностью-мишенью и, таким образом, активации транскрипции. В целом было обнаружено, что транскрипционная активность обратно коррелирует с длиной N-конца. Что касается С-конца, был идентифицирован важный элемент из ДНК-связывающих остатков в пределах первых 68 аминокислот последовательности *Нах 3*. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления первые 68 аминокислот на С-концевой стороне эффекторных доменов TAL встречающегося в природе эффектора TAL включены в эффекторную молекулу TAL репрессора экспрессии по настоящему изобретению. Соответственно, в варианте осуществления эффекторная молекула TAL по настоящему изобретению содержит 1) один или несколько эффекторных доменов TAL, полученных из встречающегося в природе эффектора TAL; 2) по меньшей мере 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 170, 180, 190, 200, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280 или больше аминокислот из встречающегося в природе эффектора TAL с N-концевой стороны от эффекторных доменов TAL и/или 3) по меньшей мере 68, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 170, 180, 190, 200, 220, 230, 240, 250, 260 или больше аминокислот из встречающегося в природе эффектора TAL с С-концевой стороны от эффектора TAL.

Домены по типу "Zn-пальцев"

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает домен по типу "Zn-пальца". Домен по типу "Zn-пальца" предусматривает белок с "Zn-пальцами", например встречающийся в природе белок с "Zn-пальцами" или сконструированный белок с "Zn-пальцами", или его

фрагмент. Многие белки с "Zn-пальцами" известны специалистам в данной области и коммерчески доступны, например, от Sigma-Aldrich.

В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" предусматривает не встречающийся в природе белок с "Zn-пальцами", который сконструирован таким образом, что он связывается с выбранной последовательностью ДНК-мишенью. См., например, Beerli, et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo, et al. (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan, et al. (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal, et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo, et al. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; патенты США №№ 6453242; 6534261; 6599692; 6503717; 6689558; 7030215; 6794136; 7067317; 7262054; 7070934; 7361635; 7253273; и публикации патентов США №№ 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в своих полных объемах.

Сконструированный белок с "Zn-пальцами" может характеризоваться новой специфичностью связывания по сравнению со встречающимся в природе белком с "Zn-пальцами". Способы конструирования включают без ограничения рациональный дизайн и различные типы отбора. Рациональный дизайн предусматривает, например, использование баз данных, содержащих нуклеотидные последовательности триплетов (или квадруплетов) и отдельные аминокислотные последовательности "Zn-пальцев", в которых каждая нуклеотидная последовательность триплета или квадруплета ассоциирована с одной или несколькими аминокислотными последовательностями "цинковых пальцев", которые связывают конкретную последовательность триплета или квадруплета. См., например, патенты США №№ 6453242 и 6534261, включенные в данный документ посредством ссылки в своих полных объемах.

Иллюстративные способы отбора, в том числе фаговый дисплей и двугибридные системы, раскрыты в патентах США №№ 5789538; 5925523; 6007988; 6013453; 6410248; 6140466; 6200759; и 6242568; а также международных патентных публикациях №№ WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878 и WO 01/88197, а также GB 2338237. Кроме того, усиление специфичности связывания белков с "цинковыми пальцами" описано, например, в международной патентной публикации № WO 02/077227.

Кроме того, как раскрыто в этих и других литературных источниках, домены по типу "цинковых пальцев" и/или белки с несколькими "цинковыми пальцами" могут быть связаны друг с другом с помощью любых подходящих линкерных последовательностей, в том числе, например, линкеров длиной 5 или больше аминокислот. См. также патенты США №№ 6479626; 6903185 и 7153949 в отношении иллюстративных линкерных последовательностей длиной 6 или больше аминокислот. Описанные в данном документе белки могут содержать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными "цинковыми пальцами" белка. Кроме того, усиление специфичности связывания связывающих доменов с "цинковыми пальцами" описано, например, в совместной международной патентной публикации № WO 02/077227.

Белки с "Zn-пальцами" и способы разработки и конструирования слитых белков (и

полинуклеотидов, кодирующих их) известны специалистам в данной области и подробно описаны в патентах США №№ 61400815; 789538; 6453242; 6534261; 5925523; 6007988; 6013453; и 6200759; международных патентных публикациях №№ WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496.

Кроме того, как раскрыто в этих и других литературных источниках, белки с "Zn-пальцами" и/или белки с несколькими "Zn-пальцами" могут быть связаны друг с другом, например, в виде слитого белка, с помощью любых подходящих линкерных последовательностей, в том числе, например, линкеров длиной 5 или больше аминокислот. См. также патенты США №№ 6479626; 6903185 и 7153949 в отношении иллюстративных линкерных последовательностей длиной 6 или больше аминокислот. Домены по типу "Zn-пальцев", описанные в данном документе, могут содержать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными белками с "цинковыми пальцами" и/или белками с несколькими "Zn-пальцами" домена по типу "Zn-пальца".

В определенных вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит домен по типу "Zn-пальца", содержащий сконструированный белок с "цинковыми пальцами", который связывается (специфичным для последовательности образом) с последовательностью ДНК-мишенью. В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит один белок с "Zn-пальцами" или его фрагмент. В других вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит множество белков с "Zn-пальцами" (или их фрагментов), например 2, 3, 4, 5, 6 или больше белков с "Zn-пальцами" (и необязательно не более чем 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 белка с "Zn-пальцами"). В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит по меньшей мере три белка с "Zn-пальцами". В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит четыре, пять или шесть "пальцев". В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит 8, 9, 10, 11 или 12 "пальцев". В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца", содержащий три белка с "Zn-пальцами", распознает последовательность ДНК-мишень, содержащую 9 или 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца", содержащий четыре белка с "Zn-пальцами", распознает последовательность ДНК-мишень, содержащую 12-14 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца", содержащий шесть белков с "Zn-пальцами", распознает последовательность ДНК-мишень, содержащую 18-21 нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит двурукий белок с "Zn-пальцами". Двурукие белки с "цинковыми пальцами" представляют собой белки, в которых два кластера белков с "цинковыми пальцами" разделены промежуточными аминокислотами, так что два домена по типу "цинкового пальца" связываются с двумя прерывистыми последовательностями ДНК-мишенями. Примером двурукого типа связывающего белка с "цинковыми пальцами" является SIP1, где кластер из четырех белков с "цинковыми пальцами" расположен на аминоконце белка, а кластер

из трех белков с "Zn-пальцами" расположен на карбоксильном конце (см. Remade, et al. (1999) *EMBO Journal* 18(18):5073-5084). Каждый кластер "цинковых пальцев" в этих белках способен связываться с уникальной последовательностью-мишенью, а расстояние между двумя последовательностями-мишенями может составлять множество нуклеотидов.

Молекула нуклеиновой кислоты

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или содержит ДНК-связывающий домен из нуклеазы. Например, известны последовательности распознавания хоуминг-эндонуклеаз и мегануклеаз, таких как I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. См. также патенты США №№ 5420032; 6833252; Belfort, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon, et al. (1989) *Gene* 82:115-118; Perler, et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble, et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast, et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 и каталог New England Biolabs. Кроме того, ДНК-связывающая специфичность хоуминг-эндонуклеаз и мегануклеаз может быть сконструирована для связывания неприродных сайтов-мишеней. См., например, Chevalier, et al. (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat, et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth, et al. (2006) *Nature* 441:656-659; Paques, et al. (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; публикацию патента США № 2007/0117128.

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит или представляет собой нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, которая может быть включена в функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, может представлять собой или содержать ДНК, РНК и/или искусственную или синтетическую нуклеиновую кислоту или аналог или имитатор нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может представлять собой или предусматривать одно или несколько из геномной ДНК (gDNA), комплементарной ДНК (cDNA), пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), конъюгата пептид-олигонуклеотид, запертой нуклеиновой кислоты (LNA), мостиковой нуклеиновой кислоты (BNA), полиамида, триплекс-образующего олигонуклеотида, антисмыслового олигонуклеотида, tRNA, mRNA, rRNA, miRNA, gRNA, siRNA или другой молекулы RNAi (например, которая целенаправленно воздействует на некодирующую РНК, которая описана в данном документе, и/или которая целенаправленно воздействует на продукт экспрессии конкретного гена, ассоциированного с геномным комплексом-мишенью, который описан в данном документе) и т. д. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать один или несколько остатков, которые не являются встречающимися в природе остатками ДНК или РНК, может содержать одну или несколько связей, которые не являются сложными фосфодиэфирными связями (например, это могут быть, например, фосфотиоатные связи и т. д.), и/или может содержать одну или несколько модификаций, таких как, например, модификация 2'О, такая как 2'-ОМер. Из уровня техники известны различные структуры нуклеиновых

кислот, пригодные для получения синтетических нуклеиновых кислот (см., например, WO 2017/062862I и WO 2014/012081), при этом специалисты в данной области поймут, что их можно применять в соответствии с настоящим изобретением.

Нуклеиновая кислота, подходящая для применения в репрессоре экспрессии, например в функциональной группе, целенаправленно воздействующей на ДНК, может предусматривать без ограничения ДНК, РНК, модифицированные олигонуклеотиды (например, химические модификации, такие как модификации, которые изменяют скелетные связи, молекулы сахара и/или основания нуклеиновых кислот) и искусственные нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота предусматривает без ограничения геномную ДНК, cDNA, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) или конъюгаты пептидных олигонуклеотидов, запертые нуклеиновые кислоты (LNA), мостиковые нуклеиновые кислоты (BNA), полиамиды, триплекс-образующие олигонуклеотиды, модифицированную ДНК, антисмысловые олигонуклеотиды ДНК, tRNA, mRNA, rRNA, модифицированную РНК, miRNA, gRNA и siRNA или другие молекулы РНК или ДНК.

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит нуклеиновую кислоту длиной от приблизительно 15-200, 20-200, 30-200, 40-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 110-200, 120-200, 130-200, 140-200, 150-200, 160-200, 170-200, 180-200, 190-200, 215-190, 20-190, 30-190, 40-190, 50-190, 60-190, 70-190, 80-190, 90-190, 100-190, 110-190, 120-190, 130-190, 140-190, 150-190, 160-190, 170-190, 180-190, 15-180, 20-180, 30-180, 40-180, 50-180, 60-180, 70-180, 80-180, 90-180, 100-180, 110-180, 120-180, 130-180, 140-180, 150-180, 160-180, 170-180, 15-170, 20-170, 30-170, 40-170, 50-170, 60-170, 70-170, 80-170, 90-170, 100-170, 110-170, 120-170, 130-170, 140-170, 150-170, 160-170, 15-160, 20-160, 30-160, 40-160, 50-160, 60-160, 70-160, 80-160, 90-160, 100-160, 110-160, 120-160, 130-160, 140-160, 150-160, 215-150, 20-150, 30-150, 40-150, 50-150, 60-150, 70-150, 80-150, 90-150, 100-150, 110-150, 120-150, 130-150, 140-150, 15-140, 20-140, 30-140, 40-140, 50-140, 60-140, 70-140, 80-140, 90-140, 100-140, 110-140, 120-140, 130-140, 15-130, 20-130, 30-130, 40-130, 50-130, 60-130, 70-130, 80-130, 90-130, 100-130, 110-130, 120-130, 215-120, 20-120, 30-120, 40-120, 50-120, 60-120, 70-120, 80-120, 90-120, 100-120, 110-120, 15-110, 20-110, 30-110, 40-110, 50-110, 60-110, 70-110, 80-110, 90-110, 100-110, 15-100, 20-100, 30-100, 40-100, 50-100, 60-100, 70-100, 80-100, 90-100, 15-90, 20-90, 30-90, 40-90, 50-90, 60-90, 70-90, 80-90, 15-80, 20-80, 30-80, 40-80, 50-80, 60-80, 70-80, 15-70, 20-70, 30-70, 40-70, 50-70, 60-70, 15-60, 20-60, 30-60, 40-60, 50-60, 15-50, 20-50, 30-50, 40-50, 15-40, 20-40, 30-40, 15-30, 20-30 или 15-20 нуклеотидов или в любом диапазоне между ними.

Домены репрессора

Репрессоры экспрессии по настоящему изобретению содержат один или несколько доменов репрессора. Домен репрессора обладает одной или несколькими функциональными свойствами, которые при применении в качестве части репрессора-экспрессора или системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе, снижают

уровень экспрессии гена-мишени в клетке.

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора характеризуется гистон-модифицирующим функциональным свойством, например гистонметилтрансферазной, гистондеметиلاзной или гистондеацетилазной активностью. В некоторых вариантах осуществления функциональное свойство гистонметилтрансферазы предусматривает H3K9, целенаправленно воздействующий на метилтрансферазную активность. В некоторых вариантах осуществления функциональное свойство гистонметилтрансферазы предусматривает H3K56, целенаправленно воздействующий на метилтрансферазную активность. В некоторых вариантах осуществления функциональное свойство гистонметилтрансферазы предусматривает H3K27, целенаправленно воздействующий на метилтрансферазную активность. В некоторых вариантах осуществления функциональное свойство гистонметилтрансферазы или -деметилазы переносит одну, две или три метильные группы. В некоторых вариантах осуществления функциональное свойство гистондеметилазы предусматривает H3K4, целенаправленно воздействующий на деметилазную активность. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2 или функционального варианта или фрагмента любого из них, например домен SET любого из них. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или предусматривает белок, выбранный из KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66 или функционального варианта или фрагмента любого из них. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или предусматривает белок, выбранный из HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора содержит эпигенетическую модифицирующую функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора характеризуется ДНК-модифицирующим функциональным свойством, например ДНК-метилтрансфераза. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или предусматривает белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, DNMT3a/3L или функционального варианта или фрагмента любого из них.

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора содержит репрессор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления репрессор транскрипции блокирует рекрутинг фактора, который стимулирует или способствует транскрипции, например гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления репрессор транскрипции рекрутирует фактор, который подавляет транскрипцию, например гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора, например репрессор транскрипции,

представляет собой или предусматривает белок, выбранный из KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора способствует эпигенетической модификации, например непосредственно или опосредованно. Например, домен репрессора может опосредованно способствовать эпигенетической модификации путем рекрутирования эндогенного белка, который эпигенетически модифицирует хроматин. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора может непосредственно способствовать эпигенетической модификации путем катализа эпигенетической модификации, где домен репрессора характеризуется ферментативной активностью и непосредственно размещает эпигенетическую метку в хроматине.

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора предусматривает белок, функциональное свойство которого описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или предусматривает белок, выбранный из

KRAB (например, такой, как в соответствии с NP_056209.2, или белок, кодируемый NM_015394.5, например, такой, как в соответствии с SEQ ID NO: 61);

домена SET (например, домен SET из

SETDB1 (например, такой, как в соответствии с NP_001353347.1, или белок, кодируемый NM_001366418.1);

EZH2 (например, такой, как в соответствии с NP-004447.2, или белок, кодируемый NM_004456.5, например, такой, как в соответствии с SEQ ID NO: 65);

G9A (например, такой, как в соответствии с NP_001350618.1, или белок, кодируемый NM_001363689.1, например, такой, как в соответствии с SEQ ID NO: 62) или

SUV39H1 (например, такой, как в соответствии с NP_003164.1, или белок, кодируемый NM_003173.4));

гистондеметилазы LSD1 (например, такая, как в соответствии с NP_055828.2, или белок, кодируемый NM_015013.4, например, такой, как в соответствии с SEQ ID NO: 64);

FOG1 (например, N-концевые остатки FOG1) (например, такой, как в соответствии с NP_722520.2 или белок, кодируемый NM_153813.3, например, такой, как в соответствии с SEQ ID NO: 66);

KAP1 (например, такой, как в соответствии с NP_005753.1, или белок, кодируемый NM_005762.3); или

HDAC8 (например, такого, как в соответствии с NP_001159890, или белок, кодируемый NM_001166418, например, такой, как в соответствии с SEQ ID NO: 63);

функционального фрагмента или варианта любого из них, или

полипептид с последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или предусматривает белок, выбранный из

DNMT3A (например, человеческий DNMT3A) (например, такой, как в соответствии с NP_072046.2,

или белок, кодируемый NM_022552.4, например, такой, как в соответствии с SEQ ID NO: 58);

DNMT3B (например, такой, как в соответствии с или AOX21819.1,

или белок, кодируемый NM_006892.4 или KX447429);

DNMT3L (например, такой, как в соответствии с NP_787063.1,

или белок, кодируемый NM_175867.3);

комплекса DNMT3A/3L (например, такой, как в соответствии с SEQ ID NO: 59 или 60),

бактериального MQ1 (например, такой, как в соответствии с CAA35058.1 или P15840.3, например, такой, как в соответствии с SEQ ID NO: 57 или 90);

функционального фрагмента любого из них или,

полипептид с последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора характеризуется ферментативной активностью.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит мотив спираль-шпилька-спираль (HhH). ДНК-связывающие белки со структурным мотивом HhH могут быть вовлечены в неспецифическое по отношению к последовательности связывание ДНК, которое происходит посредством образования водородных связей между атомами азота каркаса белка и фосфатными группами ДНК.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит мотив спираль-петля-спираль (HLH). ДНК-связывающие белки со структурным мотивом HLH являются белками, регулирующими транскрипцию, и главным образом связаны с широким спектром процессов развития. Структурный мотив HLH длиннее с точки зрения остатков, чем мотивы HTH или HhH. Многие из этих белков взаимодействуют с образованием гомо- и гетеродимеров. Структурный мотив состоит из двух длинных спиральных областей, при этом N-концевая спираль связывается с ДНК, а комплексная область дает возможность белку димеризоваться.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит мотив лейциновой застёжки. В некоторых факторах транскрипции сайт связывания димера с ДНК образует лейциновую застёжку. Этот мотив предусматривает две амфипатические спирали, по одной от каждой субъединицы, взаимодействующие друг с другом с образованием в результате супервторичной структуры с левосторонней суперспиралью. Лейциновая застёжка представляет собой переплетение регулярно расположенных остатков лейцина в одной спирали с лейцинами из прилегающей спирали. В основном спирали, участвующие в лейциновых застёжках, имеют гептадную последовательность

(abcdefg) с остатками а и d, являющимися гидрофобными, и другими остатками являющимися гидрофильными. Мотивы лейциновой застежки могут опосредовать образование как гомо-, так и гетеродимеров.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен предусматривает домен по типу "Zn-пальца", где ион Zn^{++} координируется 2 остатками Cys и 2 остатками His. Такой фактор транскрипции предусматривает тример со стехиометрией $\beta\beta'\alpha$. Очевидным эффектом координации Zn^{++} является стабилизация небольшой комплексной структуры вместо остатков гидрофобного ядра. Каждый "Zn-палец" конформационно идентично взаимодействует с последовательными сегментами пар тройных оснований в большой бороздке двойной спирали. Взаимодействие белок-ДНК определяется двумя факторами: (i) Н-связывающее взаимодействие между α -спиралью и сегментом ДНК, в основном между остатками Arg и основаниями гуанина. (ii) взаимодействие Н-связей с фосфатным остовом ДНК, в основном с Arg и His. Альтернативный мотив "Zn-пальца" хелатирует Zn^{++} с помощью 6 Cys.

Иллюстративный домен репрессора может содержать без ограничения убиквитин, бициклические пептиды в качестве ингибиторов убиквитинлигазы, факторы транскрипции, ферменты модификации ДНК и белка, такие как топоизомеразы, ингибиторы топоизомеразы, такие как топотекан, ДНК-метилтрансферазы, такие как семейство DNMT (например, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L), протеинметилтрансферазы (например, вирусная лизинметилтрансфераза (vSET), протеинлизин-N-метилтрансфераза (SMYD2), деаминазы (например, APOBEC, UG1), гистонметилтрансферазы, такие как энхансер гомолога 2 zeste (EZH2), PRMT1, гистонлизин-N-метилтрансферазу (Setdb1), гистонметилтрансферазу (SET2), эухроматическую гистонлизин-N-метилтрансферазу 2 (G9A), гистонлизин-N-метилтрансферазу (SUV39H1) и G9a), гистондеацетилазу (например, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8), ферменты, играющие роль в деметилировании ДНК (например, ферменты семейства TET катализируют окисление 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин и более высокие окислительные производные), протеиндеметилазы, такие как KDM1A и лизинспецифическая гистондеметилаза 1 (LSD1), репрессоры транскрипции (например, KRAB, FOG1), хеликазы, такие как DHX9, деацетилазы (например, сиртуин 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7), киназы, фосфатазы, ДНК-интеркалирующие средства, такие как бромид этидия, SYBR зеленый и профлавин, ингибиторы эффлюксного насоса, такие как пептидомиметики, подобные фенилаланин-аргинил- β -нафтиламиду или производным хинолина, активаторы и ингибиторы ядерных рецепторов, ингибиторы протеасом, конкурентные ингибиторы ферментов, таких как те, которые участвуют в лизосомных болезнях накопления, ингибиторы синтеза белков, нуклеазы (например, Cpf1, Cas9, нуклеаза с "цинковыми пальцами"), слияния одного или нескольких из них (например, dCas9-DNMT, dCas9-APOBEC, dCas9-UG1) и определенные домены из белков, такие как домен KRAB.

В некоторых вариантах осуществления кандидатный домен может быть определен как подходящий для применения в качестве домена репрессора посредством способов,

известных специалистам в данной области. Например, кандидатный домен репрессора можно тестировать путем анализа того, присутствует ли кандидатный домен репрессора в ядре клетки и надлежащим образом локализован (например, в гене-мишени или элементе контроля транскрипции, функционально связанном с указанным геном-мишенью, например посредством функциональной группы, целенаправленно воздействующей на ДНК), кандидатный домен репрессора снижает уровень экспрессии гена-мишени в клетке, например снижает уровень транскрипта РНК, кодируемого геном-мишенью (например, при измерении посредством RNASeq или нозерн-блоттинга), или снижает уровень белка, кодируемого геном-мишенью (например, при измерении посредством ELISA).

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит множество репрессоров экспрессии, где каждый член из множества репрессоров экспрессии содержит домен репрессора, где каждый домен репрессора не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другим доменом репрессора. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первый домен репрессора, и второй репрессор экспрессии, содержащий второй домен репрессора, где первый домен репрессора не связывается выявляемым образом, например не связывается, со вторым доменом репрессора. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первый домен репрессора, и второй репрессор экспрессии, содержащий второй домен репрессора, где первый домен репрессора не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другим первым доменом репрессора, и второй домен репрессора не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другим вторым доменом репрессора. В некоторых вариантах осуществления домен репрессора для применения в композициях и способах, описанных в данном документе, является функциональным в мономерном состоянии, например отличным от димерного.

В некоторых вариантах осуществления домен репрессора представляет собой или предусматривает эпигенетическую модифицирующую функциональную группу, например, которая модулирует двумерную структуру хроматина (т. е. которая модулирует структуру хроматина таким образом, что это может изменить его двумерное представление).

Эпигенетические модифицирующие функциональные группы, применимые в способах и композициях по настоящему изобретению, предусматривают средства, которые влияют на эпигенетические маркеры, например для метилирования ДНК, метилирования гистонов, ацетилирования гистонов, сумоилирования гистонов, фосфорилирования гистонов и РНК-ассоциированного сайленсинга. Иллюстративные эпигенетические ферменты, которые могут являться мишенью для элемента геномной последовательности, который описан в данном документе, предусматривают ДНК-метилазы (например, DNMT3a, DNMT3b, DNMTL), ферменты деметилирования ДНК (например, семейство TET), гистонметилтрансферазы, гистондеацетилазу (например,

HDAC1, HDAC2, HDAC3), сиртуин 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, лизинспецифическую гистондеметиразу 1 (LSD1), гистонлизин-N-метилтрансферазу (Setdb1), эухроматическую гистонлизин-N-метилтрансферазу 2 (G9a), гистонлизин-N-метилтрансферазу (SUV39H1), энхансер гомолога zeste 2 (EZH2), вирусную лизинметилтрансферазу (vSET), гистонметилтрансферазу (SET2) и протеинлизин-N-метилтрансферазу (SMYD2). Примеры таких эпигенетических модифицирующих средств описаны, например, в de Groote et al. *Nuc. Acids Res.* (2012):1-18.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, например, содержащий эпигенетическую модифицирующую функциональную группу, применимый в данном документе, содержит или представляет собой конструкцию, описанную в Kofler et al. *Genome Medicine* 7.59 (2015):1-3, включенном в данный документ посредством ссылки. Например, в некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит или представляет собой конструкцию, представленную в таблице 1 из Kofler et al., например гистондеацетилазу, гистонметилтрансферазу, для деметилирования ДНК или гистондеметиразу H3K4 и/или H3K9, описанные в таблице 1 (например, dCas9-p300, TALE-TET1, ZF-DNMT3A или TALE-LSD1).

Дополнительные функциональные группы

Репрессор экспрессии может дополнительно содержать одну или несколько дополнительных функциональных групп (например, в дополнение к одной или нескольким функциональным группам, целенаправленно воздействующим на ДНК, и одному или нескольким доменам репрессора). В некоторых вариантах осуществления дополнительная функциональная группа выбрана из меченой или контрольной функциональной группы, расщепляемой функциональной группы (например, расщепляемой функциональной группы, расположенной между функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, и доменом репрессора или на N- или C-концевой части полипептида), малой молекулы, полипептида, перемещающегося через мембрану, или функциональной группы фармакологического средства.

Иллюстративные репрессоры экспрессии

Следующие иллюстративные репрессоры экспрессии представлены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 *S. aureus*, и домен репрессора, предусматривающий MQ1, например бактериальный MQ1. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 91 (например, плазмида, кодирующая репрессор экспрессии), SEQ ID NO: 22 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии) и/или SEQ ID NO: 92 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 22, 91

или 92 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 45 или 89, и/или домен репрессора кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 47.

Последовательность mRNA dCas9-MQ1 (MR-28125)

AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCGACAAGA
AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACC
GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG
AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC
CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
TGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAG
ACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA
GGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
AGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
ACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATG
ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC
GCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT
ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCC
ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA
AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGA
GACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT
GAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT

GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCT
ACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACC
GGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCG
GCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTG
AGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGA
TGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACC
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTG
CAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGA
CCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAG
GCCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGA
ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAC
CTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA
GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACA
GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGT
GATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGG
TGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCG
GCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG
AGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
GCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCT
TCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC

ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCT
 GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
 GCGGCGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAA
 GGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCC
 TTCGCCGGCATCGGCGCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTA
 CGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCA
 TCCACAACAACCTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATG
 ATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCAA
 CGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCA
 AGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACC
 CTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCA
 GGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGG
 GAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCT
 GATGGAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAG
 TGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGC
 CGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCTGA
 ACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGT
 GCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACC
 TGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTAC
 AGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCT
 GACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGG
 AAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAA
 GCGGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCA
 ACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGC
 AGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGA
 AGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCT
 GCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACC
 TCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAA
 AAAAAAAAA (SEQ ID NO: 22)

Последовательность плазмидной ДНК Sa-dCas9-MQ1 (PL-27695)

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGA
 GACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCG
 CGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAG
 ATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAG
 AAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGC
 GATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCA
 AGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGAC
 GGCCAGTGAATTGACGCGTATTGGGATGGTACCTAATACGACTCACTATAAGGAAA
 TAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAA

GAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGCCAAGCGGAACTACATCC
 TGGGCCTGGCCATCGGCATCACCAGCGTGGGCTACGGCATCATCGACTACGAGACC
 CGGGACGTGATCGACGCCGGCGTGCGGCTGTTCAAGGAGGCCAACGTGGAGAACAA
 CGAGGGCCGGCGGAGCAAGCGGGGCGCCCGGCGGCTGAAGCGGCGGCGGCGGCAC
 CGGATCCAGCGGGTGAAGAAGCTGCTGTTGACTACAACCTGCTGACCGACCACAG
 CGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGCCCGGGTGAAGGGCCTGAGCCAGAAGC
 TGAGCGAGGAGGAGTTACGCGCCGCCCTGCTGCACCTGGCCAAGCGGCGGGGCGTG
 CACAACGTGAACGAGGTGGAGGAGGACACCGGCAACGAGCTGAGCACCAGGAGC
 AGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAGGAGAAGTACGTGGCCGAGCTGCAGCT
 GGAGCGGCTGAAGAAGGACGGCGAGGTGCGGGGCAGCATCAACCGGTTCAAGACC
 AGCGACTACGTGAAGGAGGCCAAGCAGCTGCTGAAGGTGCAGAAGGCCTACCACCA
 GCTGGACCAGAGCTTCATCGACACCTACATCGACCTGCTGGAGACCCGGCGGACCT
 ACTACGAGGGCCCCGGCGAGGGCAGCCCCCTTCGGCTGGAAGGACATCAAGGAGTGG
 TACGAGATGCTGATGGGCCACTGCACCTACTTCCCCGAGGAGCTGCGGAGCGTGAA
 GTACGCCTACAACGCCGACCTGTACAACGCCCTGAACGACCTGAACAACCTGGTGA
 TCACCCGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAGTACTACGAGAAGTTCCAGATCATCGAG
 AACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCACCCTGAAGCAGATCGCCAAGGAGATCCT
 GGTGAACGAGGAGGACATCAAGGGCTACCGGGTGACCAGCACCGGCAAGCCCGAG
 TTCACCAACCTGAAGGTGTACCACGACATCAAGGACATCACCGCCCCGGAAGGAGAT
 CATCGAGAACGCCGAGCTGCTGGACCAGATCGCCAAGATCCTGACCATCTACCAGA
 GCAGCGAGGACATCCAGGAGGAGCTGACCAACCTGAACAGCGAGCTGACCCAGGA
 GGAGATCGAGCAGATCAGCAACCTGAAGGGCTACACCGGCACCCACAACCTGAGCC
 TGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGTGGCACACCAACGACAACCAGATC
 GCCATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAGAAGGTGGACCTGAGCCAGCAGAA
 GGAGATCCCCACCACCCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGTGGTGAAGCGGA
 GCTTCATCCAGAGCATCAAGGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCC
 AACGACATCATCATCGAGCTGGCCCCGGGAGAAGAACAGCAAGGACGCCCAGAAGA
 TGATCAACGAGATGCAGAAGCGGAACCGGCAGACCAACGAGCGGATCGAGGAGAT
 CATCCGGACCACCGGCAAGGAGAACGCCAAGTACCTGATCGAGAAGATCAAGCTGC
 ACGACATGCAGGAGGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGAGGCCATCCCCCTGGAGGAC
 CTGCTGAACAACCCCTTCAACTACGAGGTGGACGCCATCATCCCCCGGAGCGTGAG
 CTTGACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGAAGCAGGAGGAGAACAGCAAG
 AAGGGCAACCGGACCCCCCTTCCAGTACCTGAGCAGCAGCGACAGCAAGATCAGCTA
 CGAGACCTTCAAGAAGCACATCCTGAACCTGGCCAAGGGCAAGGGCCGGATCAGCA
 AGACCAAGAAGGAGTACCTGCTGGAGGAGCGGGACATCAACCGGTTACGCGTGACG
 AAGGACTTCATCAACCGGAACCTGGTGGACACCCGGTACGCCACCCGGGGCCTGAT
 GAACCTGCTGCGGAGCTACTTCCGGGTGAACAACCTGGACGTGAAGGTGaatccATCA
 ACGGCGGCTTCACCAGCTTCCTGCGGCGGAAGTGGAAGTTCAAGAAGGAGCGGAAC
 AAGGGCTACAAGCACACGCCGAGGACGCCCTGATCATCGCCAACGCCGACTTCAT
 CTTCAAGGAGTGGAAGAAGCTGGACAAGGCCAAGAAGGTGATGGAGAACCAGATG

TTCGAGGAGAAGCAGGCCGAGAGCATGCCCCGAGATCGAGACCGAGCAGGAGTACA
 AGGAGATCTTCATCACCCCCACCAGATCAAGCACATCAAGGACTTCAAGGACTAC
 AAGTACAGCCACCGGGTGGACAAGAAGCCCAACCGGAAGCTGATCAACGACACCCT
 GTACAGCACCCGGAAGGACGACAAGGGCAACACCCTGATCGTGAACAACCTGAACG
 GCCTGTACGACAAGGACAACGACAAGCTGAAGAAGCTGATCAACAAGAGCCCCGA
 GAAGCTGCTGATGTACCACCACGACCCCCAGACCTACCAGAAGCTGAAGCTGATCA
 TGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAACCCCCTGTACAAGTACTACGAGGAGACCGGC
 AACTACCTGACCAAGTACAGCAAGAAGGACAACGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAA
 GTACTACGGCAACAAGCTGAACGCCACCTGGACATCACCGACGACTACCCCAACA
 GCCGGAACAAGGTGGTGAAGCTGAGCCTGAAGCCCTACCGGTTTCGACGTGTACCTG
 GACAACGGCGTGTACAAGTTCGTGACCGTGAAGAACCTGGACGTGATCAAGAAGGA
 GAACTACTACGAGGTGAACAGCAAGTGCTACGAGGAGGCCAAGAAGCTGAAGAAG
 ATCAGCAACCAGGCCGAGTTCATCGCCAGCTTCTACAAGAACGACCTGATCAAGAT
 CAACGGCGAGCTGTACCGGGTGATCGGCGTGAACAACGACCTGCTGAACCGGATCG
 AGGTGAACATGATCGACATCACCTACCGGGAGTACCTGGAGAACATGAACGACAAG
 CGGCCCCCCCCACATCATCAAGACCATCGCCAGCAAGACCCAGAGCATCAAGAAGTA
 CAGCACCGACATCCTGGGCAACCTGTACGAGGTGaaatccAAGAAGCACCCCCAGATC
 ATCAAGAAGGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGA
 AGAAGGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCTGA
 GGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACG
 AGTACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCCGCCATCGTGATGTACCAG
 GCCATCCACAACAACCTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGA
 GATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGA
 GCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGC
 CATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGC
 GGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCC
 AGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCT
 GTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACC
 TGCTGATGGAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAA
 CCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGA
 ACGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACC
 CTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGA
 AAGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTAC
 AACCTGACCGAGTTCAAGAAaACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGG
 CTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTACCGGGCCCCA
 CCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATC
 CGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGG
 CAAGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCG
 GCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCC
 AGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGA

AGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGcgggcgcttaattaagctgccttc
 tgcggggccttgccctctggccatgcccttcttctccttgcacctgtacctcttggtctttgaataaagcctgagtaggaagtctagaaaaaa
 aaattgtcttctcatcgcc
 tgcagATCCCAATGGCGCGCCGAGCTTGGCTCGAGCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGT
 GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGT
 AAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG
 CCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC
 GCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCG
 CTGCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATA
 CGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC
 AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
 CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
 GACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCC
 TGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTG
 GCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCA
 AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTA
 ACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA
 CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAG
 TGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
 AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCAC
 CGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG
 GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
 ACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCC
 TTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGT
 CTGACAGTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAG
 GATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
 CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTC
 CAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGA
 AATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTT
 TCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAA
 CCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGT
 TAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAG
 CGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTT
 TTCCCAGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATG
 CTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCGGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATC
 TGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATC
 GGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGC
 CCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCA
 AGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATT
 TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAA

CAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAAC
CATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTC
(SEQ ID NO: 91)

Экспрессированная последовательность mRNA Sa-dCas9-MQ1 (MR-28126)

AGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGCCAAGCG
GAACTACATCCTGGGCCTGGCCATCGGCATCACCAGCGTGGGCTACGGCATCATCG
ACTACGAGACCCGGGACGTGATCGACGCCGGCGTGCGGCTGTTCAAGGAGGCCAAC
GTGGAGAACAACGAGGGCCGGCGGAGCAAGCGGGGCGCCCGGCGGCTGAAGCGGC
GGCGGCGGCACCGGATCCAGCGGGTGAAGAAGCTGCTGTTCGACTACAACCTGCTG
ACCGACCACAGCGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGCCCGGGTGAAGGGCCT
GAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAGGAGTTTACGCGCCGCCCTGCTGCACCTGGCCAAGC
GGCGGGGCGTGACACAACGTGAACGAGGTGGAGGAGGACACCGGCAACGAGCTGAG
CACCAAGGAGCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAGGAGAAGTACGTGGCC
GAGCTGCAGCTGGAGCGGCTGAAGAAGGACGGCGAGGTGCGGGGCAGCATCAACC
GGTTCAAGACCAGCGACTACGTGAAGGAGGCCAAGCAGCTGCTGAAGGTGCAGAA
GGCCTACCACCAGCTGGACCAGAGCTTCATCGACACCTACATCGACCTGCTGGAGA
CCCGGCGGACCTACTACGAGGGCCCCGGCGAGGGCAGCCCCTTCGGCTGGAAGGAC
ATCAAGGAGTGGTACGAGATGCTGATGGGCCACTGCACCTACTTCCCCGAGGAGCT
GCGGAGCGTGAAGTACGCCTACAACGCCGACCTGTACAACGCCCTGAACGACCTGA
ACAACCTGGTGATCACCCGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAGTACTACGAGAAGTTC
CAGATCATCGAGAACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCCACCCTGAAGCAGATCGC
CAAGGAGATCCTGGTGAACGAGGAGGACATCAAGGGCTACCGGGTGACCAGCACC
GGCAAGCCCGAGTTCACCAACCTGAAGGTGTACCACGACATCAAGGACATCACCGC
CCGGAAGGAGATCATCGAGAACGCCGAGCTGCTGGACCAGATCGCCAAGATCCTGA
CCATCTACCAGAGCAGCGAGGACATCCAGGAGGAGCTGACCAACCTGAACAGCGAG
CTGACCCAGGAGGAGATCGAGCAGATCAGCAACCTGAAGGGCTACACCGGCACCCA
CAACCTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGTGGCACACCAACG
ACAACCAGATCGCCATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAGAAGGTGGACCTG
AGCCAGCAGAAGGAGATCCCCACCACCCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGT
GGTGAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAAGGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGT
ACGGCCTGCCCAACGACATCATCATCGAGCTGGCCCCGGGAGAAGAACAGCAAGGAC
GCCCAGAAGATGATCAACGAGATGCAGAAGCGGAACCGGCAGACCAACGAGCGGA
TCGAGGAGATCATCCGGACCACCGGCAAGGAGAACGCCAAGTACCTGATCGAGAAG
ATCAAGCTGCACGACATGCAGGAGGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGAGGCCATCCC
CCTGGAGGACCTGCTGAACAACCCCTTCAACTACGAGGTGGACGCCATCATCCCCCG
GAGCGTGAGCTTCGACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGAAGCAGGAGGAGA
ACAGCAAGAAGGGCAACCGGACCCCTTCCAGTACCTGAGCAGCAGCGACAGCAAG
ATCAGCTACGAGACCTTCAAGAAGCACATCCTGAACCTGGCCAAGGGCAAGGGCCG
GATCAGCAAGACCAAGAAGGAGTACCTGCTGGAGGAGCGGGACATCAACCGGTTCA

GCGTGCAGAAGGACTTCATCAACCGGAACCTGGTGGACACCCGGTACGCCACCCGG
 GGCCTGATGAACCTGCTGCGGAGCTACTTCCGGGTGAACAACCTGGACGTGAAGGT
 GaaatccATCAACGGCGGCTTCAACGAGCTTCTGCGGCGGAAGTGGAAGTTCAAGAAG
 GAGCGGAACAAGGGCTACAAGCACACGCGGAGGACGCCCTGATCATCGCCAACGC
 CGACTTCATCTTCAAGGAGTGGAAGAAGCTGGACAAGGCCAAGAAGGTGATGGAGA
 ACCAGATGTTTCGAGGAGAAGCAGGCCGAGAGCATGCCCCGAGATCGAGACCGAGCA
 GGAGTACAAGGAGATCTTCATCACCCCCCACCAGATCAAGCACATCAAGGACTTCA
 AGGACTACAAGTACAGCCACCGGGTGGACAAGAAGCCCAACCGGAAGCTGATCAA
 CGACACCCTGTACAGCACCCGGAAGGACGACAAGGGCAACACCCTGATCGTGAACA
 ACCTGAACGGCCTGTACGACAAGGACAACGACAAGCTGAAGAAGCTGATCAACAA
 GAGCCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACCACGACCCCCAGACCTACCAGAAGCTGA
 AGCTGATCATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAACCCCCTGTACAAGTACTACGAG
 GAGACCGGCAACTACCTGACCAAGTACAGCAAGAAGGACAACGGCCCCGTGATCAA
 GAAGATCAAGTACTACGGCAACAAGCTGAACGCCCACCTGGACATCACCGACGACT
 ACCCCAACAGCCGGAACAAGGTGGTGAAGCTGAGCCTGAAGCCCTACCGGTTTCGAC
 GTGTACCTGGACAACGGCGTGTACAAGTTCGTGACCGTGAAGAACCTGGACGTGAT
 CAAGAAGGAGAACTACTACGAGGTGAACAGCAAGTGCTACGAGGAGGCCAAGAAG
 CTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTCATCGCCAGCTTCTACAAGAACGACCT
 GATCAAGATCAACGGCGAGCTGTACCGGGTGTACGGCGTGAACAACGACCTGCTGA
 ACCGGATCGAGGTGAACATGATCGACATCACCTACCGGGAGTACCTGGAGAACATG
 AACGACAAGCGGCCCCCCCCACATCATCAAGACCATCGCCAGCAAGACCCAGAGCAT
 CAAGAAGTACAGCACCGACATCCTGGGCAACCTGTACGAGGTGaaatccAAGAAGCAC
 CCCCAGATCATCAAGAAGGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG
 CCAAGAAGAAGAAGGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCG
 GGTGTTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGC
 GGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCCGCCATCGTG
 ATGTACCAGGCCATCCACAACAACCTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAG
 CCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAG
 AACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCA
 TCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGAC
 CTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAG
 GACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGA
 GCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTG
 CCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGA
 GGAGCTGAACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATC
 GAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGGGTGTTTCAT
 GATCAGCACCCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGA
 GCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTG
 CTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAaACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAG
 CCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCA

CCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGC
 AGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAG
 CCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCT
 TCGTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATC
 GGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG
 CCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGGcgccgct
 taattaagctgccttctgcggggcttgccttctggccatgcccttcttctccttgcacctgtacctcttggtctttgaataaagcctgagtagg
 aagtctagaaa
 (SEQ ID NO: 92)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 93, 33, 67 или 68. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 93, 33, 67, 68 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Последовательность белка Sa-dCas9-MQ1

MAPKKKRKVGIHGVPAAAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKE
 ANVENNEGRRSKRGARRLRRRRHRIQRVKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLS
 QKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLE
 RLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGP
 GEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDEN
 EKLEYEYEFQIENVFQKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIK
 DITARKEIENAEELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLS
 LKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSI
 KVINAIKKYGLPNDIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKY
 LIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFYEVDAIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEN
 SKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDF
 INRNLDVTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYK
 HHAEDALIIANADFIFKEWKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQ
 IKHIKDFKDYKYSHRVDKKNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLK
 KLINKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGP
 VIKKIKYYGNKLNALHDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYPFDVYLDNGVYKFVTVKNLDV
 IKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIE
 VNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGK
 RPAATKKAGQAKKKKARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGL
 AEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRK
 KDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSG
 TRSGLLWEIERALDSTEKNLDPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSI
 EVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYN

LTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSD
ETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSSGGKRPAATKK
AGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 93)

Аминокислотная последовательность dCas9-MQ1

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLN
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGA
QRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKT
LSWNSKNPVSNNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFP
CQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEE
ELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKK
VLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASG
ANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAI
IDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 33)

Sa-dCas9-MQ1 без HA-метки

MAPKKKRKVGIHGVPAAAKRNILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKE
ANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLS
QKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLE
RLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGP

GEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDEN
 EKLEYEYEFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIK
 DITARKEIENAEELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLS
 LKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSI
 KVINAIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKY
 LIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFNYEVDIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEEEN
 SKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDF
 INRNLDVTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYK
 HHAEDALIIANADFIKKEWKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQ
 IKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLK
 KLINKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGP
 VIKKIKYYGNKLNALHDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYPFDVYLDNGVYKFVTVKNLDV
 IKKENYYEVNSKCYEEAKKLLKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIE
 VNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGK
 RPAATKKAGQAKKKKARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGL
 AEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRK
 KDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSG
 TRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSI
 EVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLN KIVSEKDILNNLLKYN
 LTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSD
 ETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIDKIGGPSSGGKRPAATKK
 AGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 67)

dCas9-MQ1 без HA-метки

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSSFF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLR LIYLAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKD KDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFANRNF MQ L
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA

VVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSF EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGA
 QRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKT
 LSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKRTLNIDLLTYSFP
 CQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNLDPKYLLMENVGALLHKKNEE
 ELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKSIKK
 VLNKIVSEKDILNNLLKYNLT EFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASG
 ANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAI
 IDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 68)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и домен репрессора, предусматривающий KRAB, например домен KRAB. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 94 (например, плаزمид, кодирующая репрессор экспрессии) и/или 95 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 94 или 95 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Последовательность плазмидной ДНК Sp-dCas9-KRAB (PL-27687)

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGA
 GACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCG
 CGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAG
 ATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAG
 AAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGC
 GATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCA
 AGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGAC
 GGCCAGTGAATTGACGCGTATTGGGATGGTACCTAATACGACTCACTATAAGGAAA
 TAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAA
 GAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCGACAAGAAGTACAGCATCG
 GCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCGGTGATCACCGACGAGTACAAG
 GTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAA
 GAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGC

TGAAGCGGACCGCCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTG
 CAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCT
 GGAGGAGAGCTTCTTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCG
 GCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTG
 CGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGC
 CCTGGCCCCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCC
 CGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGC
 TGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGC
 GCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCCGGCGA
 GAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCA
 ACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC
 ACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGA
 CCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCG
 GGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACG
 ACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCAGCAGCTGCCC
 GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACAT
 CGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGA
 AGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGG
 AAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCT
 GCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGG
 AGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCC
 GGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGaatatccGAGGAGACCATCACCCCTG
 GAATTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGA
 TGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTG
 CTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGA
 GGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACC
 TGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTC
 AAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAA
 CGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCC
 TGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTG
 TTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAaACCTACGCCACCTGTTTGA
 CGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTG
 AGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGG
 ACTTCCTGaatccGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGAC
 AGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACA
 GCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATC
 CTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCC
 CGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAG
 AAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCA
 GCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTG

[illegible]

CCCAATGGCGCGCCGAGCTTGGCTCGAGCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAAT
TGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGC
CTGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCG
TTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG
GAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCG
CTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT
ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAA
AAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC
CCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG
ACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCC
GACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT
TTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTG
GGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT
AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG
GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC
AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTG
GTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC
AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCAC
GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAA
ATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACA
GTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTAT
CAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGG
CAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACA
TCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCA
CCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAG
ACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAA
CCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAAAA
GGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATC
AACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCA
GGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGAT
GGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAAC
ATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTT
CCCATAACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTT
ATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGT
TTCCCGTTGAATATGGCTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAG
GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATA
GGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATT
ATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC (SEQ ID
NO: 94)

Экспрессированная последовательность mRNA Sp-dCas9-KRAB (MR-28122)

AGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
 GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCGGACAAGA
 AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACC
 GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
 CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG
 AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
 GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
 TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
 CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC
 CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
 TGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
 GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAG
 ACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA
 GGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
 AGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
 GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
 GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
 ACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
 GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGCCAGCATG
 ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC
 GCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT
 ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
 CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
 GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCC
 ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA
 AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
 GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGaaatccGAGGAGA
 CCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGC
 TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCC
 CAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGA
 AGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAG
 GCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAA
 GGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGG
 AGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAG
 GACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT
 GACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAaACCTACG
 CCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGC
 TGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCA
 AGACCATCCTGGACTTCCTGaaatccGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTG

ATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGG
 CCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCA
 AGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGC
 CGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCAGACCACCA
 GAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAG
 GAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAA
 CGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGG
 AGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCCAGAGC
 TTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGGCCCCG
 GGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTAC
 TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGAC
 CAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGC
 AGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAGCCGG
 ATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCA
 CCCTGaaatccAAGCTGGTGGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGG
 GAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCAC
 CGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACA
 AGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGC
 CACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCAC
 CCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCG
 GCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGC
 ATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAaACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAA
 GGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGAC
 TGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCT
 GGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGaaatccGTGAAGGAGCT
 GCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCC
 TGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
 GTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCG
 AGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTAC
 CTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGC
 AGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC
 GAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGC
 CTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACC
 TGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCA
 TCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCAC
 CAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGA
 CAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGCCAGC
 GACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTT
 CGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGT
 ACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTG

ACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGA
 GCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGA
 GCAGCGTGAGCGGGCGGCAAGCGGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAA
 GAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGcgggcgcttaattaa
 gctgccttctcggggcttgcccttctggccatgcccttctctcccttgccctgtaccttggctttgaataaagcctgagtaggaagtcta
 gaaa (SEQ
 ID NO: 95)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 96 или 72. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 72 или 96 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Последовательность белка Sp-dCas9-KRAB

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKASDAKSLTAWSR TLVTFKDV FVDFT
 REEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQET

HPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVDPDYA (SEQ ID NO: 96)

MAPKKRKRKVGIVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEFSNEMAKVDDSSF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVSTDKADLRILIYAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLA
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKASDAKSLTAWSTLVTFKDFVDFDFT
REEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQET
HPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 72)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и домен репрессора, предусматривающий DNMT1, например домен DNMT1. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

dCas9-DNMT1 (MR-29419)

AGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG

GCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGACAAGA
AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACC
GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG
AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC
CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
TGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAG
ACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA
GGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
AGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
ACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATG
ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC
GCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT
ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCC
ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA
AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGA
GACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
GTTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT
GAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT
GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCT
ACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACC
GGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCG
GCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTG
AGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGC

CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGA
TGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACC
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTG
CAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGA
CCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAG
GCCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGA
ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAC
CTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA
GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACA
GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGT
GATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGG
TGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCG
GCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG
AGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
GCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCT
TCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
GCGGCGACAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAA
GAAGAAGAAGTCGGGCGGGGGTGGCTCAGTGGATCTGAGGACACTCGACGTGTTTA
GCGGATGCGGCGGACTCTCCGAAGGCTTCCACCAAGCCGGAATTTCCGACACACTCT
GGGCCATTGAGATGTGGGACCCCGCCGCTCAAGCCTTCAGACTGAATAATCCCGGCT
CCACCGTGTTACCCGAGGACTGCAACATTCTGCTGAAGCTGGTGGTGGCTGGCGAA
ACCACCAACTCTAGAGGCCAGAGGCTGCCCCAGAAGGGAGATGTGGAAATGCTCTG

TGGAGGCCCTCCTTGCCAAGGCTTCTCCGGCATGAACAGGTTCAACTCTAGAACATA
 CAGCAAGTTCAAGAACTCTCTGGTCGTGAGCTTTCTGAGCTACTGCGACTACTATAG
 ACCTAGGTTCTTTCTGCTGGAGAACGTGAGAAATTTCTGTGTCCTTCAAGAGGAGCAT
 GGTGCTGAAGCTGACACTGAGGTGTCTGGTGAGGATGGGCTACCAAGTGCACATTCTG
 GAGTGCTGCAAGCTGGCCAGTACGGCGTGGCCCAGACCAGAAGGAGGGGCCATCATT
 CTGGCTGCTGCCCCCGGCGAGAACTCCCTCTGTTCCCCGAGCCCCCTCCACGTGTTC
 GCCCCTAGAGCTTGCCAGCTGAGCGTGGTGGTCGACGATAAGAAGTTCGTGAGCAA
 CATCACAAGGCTGTCCAGCGGACCCTTCAGAACCATTACCGTGAGGGATACCATGTC
 CGACCTCCCCGAGGTGAGGAATGGCGCCAGCGCTCTGGAGATTTCTACAACGGCG
 AACCTCAGAGCTGGTTCCAAAGGCAGCTGAGAGGCGCTCAGTATCAGCCCATTCTG
 AGGGACCACATCTGCAAAGATATGAGCGCTCTGGTGGCCGCTAGAATGAGACATAT
 TCCTCTGGCCCCCGGCAGCGACTGGAGAGATCTGCCCAATATTGAGGTGAGACTCA
 GCGACGGAACAATGGCTAGAAAAGTGGTACACCCATCATGATAGAAAGAACGG
 AAGGAGCAGCAGCGGCGCTCTGAGAGGAGTGTGTAGCTGCGTGGAAGCTGGCAAG
 GCTTGCGATCCCGCCGCTAGGCAGTTCAATACCCTCATCCCTTGGTGTCTGCCTCAC
 ACCGGCAACAGACACAATCATTGGGCTGGACTGTATGGAAGGCTCGAATGGGACGG
 CTTTTTCAGCACCAACCGTGACCAATCCCGAACCTATGGGCAAGCAAGGAAGGGTGC
 TCCACCCCGAGCAGCATAGAGTCGTGTCCGTGAGAGAATGCGCTAGAAGCCAAGGC
 TTCCCGGACACCTATAGACTGTTCCGGCAACATTCTGGATAAGCACAGACAAGTGGG
 AAATGCTGTCCCTCCTCCTCTGGCCAAGGCTATCGGACTGGAGATCAAGCTGTGTAT
 GCTCGCCAAGCTAGGGAGAGCGCTTCCGCCAAGATTAAGGAGGAGGAGGCCGCCA
 AGGACGGAGGTGGCGGATCGGGAAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGTCA
 GGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGCGG
 CCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTC
 CCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAA
 AA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 23)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или 69. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или 69 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

dCas9-DNMT

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLN

LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKQILQTVKVVDELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVA AIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAAATKKAGQAKKKKSGGGGSVDLRTLDFVSGCGGLS
 EGFHQAGISDTLWAIEMWDPAQAFLNNPGSTVFTEDCNILLKLV MAGETTNSRGQR
 LPQKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFNRSRTYSKFKNLSLVVSFLSYCDYYRPRFFLLENVR
 NFVSFKRSMVLKLT LRCLVRMGYQCTFGVLQAGQYGVAQTRRRAILAAPGEKLPLFP
 EPLHVFAPRACQLSVVVDKKFVSNITRLSSGPFRTITVRDTMSDLPEVRNGASALEISY
 NGE PQSWFQRQLRGAQYQPILRDHICKDMSALVAARMRHIPLAPGSDWRDLPNIEVRLS
 DGTMARKLRYTHHDRKNRSGSSGALRGVCSCVEAGKACDPAARQFNTLIPWCLPHTG
 NRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVLHPEQHRVSVVRECARSQGFDP
 TYRLFGNILDKHRQVGNVPPPLAKAIGLEIKLCMLAKARESASAKIKEEEAAKDGGGG
 SGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 34)

dCas9-DNMT без HA-метки

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSSF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERLKT

YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLQ
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKGILQTVKVVDLVKVMGRHK
PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVA AIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGGSPEDNEQKQLFVEQHKKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSVDLRTLDFVSGCGGLS
EGFHQAGISDTLWAIEMWDPAQAFLNNPGSTVFTEDCNILLKLV MAGETTNSRGQR
LPQKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFNRSRTYSKFKNLSLVVSFLSYCDYYRPRFFLLENVR
NFVSFKRSMVLKLT LRCLVRMGYQCTFGVLQAGQYGVAQTRRRAILAAAPGEKLP LFP
EPLHVFAPRACQLSVVVDK K FVSNITRLSSGPFRTITVRDTMSDLPEVRNGASALEISY
NGEPQSWFQRQLRGAQYQPILRDHICKDMSALVAARMRHIPLAPGSDWRDLPNIEVRLS
DGTMARKLRYTHHDRKNRSGSSGALRGVCSCVEAGKACDPAARQFNTLIPWCLPHTG
NRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVLHPEQHRVSVSRECAR SQGFPD
TYRLFGNILDKHRQVGNAVPPPLAKAIGLEIKLCMLAKARESASAKIKEEEAAKDGGGG
SGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 69)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и домен репрессора, предусматривающий DNMT3a/3L. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 24 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая полностью человеческий репрессор экспрессии) и/или 25 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая химерный репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 24 или 25 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

dCas9-DNMT 3a/3L (h) (MR-29414)

AGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCGACAAGA
AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCGGTGATCACC
GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG

AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC
CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
TGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAG
ACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA
GGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
AGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
ACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATG
ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC
GCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT
ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCC
ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA
AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGA
GACCATACCCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT
GAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT
GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCT
ACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACC
GGCTGGGGCCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCG
GCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTG
AGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGA
TGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACC
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTG

CAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGA
CCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAG
GCCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGA
ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAC
CTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA
GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACA
GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGT
GATCACCTTGAAATCCAAGCTGGTGGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGG
TGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCG
GCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG
AGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
GCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCT
TCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
GCGGCGACAGCGCCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGG
CAGCGGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGCCGCCGCCGGCAGCAACCACGACCAG
GAGTTCGACCCCCCAAGGTGTACCCCCCGTGCCCGCCGAGAAGCGGAAGCCCAT
CCGGGTGCTGAGCCTGTTCGACGGCATCGCCACCGGCCTGCTGGTGCTGAAGGACCT
GGGCATCCAGGTGGACCGGTACATCGCCAGCGAGGTGTGCGAGGACAGCATCACCG
TGGGCATGGTGCGGCACCAGGGCAAGATCATGTACGTGGGCGACGTGCGGAGCGTG
ACCCAGAAGCACATCCAGGAGTGGGGCCCCCTTCGACCTGGTGATCGGCGGCAGCCC
CTGCAACGACCTGAGCATCGTGAACCCCGCCCGGAAGGGCCTGTACGAGGGCACCG
GCCGGCTGTTCTTCGAGTTCTACCGGCTGCTGCACGACGCCCGGCCCAAGGAGGGCG
ACGACCGGCCCTTCTTCTGGCTGTTCGAGAACGTGGTGGCCATGGGCGTGAGCGACA

AGCGGGACATCAGCCGGTTCCTGGAGAGCAACCCCGTGATGATCGACGCCAAGGAG
 GTGAGCGCCGCCACCGGGCCCGGTACTTCTGGGGCAACCTGCCCGGCATGAACCG
 GCCCCTGGCCAGCACCGTGAACGACAAGCTGGAGCTGCAGGAGTGCCTGGAGCACG
 GCCGGATCGCCAAGTTCAGCAAGGTGCGGACCATCACCACCCGGAGCAACAGCATC
 AAGCAGGGCAAGGACCAGCACTTCCCCGTGTTTCATGAACGAGAAGGAGGACATCCT
 GTGGTGCACCGAGATGGAGCGGGTGTTTCGGCTTCCCCGTGCACTACACCGACGTGA
 GCAACATGAGCCGGCTGGCCCCGGCAGCGGCTGCTGGGCCGGAGCTGGAGCGTGCCC
 GTGATCCGGCACCTGTTTCGCCCCCCTGAAGGAGTACTTCGCCTGCGTGAGCAGCGGC
 AACAGCAACGCCAACAGCCGGGGGCCAGCTTCAGCAGCGGCCTGGTGCCCCTGAG
 CCTGCGGGGCAGCCACATGAATCCTCTGGAGATGTTTCGAGACAGTGCCCGTGTGGA
 GAAGGCAACCCGTGAGGGTGCTGAGCCTCTTCGAGGACATTAAGAAGGAGCTGACC
 TCTCTGGGCTTTCTGGAATCCGGCAGCGACCCCGGCCAGCTGAAACACGTGGTGGAC
 GTGACCGACACAGTGAGGAAGGACGTGGAAGAGTGGGGCCCCTTTGACCTCGTGTA
 TGGAGCCACACCTCCTCTCGGCCACACATGCGATAGGCCTCCCAGCTGGTATCTCTT
 CCAGTTCCACAGACTGCTCCAGTACGCCAGACCTAAGCCCGGCAGCCCCAGACCCTT
 CTTCTGGATGTTTCGTGGACAATCTGGTGCTGAACAAGGAGGATCTGGATGTGGCCAG
 CAGATTTCTGGAGATGGAACCCGTGACAATCCCCGACGTGCATGGCGGCTCTCTGCA
 GAACGCCGTGAGAGTGTGGTCCAACATCCCCGCCATTAGAAGCAGACACTGGGCTC
 TGGTGAGCGAGGAGGAAGTGTCTCTGCTGGCCCCAGAATAAGCAGTCCTCCAAGCTG
 GCCGCCAAGTGGCCCACCAAGCTGGTGAAGAACTGCTTTCTGCCTCTGAGGGAGTAT
 TTCAAGTATTTTCAGCACCGAACTGACCAGCAGCCTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGC
 CGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGAC
 GTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCT
 TCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGC
 CTGAGTAGGAAGTCTAGAAA
 AA (SEQ ID NO: 24)

dCas9-DNMT3a/3L (m) (MR-28195)

AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
 GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGACAAGA
 AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACC
 GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
 CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG
 AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
 GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
 TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
 CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC
 CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
 TGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
 GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAG
 ACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA

GGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
AGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCCAGATCGGCG
ACCAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATG
ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCG
GCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT
ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCC
ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA
AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGA
GACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT
GAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT
GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCT
ACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACC
GGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCG
GCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTG
AGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGACGAGCTGGTGAAGGTGA
TGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACC
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTG
CAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGA
CCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAG
GCCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGA
ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAC
CTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA
GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACA
GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGT

GATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGG
TGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCG
GCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG
AGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
GCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCT
TCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
GCGGCGACAGCGCCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CAGCGGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGCCGCCGCCGGCAGCAACCACGACCAG
GAGTTCGACCCCCCAAGGTGTACCCCCCGTGCCCGCCGAGAAGCGGAAGCCCAT
CCGGGTGCTGAGCCTGTTCGACGGCATCGCCACCGGCCTGCTGGTGCTGAAGGACCT
GGGCATCCAGGTGGACCGGTACATCGCCAGCGAGGTGTGCGAGGACAGCATCACCG
TGGGCATGGTGCGGCACCAGGGCAAGATCATGTACGTGGGCGACGTGCGGAGCGTG
ACCCAGAAGCACATCCAGGAGTGGGGCCCCCTTCGACCTGGTGATCGGCGGCAGCCC
CTGCAACGACCTGAGCATCGTGAACCCCGCCCGGAAGGGCCTGTACGAGGGCACCG
GCCGGCTGTTCTTCGAGTTCTACCGGCTGCTGCACGACGCCCGGCCCAAGGAGGGCG
ACGACCGGCCCTTCTTCTGGCTGTTCGAGAACGTGGTGGCCATGGGCGTGAGCGACA
AGCGGGACATCAGCCGGTTCCTGGAGAGCAACCCCGTGATGATCGACGCCAAGGAG
GTGAGCGCCGCCACCGGGCCCGGTACTTCTGGGGCAACCTGCCCGGCATGAACCG
GCCCCCTGGCCAGCACCGTGAACGACAAGCTGGAGCTGCAGGAGTGCCTGGAGCACG
GCCGGATCGCCAAGTTCAGCAAGGTGCGGACCATCACCAACCGGAGCAACAGCATC
AAGCAGGGCAAGGACCAGCACTTCCCCGTGTTTCATGAACGAGAAGGAGGACATCCT
GTGGTGACCGAGATGGAGCGGGTGTTTCGGCTTCCCCGTGCACTACACCGACGTGA
GCAACATGAGCCGGCTGGCCCGGCAGCGGCTGCTGGGCCGGAGCTGGAGCGTGCCC
GTGATCCGGCACCTGTTCGCCCCCTGAAGGAGTACTTCGCCTGCGTGAGCAGCGGC

AACAGCAACGCCAACAGCCGGGGCCCCAGCTTCAGCAGCGGCCTGGTGCCCCTGAG
 CCTGCGGGGCAGCCACATGGGCCCCATGGAGATCTACAAGACCGTGAGCGCCTGGA
 AGCGGCAGCCCGTGCGGGTGCTGAGCCTGTTCCGGAACATCGACAAGGTGCTGAAA
 TCCCTGGGCTTCCTGGAGAGCGGCAGCGGCAGCGGCGGCGGCACCCTGAAGTACGT
 GGAGGACGTGACCAACGTGGTGCGGGCGGGACGTGGAGAAAGTGGGGCCCCCTTCGACC
 TGGTGTACGGCAGCACCCAGCCCCCTGGGCAGCAGCTGCGACCGGTGCCCCGGCTGG
 TACATGTTCCAGTTCCACCGGATCCTGCAGTACGCCCTGCCCCGGCAGGAGAGCCAG
 CGGCCCTTCTTCTGGATCTTCATGGACAACCTGCTGCTGACCGAGGACGACCAGGAG
 ACCACCACCCGGTTTCTGCAGACCGAGGCCGTGACCCTGCAGGACGTGCGGGGGCCG
 GGACTACCAGAACGCCATGCGGGTGTGGAGCAACATCCCCGGCCTGAAATCCAAGC
 ACGCCCCCTGACCCCCAAGGAGGAGGAGTACCTGCAGGCCCAGGTGCGGAGCCGG
 AGCAAGCTGGACGCCCCCAAGGTGGACCTGCTGGTGAAGAACTGCCTGCTGCCCCT
 GCGGGAGTACTTCAAGTACTTCAGCCAGAACAGCCTGCCCCCTGAGCGGCGGCAAGC
 GGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCC
 CTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGG
 CTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAA
 TAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAA (SEQ
 ID NO: 25)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, 36, 70 или 71. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, 36, 70 или 71 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

dCas9-DNMT3a/3L (h)

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLA
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHK

PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSAGGGGSGGGGSGGGGSGPKKKRKVAAAGSNHDQEFDPK
 VYPPVPAEKRPVLSLFDGIATGLLVKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKI
 MYVGDVRSVTQKHIEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHD
 ARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNL
 PGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFVFMNEKEDI
 LWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGN
 SNANSRGPSSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFTVPVWRRQPVRVLSLFDIKKELTSGLFL
 ESGSDPGQLKHVVDTDTVRKDVVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRL
 QYARPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRLEMPEVTIPDVHGGSLQNAVRVWS
 NIPAIRSRHWALVSEEELSLAQNKQSSKLAAKWPTKLVKNCFLPLREYFKYFSTELTSS
 LSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVDPYA (SEQ ID NO: 35)

dCas9-DNMT3a/3l (m)

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLN
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVDELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT

LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHARDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSAGGGGSGGGGSGGGGSGPKKKRKVAAAGSNHDQEFDPK
 VYPPVPAEKRKPIRVL SLDGIATGLLV LKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKI
 MYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHD
 ARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNL
 PGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDI
 LWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGN
 SNANSRGPSSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFTVPVWRRQPVRVLSL FEDIKKELTS LGFL
 ESGSDPGQLKHVV DVTDTVRKDV EEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRL
 QYARPKGPSRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPV TIPDVHGGSLQNAVRVWS
 NIPAIRSRHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLA AKWPTKL VKNCFLPLREYFKYFSTELTSS
 LSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDV PDYA (SEQ ID NO: 36)

dCas-DNMT3a/3L (h) без HA-метки

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSSFF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFANRNF MQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVD ELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EGikelGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDAKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHARDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ

SITGLYETRIDLSQLGGDSAGGGGSGGGGSGGGGSGPKKKRKVAAAGSNHDQEFDPK
 VYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKI
 MYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHD
 ARPKEGDDRPFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNL
 PGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDI
 LWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGN
 SNANSRGPSSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFTVPVWRRQPVRVLSLFDIKKELTSLGFL
 ESGSDPGQLKHVVDTDTVRKDVVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRL
 QYARPKPGSPRPFWMFVDNLVLNKEDLDVASRLEMPTIPDVHGGSLQNAVRVWS
 NIPAIRSRHWALVSEEELSLAQNKQSSKLAAKWPTKLVKNCFLPLREYFKYFSTELTSS
 LSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 70)

dCas9-DNMT3a/3L (m) без HA-метки

MAPKKKKRKGIVHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRILIYAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVA AIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSAGGGGSGGGGSGGGGSGPKKKRKVAAAGSNHDQEFDPK
 VYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKI
 MYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHD
 ARPKEGDDRPFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNL
 PGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDI

LWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGN
 SNANSRGPSSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFTVPVWRRQPVRVLSLFEDIKKELTSLGFL
 ESGSDPGQLKHVVDTVTDTVRKDVVEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRLL
 QYARPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPV TIPDVHGGSLQNAVRVWS
 NIPAIRSRHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLA AKWPTKLVKNCFLPLREYFKYFSTELTSS
 LSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 71)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и домен репрессора, предусматривающий G9A, например домен G9A. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

G9A-dCas9 (MR-29387)

AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
 GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCTCGGGCGG
 GGGTGGCTCAGGAAATAGGGCTATCAGAACCGAGAAGATCATCTGTAGGGACGTGG
 CTAGAGGCTACGAGAACGTGCCCATTCTTGCGTGAATGGCGTGGATGGCGAACCTT
 GCCCCGAGGACTACAAATACATCTCCGAGAACTGCGAAACCAGCACAAATGAACATC
 GACAGAAACATCACCCACCTCCAGCACTGCACATGTGTGGATGACTGCTCCTCCAGC
 AACTGTCTGTGCGGCCAGCTCTCCATCAGATGCTGGTACGACAAGGACGGCAGACT
 GCTGCAAGAGTTCAACAAGATCGAACCCCTCTCATCTTCGAGTGTAACCAAGCTTG
 CAGCTGCTGGAGAACTGCAAGAATAGAGTGGTCCAGAGCGGCATCAAGGTGAGAC
 TGCAACTGTACAGAACCGCCAAGATGGGATGGGGAGTGAGGGCTCTGCAAACCATT
 CCCCAGGCACCTTCATCTGCGAATACGTGGGCGAACTGATCTCCGACGCCGAAGCT
 GACGTGAGAGAGGACGACAGCTATCTCTTCGATCTGGACAATAAGGACGGCGAGGT
 GACTGCATCGACGCTAGATATTACGGCAACATCTCTAGATTCATCAACCACCTCTG
 CGATCCCAACATCATTCCCGTGAGGGTGTTTCATGCTGCACCAAGATCTGAGGTTCCC
 TAGAATCGCCTTCTTCAGCTCTAGAGACATCAGAACCGGCGAGGAGCTGGGCTTCG
 ATTACGGCGATAGATTCTGGGACATCAAGTCCAAGTACTTCACATGCCAGTGCGGCA
 GCGAGAAGTGTAAGCACAGCGCTGAGGCCATTGCTCTGGAGCAGTCTAGACTGGCC
 AGACTGGATGGAGGTGGCGGATCGGGAGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGCCAT
 CGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCA
 AGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATC
 GGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGAC
 CGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCT

TCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGC
TTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGT
GGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGC
TGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCAC
ATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAG
CGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGG
AGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTG
AGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGA
ACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGA
GCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGAC
GACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCT
GGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACA
CCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCAC
CACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTA
CAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCG
GCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGAC
GGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGC
GGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCC
ATCCTGCGGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGAT
CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGGCAA
CAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAAC
TCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACC
AACTTCGACAAGAACCTGCCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTA
CGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCA
TGCGGAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTG
TTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAA
GATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCA
GCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGAC
AACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTTCGA
GGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCTACGCCACCTGTTTCGACGACA
AGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCG
GAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCC
TGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGC
CTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGC
AGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGA
GAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGAGAAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAG
AACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCC
AGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAA

CCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACG
 ACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGGCCCGGGGCAAGAGCGA
 CAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGGCAGCTG
 CTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCG
 GGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGA
 CCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAG
 TACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAATCCAA
 GCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACA
 ACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATC
 AAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGA
 CGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAG
 TACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAAC
 GGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGT
 GTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGG
 TGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATC
 CTGCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCA
 AGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCC
 AAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCA
 TCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCC
 AAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCT
 GTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGA
 AGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGC
 CACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGT
 GGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCA
 AGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAG
 CACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCT
 GACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGA
 AGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATC
 ACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGCGACAGCGGCGG
 CAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGC
 TACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTG
 CGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTC
 TTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAA
 A (SEQ ID NO: 26)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38 или 73. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38 или 73 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с

ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

G9a-dCas9

MAPKKKRKVGIHGVPAASGGGGSGNRAIRTEKIICRDVARGYENVPIPCVNGVD
 GEPCPEDYKYISENCETSTMNIDRNITHLQHCTCVDDCSSSNCLCGQLSIRCWYDKDGR
 LQEFNKIEPPLIFECNQACSCWRNCKNRVVQSGIKVRLQLYRTAKMGWGVRLQTI
 PQGTFICEYVGELISDAEADVREDDSYLFDLDNKDGEVYCIDARYYGNISRFINHLCD
 PNIPVRVFMHLHQDLRFPRIAFFSSRDITGEELGFDYGDRFWDIKSKYFTCQCGSEKCKH
 SAEAI ALEQSRLARLDGGGGSGDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
 KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEE
 SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADRLRIYLALAHMIK
 FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL
 E NLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLDNLLAQIG
 DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
 PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQR
 TFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW
 MTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNE
 LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISG
 VEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLEFEDREMIEERLKTYAHLF
 DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDS
 LTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
 EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNG
 RDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVK
 KMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQIL
 DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNAV
 VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLA
 NGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPK
 RNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVEKGKSKKLKSVKELLGITIMER
 SSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSK
 YVNFLYLASHYEKLKGSPEQNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL
 SAYNKHARDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI
 TGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 38)

G9A-dCas9 без HA-метки

MAPKKKRKVGIHGVPAASGGGGSGNRAIRTEKIICRDVARGYENVPIPCVNGVD
 GEPCPEDYKYISENCETSTMNIDRNITHLQHCTCVDDCSSSNCLCGQLSIRCWYDKDGR
 LQEFNKIEPPLIFECNQACSCWRNCKNRVVQSGIKVRLQLYRTAKMGWGVRLQTI
 PQGTFICEYVGELISDAEADVREDDSYLFDLDNKDGEVYCIDARYYGNISRFINHLCD
 PNIPVRVFMHLHQDLRFPRIAFFSSRDITGEELGFDYGDRFWDIKSKYFTCQCGSEKCKH
 SAEAI ALEQSRLARLDGGGGSGDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI
 KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEE

SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHAMIK
 FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL
 NLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIG
 DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
 PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQR
 TFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAW
 MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNE
 LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISG
 VEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLEFEDREMIEERLKTYAHLF
 DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDS
 LTFKEDIQKAQVSGQGDLSHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
 EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNG
 RDMYVDQELDINRLSDYDVA AIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVK
 KMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQIL
 DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNAV
 GTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLA
 NGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPK
 RNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMER
 SSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLEFENGRKRMLASAGELQKGNELALPSK
 YVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL
 SAYNKHARDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI
 TGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 73)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и домен репрессора, предусматривающий HDAC8, например домен HDAC8. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 27 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 27 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

dCas9-HDAC8 (MR-29439)

AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
 GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCGACAAGA
 AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCGGTGATCACC
 GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
 CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG
 AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG

GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC
CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
TGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAG
ACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA
GGCCATCCTGAGCGCCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
AGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
ACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATG
ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC
GCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT
ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCC
ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA
AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGA
GACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT
GAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT
GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCT
ACGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACC
GGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCG
GCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTG
AGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGA
TGGGCCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACC
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTG
CAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGA

CCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAG
GCCCCGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGA
ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAC
CTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA
GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACA
GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGT
GATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGG
TGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCG
GCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG
AGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
GCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCT
TCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
GCGGCGACAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAA
GAAGAAGAAGTCGGGCGGGGGTGGCTCAGAGGAGCCCGAGGAGCCCGCCGATAGC
GGACAATCTCTGGTGCCCGTCTACATCTACAGCCCCGAATATGTGAGCATGTGTGAT
TCCCTCGCCAAGATCCCTAAGAGAGCCAGCATGGTGCATTCTCTGATCGAGGCCTAC
GCTCTGCATAAGCAAATGAGGATCGTGAAGCCCAAGGTGCCAGCATGGAAGAGAT
GGCCACCTTTACACCGATGCCTACCTCCAACATCTCCAGAAGGTGTCCCAAGAGGG
CGACGACGACCACCCCGACTCCATTGAGTACGGACTGGGCTATGATTGCCCCGCCAC
CGAGGGCATCTTTGACTATGCCGCCGCTATCGGCGGAGCTACCATCACAGCCGCCCA
GTGTCTGATTGATGGCATGTGCAAGGTGCCATCAACTGGTCCGGAGGCTGGCATCA
TGCCAAGAAGGATGAGGCCTCCGGCTTCTGTTATCTGAATGACGCCGTGCTGGGCAT
TCTGAGACTGAGGAGGAAATTCGAGAGGATTCTGTACGTGGATCTGGATCTGCATC

ACGGAGATGGAGTCGAAGATGCCTTCAGCTTCACCAGCAAGGTGATGACAGTCTCT
 CTGCACAAGTTCTCCCCCGGCTTCTTTCCCGGAACCGGCGACGTGTCCGACGTGGGA
 CTGGGCAAGGGAAGGTACTACAGCGTGAACGTGCCCATTCAGACGGCATCCAAGA
 CGAGAAGTACTACCAGATCTGCGAGTCCGTGCTCAAGGAGGTCTACCAAGCCTTCA
 ATCCTAAGGCTGTCGTGCTCCAACCTGGGAGCTGATACCATTGCTGGCGATCCCATGT
 GCAGCTTCAATATGACACCCGTCGGAATCGGCAAGTGCCTCAAGTACATCCTCCAGT
 GGCAGCTCGCCACCCTCATTCTCGGAGGAGGCGGATACAATCTGGCTAATACCGCC
 AGATGCTGGACCTATCTGACCGGCGTGATTCTGGGCAAAACACTGAGCAGCGAAAT
 CCCCAGCCACGAGTTTTTACCGCTTACGGCCCCGACTACGTGCTGGAGATCACCCC
 CAGCTGCAGACCCGATAGAAACGAACCCCATAGAATCCAGCAAATTCTGAACTATA
 TCAAGGGCAACCTCAAGCACGTCGTGGGAGGTGGCGGATCGGGAAAGCGGCCCGCC
 GCCACCAAGAAGGCCGGTCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACG
 TGCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTT
 CTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCC
 TGAGTAGGAAGTCTAGAAA
 AA (SEQ ID NO: 27)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39 или 74. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39 или 74 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

dCas9-HDAC8

MAPKKRKRKVGIVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLN
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA

QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSEEPPEPADSGQSLVPV
 YIYSPEYVSMCDLAKIPKRASMVHSLIEAYALHKQMRIVKPKVASMEEMATFHTDAYL
 QHLQKVSQEGDDHDPDSIEYGLGYDCPATEGIFDYAAAIGGATITAAQCLIDGMCKVAI
 NWSGGWHHAKKDEASGFCYLNDVGLILRLRRKFERILYVDLDLHHGDGVEDAFSFTS
 KVMTVSLHKFSPGFFPGTGDVSDVGLGKGRYYSVNVPIQDGIQDEKYYQICESVLKEVY
 QAFNPKAVVLQLGADTIAGDPMCSFNMTVPVIGIGKCLKYILQWQLATLILGGGGYNLAN
 TARCWTYLTGVILGKTLSSSEIPDHEFFTAYGPDYVLEITPSCRPRNEPHRIQQILNYIKG
 NLKHVVGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 39)

dCas9-HDAC8 без HA-метки

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLN
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSEEPPEPADSGQSLVPV

YIYSPEYVSMCDSLAKIPKRASMVHSLIEAYALHKQMRIVKPKVASMEEMATFHTDAYL
 QHLQKVSQEGDDDDHPDSIEYGLGYDCPATEGIFDYAAAIGGATITAAQCLIDGMCKVAI
 NWSGGWHHAKKDEASGFCYLNDVGLGILRLRRKFERILYVDLDLHHGDGVEDAFSFTS
 KVMTVSLHKFSPGFFPGTGDVSDVGLGKGRYYSVNVPIQDGIQDEKYYYQICESVLKEVY
 QAFNPKAVVLQLGADTIAGDPMCSFNMTVPVGIGKCLKYILQWQLATLILGGGGYNLAN
 TARCWTYLTGVILGKTLSEIPDHEFFTAYGPDYVLEITPSCRPRDRNEPHRIQQILNYIKG
 NLKHVVGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 74)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и домен репрессора, предусматривающий LSD1, например домен LSD1. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 28 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 28 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

dCas9-LSD1 (MR-29129)

AGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
 GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCGACAAGA
 AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACC
 GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
 CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG
 AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
 GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
 TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
 CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC
 CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
 TGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
 GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAG
 ACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA
 GGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
 AGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
 GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
 GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
 ACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
 GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATG
 ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCG
 GCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT

ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCC
ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA
AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGA
GACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT
GAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT
GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCT
ACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACC
GGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCG
GCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTG
AGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGA
TGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACC
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTG
CAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGA
CCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAG
GCCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGA
ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAC
CTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA
GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACA
GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGT
GATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGG
TGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCG
GCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG
AGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
GCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCT

TCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
GCGGCGACAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAA
GAAGAAGAAGGAGAGCGGCGGCGGCAGCCTCTCCGGAAAGAAAGCCGCCGCTGCC
GCTGCCGCCGCTGCTGCTGCCGCTACCGGCACAGAAGCTGGCCCCGGAACAGCTGG
CGGAAGCGAAAACGGAAGCGAAGTGGCTGCCCAGCCCCGCCGGAAGTGTCCGGACCCG
CCGAGGTGGGACCCGGCGCTGTTCGGCGAAAGGACCCCCAGAAAAAAGGAGCCTCCT
AGAGCCAGCCCTCCCGGCGGACTCGCCGAACCTCCCGGCAGCGCTGGACCTCAAGC
CGGACCTACAGTGGTGCCCGGCAGCGCTACACCTATGGAGACCGGCATCGCTGAGA
CCCCCGAGGGAAGGAGAACCAGCAGAAGGAAGAGAGCCAAGGTGGAGTACAGAGA
GATGGATGAGTCTCTGGCTAACCTCAGCGAGGACGAGTACTACTCCGAGGAGGAAA
GGAATGCCAAGGCCGAGAAGGAGAAGAAGCTGCCCCCTCCTCCCCCTCAAGCCCC
CCCGAGGAGGAGAACGAGTCCGAGCCCGAGGAACCCAGCGGAGTGGAAGGAGCCG
CCTTTCAGTCCAGACTGCCCCACGACAGAATGACATCCCAAGAGGCCGCTTGCTTTC
CCGACATTATTTCCGGCCCTCAGCAGACCCAGAAGGTGTTTCTGTTCATTAGAAATA
GAACACTCCAGCTGTGGCTCGACAACCCCAAGATCCAGCTGACCTTCGAGGCTACCC
TCCAACAGCTGGAGGCCCCCTACAATAGCGATACCGTGCTGGTGCACAGAGTGCAC
AGCTATCTGGAGAGGCACGGCCTCATTAAGTTCGGCATTTACAAGCGGATCAAGCCC
CTGCCACCAAGAAAACAGGCAAGGTGATCATCATCGGCAGCGGCGTGAGCGGCCT
GGCCGCCGCCCGGCAGCTGCAGAGCTTCGGCATGGACGTGACCCTGCTGGAGGCC
GGGACCGGGTGGGCGGCCGGGTGGCCACCTTCCGGAAGGGCAACTACGTGGCCGAC
CTGGGCGCCATGGTGGTGACCGGCCTGGGCGGCAACCCCATGGCCGTGGTGAGCAA
GCAGGTGAACATGGAGCTGGCCAAGATCAAGCAGAAGTGCCCCCTGTACGAGGCCA
ACGGCCAGGCCGTGCCAAGGAGAAGGACGAGATGGTGGAGCAGGAGTTCAACCG
GCTGCTGGAGGCCACCAGCTACCTGAGCCACCAGCTGGACTTCAACGTGCTGAACA
ACAAGCACGTGAGCCTGGGCCAGGCCCTGGAGGTGGTGATCCAGCTGCAGGAGAAG
CACGTGAAGGACGAGCAGATCGAGCACTGGAAGAAGATCGTGAAAACACAGGAGG
AGCTGAAGGAGCTGCTGAACAAGATGGTGAACCTGAAGGAGAAGATCAAGGAGCT

GCACCAGCAGTACAAGGAGGCCAGCGAGGTGAAGCCCCCCCCGGGACATCACCGCCG
 AGTTCCTGGTCAAAAGCAAGCACCGGGACCTGACCGCCCTGTGCAAGGAGTACGAC
 GAGCTGGCCGAGACCCAGGGCAAGCTGGAGGAGAAGCTGCAGGAGCTGGAGGCCA
 ACCCCCCCAGCGACGTGTACCTGAGCAGCCGGGACCGGCAGATCCTGGACTGGCAC
 TTCGCCAACCTGGAGTTCGCCAACGCCACCCCCCTGAGCACCTGAGCCTGAAGCAC
 TGGGACCAGGACGACGACTTCGAGTTCACCGGCAGCCACCTGACCGTGCGGAACGG
 CTACAGCTGCGTGCCCGTGGCCCTGGCCGAGGGCCTGGACATCAAGCTGAACACCG
 CCGTGCGGCAGGTGCGGTACACCGCCAGCGGCTGCGAGGTGATCGCCGTGAACACC
 CGGAGCACCCAGCCAGACCTTCATCTACAAGTGCGACGCCGTGCTGTGCACCCTGCCC
 CTGGGCGTGCTGAAGCAGCAGCCCCCGCCGTGCAGTTCGTGCCCCCCCCCTGCCCCGAG
 TGGA AAAACAAGCGCCGTGCAGCGGATGGGCTTCGGCAACCTGAACAAGGTGGTGCT
 GTGCTTCGACCGGGTGTCTGGGACCCCAGCGTGAACCTGTTTCGGCCACGTGGGCAG
 CACCACCGCCAGCCGGGGCGAGCTGTTCTGTTCTGGAACCTGTACAAGGCCCCCAT
 CCTGCTGGCCCTGGTGGCCGGCGAGGCCGCCGGCATCATGGAGAACATCAGCGACG
 ACGTGATCGTGGGCCGGTGCCTGGCCATCCTGAAGGGCATCTTCGGCAGCAGCGCC
 GTGCCCCAGCCCAAGGAGACCGTGGTGAGCCGGTGGCGGGCCGACCCCTGGGCCCCG
 GGGCAGCTACAGCTACGTGGCCGCCGGCAGCAGCGGCAACGACTACGACCTGATGG
 CCCAGCCCATCACCCCCGGCCCCAGCATCCCCGGCGCCCCCCCAGCCCATCCCCCGGC
 TGTTCTTCGCCGGCGAGCACACCATCCGGAACCTACCCCGCCACCGTGCACGGCGCCC
 TGCTGAGCGGCCTGCGGGAGGCAGGACGGATCGCCGACCAGTTCCTGGGCGCCATG
 TACACCCTGCCCCGGCAGGCCACCCCCGGCGTGCCCGCCCAGCAGAGCCCCAGCAT
 GAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAG
 AAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAG
 CTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTA
 CCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA
 AAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 28)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или 75. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или 75 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

dCas9-LSD1

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSSFF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLN

LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAAATKKAGQAKKKKESGGGSLSGKAAAAAAAAAAAA
 AATGTEAGPGTAGGSENGSEVAAQPAGLSGPAEVGPGAVGERTPRKKEPPRASPPGGLA
 EPPGSAGPQAGPTVVPGSATPMETGIAETPEGRRTSRRKRAKVEYREMDLANLSEDE
 YYSEEERNAKAEKEKKLPPPPPQAPPEEENESEPEEPSGVEGAAFQSRLPHDRMTSQAEE
 CFPDIISGPQQTQKVFLFIRNRTLQLWLDNPKIQLTFEATLQQLEAPYNSDTVLVHRVHS
 YLERHGLINFGIYKRIKPLPTKKTGKVIIIGSGVSGLAARQLQSFGMDVTLLLEARDRVG
 GRVATFRKGNVYADLGAMVVTGLGGNPMVVSQVNMELAKIKQKCPLYEANGQAV
 PKEKDEMVEQEFNRLLEATSYLSHQLDFNVLNKHHVSLGQALEVVIQLQEKHKVDEQIE
 HWKKIVKTQEELKELLNKMVNLKEKIKELHQYKEASEVKPPRDITAEFLVKSCHRDLT
 ALCKEYDELAETQGKLEEKLELEANPPSDVYLSSRDRQILDWHFANLEFANATPLSTL
 SLKHWDQDDDFEFTGSHLTVRNGYSCVPVALAEGLDIKLNTAVRQVRYTASGCEVIAV
 NTRSTSQTFIYKCDVLCPLGLVKKQPPAVQFVPLPEWKTSVAVQRMGFGNLNKKVVL
 CFDRVFWDPVNLFGHVGSTTASRGELFLFWNLKAPILLALVAGEAAGIMENISDDVI
 VGRCLAIIKGIFGSSAVPQPKETVVSRRWRADPWARGSYSYVAAGSSGNDYDLMAQPITP
 GPSIPGAPQPIPRLLFFAGEHTIRNYPATVHGALLSGLREAGRIADQFLGAMYTLPQATPG
 VPAQQSPSMSGGKRPAAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 40)

dCas9-LSD1 без HA-метки

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
 DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVSTDKADLRILIYAL
 AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
 SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLN

LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVA AIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAAATKKAGQAKKKKESGGGSLSGKAAAAAAAAAAAA
 AATGTEAGPGTAGGSENGSEVAAQPAGLSGPAEVGPGAVGERTPRKKEPPRASPPGGLA
 EPPGSAGPQAGPTVVPGSATPMETGIAETPEGRRTSRRKRAKVEYREMDLANLSEDE
 YYSEEERNAKAEKEKKLPPPPPQAPPEEENESEPEEPSGVEGA AFQSRLPHDRMTSQA
 CFPDIISGPQQTQKVFLFIRNRTLQLWLDNPKIQLTFEATLQQLEAPYNSDTVLVHRVHS
 YLERHGLINFGIYKRIKPLPTKKTGKVIIIGSGVSGLAARQLQSFGMDVTLLLEARDRVG
 GRVATFRKGNVYADLGAMVVTGLGGNPMVAVSKQVNMELAKIKQKCPLYEANGQAV
 PKEKDEMVEQEFNRLLEATSYLSHQLDFNVLNKHHVSLGQALEVVIQLQEKHKVDEQIE
 HWKKIVKTQEELKELLNKMVNLKEKIKELHQYKEASEVKPPRDITAEFLVSKSHRDLT
 ALCKEYDELAETQGKLEEKLELEANPPSDVYLSSRDRQILDWHFANLEFANATPLSTL
 SLKHWDQDDDFEFTGSHLTVRNGYSCVPVALAEGLDIKLNTAVRQVRYTASGCEVIAV
 NTRSTSQTFIYKCDAVLCTLPLGV LKQPPAVQFVPLPEWKTS AVQRMGFGNLNKVVL
 CFDRVFWDP SVNLFHVGSTTASRGELFLFWNLYKAPILLALVAGEAAGIMENISDDVI
 VGRCLA ILKGIFGSSAVPQPKETVVSRRWRADPWARGSYSYVAAGSSGNDYDLMAQPITP
 GPSIPGAPQPIPRLLFFAGEHTIRNYPATVHGALLSGLREAGRIADQFLGAMYTLP RQATPG
 VPAQQSPSMSGGKRPAAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 75)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и домен репрессора, предусматривающий EZH2, например домен EZH2. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 29 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах

осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 29 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

EZH2-dCas9 (MR-28938)

AGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCCAGACCGGCA
AGAAGAGCGAGAAGGGCCCCGTGTGCTGGCGGAAGCGGGTGAAGAGCGAGTACAT
GCGGCTGCGGCAGCTGAAGCGGTTCCGGCGGGCCGACGAGGTGAAGAGCATGTTCA
GCAGCAACCGGCAGAAGATCCTGGAGCGGACCGAGATCCTGAACCAGGAGTGGA
GCAGCGGCGAATCCAGCCCCGTGCACATCCTGACCAGCGTGAGCAGCCTGCGGGGCA
CCCGGGAGTGACGCGTGACCAGCGACCTGGACTTCCCCACCCAGGTGATCCCCCTA
AAGACCCTGAACGCCGTGGCCAGCGTGCCCATCATGTACAGCTGGAGCCCCCTGCA
GCAGAACTTCATGGTGGAGGACGAGACCGTGCTGCACAACATCCCCTACATGGGCG
ACGAGGTGCTGGACCAGGACGGCACCTTCATCGAGGAGCTGATCAAGAACTACGAC
GGCAAGGTGCACGGCGACCGGGAGTGCGGCTTCATCAACGACGAGATCTTCGTGGA
GCTGGTGAACGCCCTGGGCCAGTACAACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
GACCCCGAGGAGCGGGAGGAGAAGCAGAAGGACCTGGAGGACCACCGGGACGACA
AGGAGAGCCGGCCCCCCCCGGAAGTTCCCCAGCGACAAGATCTTCGAGGCCATCAGC
AGCATGTTCCCCGACAAGGGCACCGCCGAGGAGCTGAAGGAGAAGTACAAGGAGC
TGACCGAGCAGCAGCTGCCCCGGCGCCCTGCCCCCGAGTGACCCCCAACATCGAC
GGCCCCAACGCCAAGAGCGTGACGCGGGAGCAGAGCCTGCACAGCTTCCACACCCT
GTTCTGCCGGCGGTGCTTCAAGTACGACTGCTTCCTGCACCCCTTCCACGCCACCCC
CAACACCTACAAGCGGAAGAACACCGAGACCGCCCTGGACAACAAGCCCTGCGGCC
CCCAGTGCTACCAGCACCTGGAGGGCGCCAAGGAGTTCGCCGCCGCCCTGACCGCC
GAGCGGATCAAGACCCCCCCCCAAGCGGCCCGGCGGCGGCGGGGCGGGCTGCC
CAACAACAGCAGCCGGCCCAGCACCCCCACCATCAACGTGCTGGAGAGCAAGGACA
CCGACAGCGACCGGGAGGCCGGCACCGAGACCGGCGGCGAGAACAACGACAAGGA
GGAGGAGGAGAAGAAGGACGAGACCAGCAGCAGCAGCAGCGAGGCCAACAGCCGGTGC
CAGACCCCCATCAAGATGAAGCCCAACATCGAGCCCCCGAGAACGTGGAGTGAG
CGGCGCCGAGGCCAGCATGTTCCGGGTGCTGATCGGCACCTACTACGACAACTTCTG
CGCCATCGCCCGGCTGATCGGCACCAAGACCTGCCGGCAGGTGTACGAGTTCCGGG
TGAAGGAGAGCAGCATCATCGCCCCGCCCCCGCCGAGGACGTGGACACCCCCCCC
CGGAAGAAGAAGCGGAAGCACCGGCTGTGGGCCGCCCACTGCCGGAAGATCCAGCT
GAAGAAGGACGGCAGCAGCAACCACGTGTACAACTACCAGCCCTGCGACCACCCCC
GGCAGCCCTGCGACAGCAGCTGCCCCTGCGTGATCGCCAGAACTTCTGCGAGAAG
TTCTGCCAGTGACGAGCAGCGAGTGCCAGAACCGGTTCCCCGGCTGCCGGTGCAAGGC
CCAGTGCAACACCAAGCAGTGCCCCTGCTACCTGGCCGTGCGGGAGTGCGACCCCG
ACCTGTGCCTGACCTGCGGCGCCGCCGACCACTGGGACAGCAAGAACGTGAGCTGC

AAGAACTGCAGCATCCAGCGGGGCAGCAAGAAGCACCTGCTGCTGGCCCCCAGCGA
CGTGGCCGGCTGGGGCATCTTCATCAAGGACCCCGTGCAGAAGAACGAGTTCATCA
GCGAGTACTGCGGCGAGATCATCAGCCAGGACGAGGCCGACCGGCGGGGCAAGGT
GTACGACAAGTACATGTGCAGCTTCCTGTTCAACCTGAACAACGACTTCGTGGTGGA
CGCCACCCGGAAGGGCAACAAGATCCGGTTCGCCAACCACAGCGTGAACCCCAACT
GCTACGCCAAGGTGATGATGGTGAACGGCGACCACCGGATCGGCATCTTCGCCAAG
CGGGCCATCCAGACCGGCGAGGAGCTGTTCTTCGACTACCGGTACAGCCAGGCCGA
CGCCCTGAAGTACGTGGGCATCGAGCGGGAGATGGAGATCCCCAGCACCGGCGGCA
GCGGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCCGACCCGACAAGAA
GTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCG
ACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCAC
AGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGA
GGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGG
ATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTT
CTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGC
ACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACC
ATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCT
GATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGG
CGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGA
CCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAG
GCCATCCTGAGCGCCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCA
GCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGG
GCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAG
CTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGA
CCAGTACGCCGACCTGTTCTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAG
CGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGA
TCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC GG
CAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGC
CCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAG
GACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCA
CCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAA
GGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGG
GCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGAG
ACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAG
CTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGC
CCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTG
AAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAA
GGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGA
AGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTG

GAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAA
GGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGC
TGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCTAC
GCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGG
CTGGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGC
AAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAG
CTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAG
CGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCA
TCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATG
GGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCA
CCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCAT
CAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGC
AGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGAC
CAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCCA
GAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGG
CCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAA
CTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACC
TGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAG
CGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAG
CCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTG
ATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAG
GTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGT
GGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCG
ACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGG
CAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGA
GATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCG
AGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTG
CTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTT
CAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC

ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCT
 GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
 GCGGCGACAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAA
 GAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTT
 AATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGC
 ACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAA
 AAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 29)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или 76. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или 76 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

EZH2-dCas9

MAPKKRKVGGSGSGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEV
 KSMFSSNRQKILERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTTRECSVTSDLDFPTQVIPLKT
 LNAVASVPIMYSWSPLQQNFMVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVVH
 GDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPR
 KFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEELKEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQS
 LHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAA
 ALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKE
 EEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVIGTYIDNFCAIAR
 LIGTKTCRQVYEFVRVKESSIIAPAPAEDVDTPPRKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDSSN
 HVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCY
 LAVRECDPDLCLTCGAADHWD SKNVSCKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPV
 QKNEFISEYCGEISQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSV
 NPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIPSTGG
 SGGSGGSGGSGGSGRDPDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIK
 KNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRL EES
 FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTKADLR LIYLALAHMIKF
 RGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLEN
 LIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQIGD
 QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP
 EKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRT
 FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWM
 TRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLY EYFTVYNELT
 KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
 DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDD

KVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTF
 KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIE
 ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRD
 MYVDQELDINRLSDYDVA AIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNPSEEVVKKM
 KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSR
 MNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNAVVGTA
 LIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGE
 IRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
 DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSE
 KNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLEFENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
 FLYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAY
 NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGL
 YETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 41)

EZH2-dCas9 без HA-метки

MAPKKRKVGSGSGSGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEV
 KSMFSSNRQKILERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTTRECSVTSDLDFPTQVIPLKT
 LNAVASVPIMYSWSPLQQNFMVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVVH
 GDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPR
 KFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEELKEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQS
 LHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAA
 ALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKE
 EEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYIDNFCAIAR
 LIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPAPAEDVDTPPRKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSSN
 HVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCY
 LAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVSCKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPV
 QKNEFISEYCGEISQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSV
 NPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIPSTGG
 SGGSGGSGGSGGSGRDPDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIK
 KNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLAES
 FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTKADLR LIYLALAHMIKF
 RGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLEN
 LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGD
 QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP
 EKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRT
 FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWM
 TRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLY EYFTVYNELT
 KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
 DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDD
 KVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTF
 KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIE

ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRD
 MYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNPSEEVVKKM
 KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR
 MNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
 LIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGE
 IRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
 DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSFFE
 KNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
 FLYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAY
 NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGL
 YETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 76)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 *S. pyogenes*, и первый домен репрессора, предусматривающий EZH2, например домен EZH2, и второй домен репрессора, предусматривающий KRAB, например домен KRAB. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 30 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 30 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

EZH2-dCas9-KRAB (MR-29448)

AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
 GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCCAGACCGGCA
 AGAAGAGCGAGAAGGGCCCCGTGTGCTGGCGGAAGCGGGTGAAGAGCGAGTACAT
 GCGGCTGCGGCAGCTGAAGCGGTTCCGGCGGGCCGACGAGGTGAAGAGCATGTTCA
 GCAGCAACCGGCAGAAGATCCTGGAGCGGACCGAGATCCTGAACCAGGAGTGGA
 GCAGCGGCGAATCCAGCCCCGTGCACATCCTGACCAGCGTGAGCAGCCTGCGGGGCA
 CCCGGGAGTGACGCGTGACCAGCGACCTGGACTTCCCCACCCAGGTGATCCCCCTA
 AAGACCCTGAACGCCGTGGCCAGCGTGCCCATCATGTACAGCTGGAGCCCCCTGCA
 GCAGAACTTCATGGTGGAGGACGAGACCGTGCTGCACAACATCCCCTACATGGGCG
 ACGAGGTGCTGGACCAGGACGGCACCTTCATCGAGGAGCTGATCAAGAACTACGAC
 GGCAAGGTGCACGGCGACCGGGAGTGCGGCTTCATCAACGACGAGATCTTCGTGGA
 GCTGGTGAACGCCCTGGGCCAGTACAACGACGACGACGACGACGACGACGACGGCGAC
 GACCCCGAGGAGCGGGAGGAGAAGCAGAAGGACCTGGAGGACCACCGGGACGACA
 AGGAGAGCCGGCCCCCCCCGGAAGTTCCCCAGCGACAAGATCTTCGAGGCCATCAGC
 AGCATGTTCCCCGACAAGGGCACCGCCGAGGAGCTGAAGGAGAAGTACAAGGAGC
 TGACCGAGCAGCAGCTGCCCCGGCGCCCTGCCCCCGAGTGACCCCCAACATCGAC

GGCCCCAACGCCAAGAGCGTGCAGCGGGAGCAGAGCCTGCACAGCTTCCACACCCCT
GTTCTGCCGGCGGTGCTTCAAGTACGACTGCTTCCTGCACCCCTTCCACGCCACCCC
CAACACCTACAAGCGGAAGAACACCGAGACCGCCCTGGACAACAAGCCCTGCGGCC
CCCAGTGCTACCAGCACCTGGAGGGCGCCAAGGAGTTCGCCGCCGCCCTGACCGCC
GAGCGGATCAAGACCCCCCCCCAAGCGGCCCGGCGGCCGGCGGGGCCGGCTGCC
CAACAACAGCAGCCGGGCCAGCACCCCCACCATCAACGTGCTGGAGAGCAAGGACA
CCGACAGCGACCGGGAGGCCGGCACCGAGACCGGCGGCGAGAACAACGACAAGGA
GGAGGAGGAGAAGAAGGACGAGACCAGCAGCAGCAGCAGCGAGGCCAACAGCCGGTGC
CAGACCCCCATCAAGATGAAGCCCAACATCGAGCCCCCGAGAACGTGGAGTGGAG
CGGCGCCGAGGCCAGCATGTTCCGGGTGCTGATCGGCACCTACTACGACAACTTCTG
CGCCATCGCCCGGCTGATCGGCACCAAGACCTGCCGGCAGGTGTACGAGTTCCGGG
TGAAGGAGAGCAGCATCATCGCCCCGCCCCGCGGAGGACGTGGACACCCCCCCC
CGGAAGAAGAAGCGGAAGCACCGGCTGTGGGCCGCCACTGCCGGAAGATCCAGCT
GAAGAAGGACGGCAGCAGCAACCACGTGTACAACCTACCAGCCCTGCGACCACCCCC
GGCAGCCCTGCGACAGCAGCTGCCCCTGCGTGATCGCCAGAACTTCTGCGAGAAG
TTCTGCCAGTGCAGCAGCGAGTGCCAGAACCGGTTCCCCGGCTGCCGGTGCAAGGC
CCAGTGCAACACCAAGCAGTGCCCCTGCTACCTGGCCGTGCGGGAGTGCGACCCCG
ACCTGTGCCTGACCTGCGGCGCCGCCGACCACTGGGACAGCAAGAACGTGAGCTGC
AAGAACTGCAGCATCCAGCGGGGCAGCAAGAAGCACCTGCTGCTGGCCCCCAGCGA
CGTGGCCGGCTGGGGCATCTTCATCAAGGACCCCGTGCAGAAGAACGAGTTCATCA
GCGAGTACTGCGGCGAGATCATCAGCCAGGACGAGGCCGACCGGCGGGGCAAGGT
GTACGACAAGTACATGTGCAGCTTCCTGTTCAACCTGAACAACGACTTCGTGGTGGA
CGCCACCCGGAAGGGCAACAAGATCCGGTTCGCCAACACAGCGTGAACCCCAACT
GCTACGCCAAGGTGATGATGGTGAACGGCGACCACCGGATCGGCATCTTCGCCAAG
CGGGCCATCCAGACCGGCGAGGAGCTGTTCTTCGACTACCGGTACAGCCAGGCCGA
CGCCCTGAAGTACGTGGGCATCGAGCGGGAGATGGAGATCCCCAGCACCGGCGGCA
GCGGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCCGACCCGACAAGAA
GTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCG
ACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCAC
AGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGA
GGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGG
ATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTT
CTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGC
ACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACC
ATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCT
GATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGGG
CGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGA
CCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAG
GCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCA
GCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGG

GCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAG
CTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGA
CCAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAG
CGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGA
TCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC GG
CAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGC
CCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAG
GACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCA
CCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAA
GGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGG
GCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGAG
ACCATCACCCCTTGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAG
CTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGC
CCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTG
AAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAA
GGCCATCGTGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGA
AGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTG
GAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAA
GGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGC
TGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCTAC
GCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGG
CTGGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGC
AAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAG
CTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAG
CGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCA
TCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATG
GGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCA
CCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCAT
CAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGC
AGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGAC
CAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCCA
GAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGG
CCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAA
CTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACC
TGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAG
CGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAG
CCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTG
ATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAG
GTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGT

GGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCG
 ACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGG
 CAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGA
 GATCACCTTGGCCAACGGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCCTGATCGAGACCAACGGCG
 AGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTG
 CTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTT
 CAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAG
 AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
 CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
 AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
 CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
 TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
 GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTT
 CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
 AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
 ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
 GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
 ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
 ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCT
 GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
 GCGGCGACAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAA
 GAAGAAGAAGTCGGGCGGGGGTGGCTCAGACGCTAAGTCTCTGACCGCTTGGAGCA
 GAACACTGGTCACCTTCAAGGACGTGTTCGTGCACTTCACAAGAGAGGAGTGAAAA
 CTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTCTATAGAAACGTCATGCTGGAGAACTACAA
 GAATCTGGTGTCTCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATTCTGAGGCTGGA
 GAAGGGCGAGGAGCCTTGGCTGGTGGAGAGAGAGATCCACCAAGAAACCCACCCC
 GACAGCGAAACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGGGAGGTGGCGGATCGGGAA
 AGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGTCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTA
 CCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCG
 GGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTT
 GAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA
 (SEQ ID NO: 30)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или 77. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или 77 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

EZH2-dCas9-KRAB

MAPKKKRKVGGSGGSGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEV
 KSMFSSNRQKILERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKT
 LNAVASVPIMYSWSPLQQNFMVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVVH
 GDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDDDDGDDPEEREKQKQDLEDHRDDKESRPPR
 KFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEELKEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQS
 LHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAA
 ALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKE
 EEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYDYNFCAIAR
 LIGTKTCRQVYEFVRVKESSIIAPAPAEDVDTPPRKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSSN
 HVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCN TKQCPCY
 LAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVSCKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPV
 QKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNNDFFVDATRKG NKIRFANHSV
 NPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIPSTGG
 SGGSGGSGGSGGSGRDPDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIK
 KNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRL EES
 FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLR LIYLALAHMIKF
 RGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRREN
 LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLDNLLAQIGD
 QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP
 EKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRT
 FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWM
 TRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELT
 KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
 DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDD
 KVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTF
 KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDLVKVMGRH KPENIVIEM
 ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRD
 MYVDQELDINRLSDYDVA AIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNPSEEVVKKM
 KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR
 MNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
 LIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGE
 IRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
 DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFE
 KNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
 FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR VILADANLDKVLSAY
 NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGL
 YETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSDAKSLTAW SRTLVTFKDV FV
 DFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIH
 QETHPDSETAFEIKSSVGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID

NO: 42)

EZH2-dCas9-KRAB без HA-метки

MAPKKRKVGSGSGSGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEV
KSMFSSNRQKILERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKT
LNAVASVPIMYSWSPLQQNFMVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVVH
GDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDDDDGDDPEEREKQKQDLEDHRDDKESRPPR
KFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEELKEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQS
LHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAA
ALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKE
EEKKDETSSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYIDNFCAIAR
LIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPAPAEDVDTPPRKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSSN
HVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCY
LAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVSCKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPV
QKNEFISEYCGEISQDEADRRGKVYDKYMCSFLNLNNDFFVVDATRKGNKIRFANHSV
NPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIPSTGG
SGSGSGSGSGSGSGRPPDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIK
KNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLAES
FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSKADLRILIYLAHMIKF
RGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLEN
LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGD
QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP
EKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRT
FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWM
TRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNELT
KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
DRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDD
KVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTF
KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHHPENIVIE
ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRD
MYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKM
KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR
MNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEGEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGE
IRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSE
KNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAY
NKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSI TGL
YETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSDAKSLTAWSRTLVTFKDVFV
DFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIH

QETHPDSETAFEIKSSVGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 77)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и первый домен репрессора, предусматривающий G9A, например домен G9A, и второй домен репрессора, предусматривающий KRAB, например домен KRAB. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 31 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 31 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

G9A-dCas9-KRAB (MR-29442)

AGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
 GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCTCGGGCGG
 GGGTGGCTCAGGAAGCGCCGCTATCGCCGAAGTGCTGCTGAATGCCAGATGCGATC
 TGCATGCCGTGAACTACCACGGCGACACCCCTCTGCATATCGCCGCTAGAGAGAGCT
 ACCATGACTGTGTGCTGCTGTTTCTGAGCAGAGGCGCCAATCCCGAGCTCAGAAACA
 AAGAGGGCGACACCGCTTGGGATCTGACACCCGAGAGATCCGACGTGTGGTTCGCT
 CTGCAACTGAATAGAAAAGTCTGAGACTGGGCGCTCGGCAATAGGGCCATTAGAACCGA
 GAAGATCATCTGTAGGGACGTGGCTAGGGGCTACGAGAACGTGCCCATCCCTTGTG
 TGAACGGAGTGGATGGAGAGCCTTGCCCCGAGGATTACAAATACATCAGCGAGAAC
 TGCGAACCTCCACCATGAATATCGATAGAAACATTACACACCTCCAGCACTGTACA
 TCGCTGGACGATTGCAGCAGCAGCAACTGTCTGTGCGGCCAACTGAGCATCAGATG
 CTGGTACGACAAGGATGGCAGACTGCTGCAAGAGTTCAACAAGATCGAACCCCTC
 TGATCTTCGAGTGTAACCAAGCTTGCAGCTGTTGGAGGAACTGCAAGAATAGGGTC
 GTGCAGTCCGGAATCAAGGTGAGACTGCAGCTGTATAGAACAGCTAAGATGGGATG
 GGGAGTCAGAGCTCTGCAGACCATCCCCCAAGGCACATTCATCTGTGAGTACGTG
 GCGAACTCATCAGCGACGCTGAGGCCGATGTGAGGGAGGACGACAGCTATCTCTTC
 GACCTCGACAACAAGGACGGCGAGGTGTACTGCATCGACGCTAGATATTACGGCAA
 CATCAGCAGATTCATCAACCACCTCTGCGACCCCAATATCATCCCCGTGAGAGTGTT
 CATGCTCCATCAAGATCTGAGATTCCCTAGGATCGCCTTCTTCAGCTCTAGAGACAT
 TAGAACCGGCGAGGAGCTGGGATTCGACTACGGCGACAGGTTCTGGGACATCAAGA
 GCAAGTACTTCACATGCCAATGCGGCAGCGAGAAATGCAAGCATAGCGCCGAGGCC
 ATTGCTCTGGAGCAGTCTAGACTGGCTAGGCTGGACCCTCACCCCGAGCTGCTGCCC
 GAACTGGGATCTCTGCCTCCCGTGAATACCGGAGGTGGCGGATCGGGAGACAAGAA
 GTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCG
 ACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCAC
 AGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGA

GGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGG
ATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTT
CTTCCACCCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGC
ACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACC
ATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCT
GATCTACCTGGCCCTGGCCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGG
CGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGA
CCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAG
GCCATCCTGAGCGCCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCA
GCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGG
GCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAG
CTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGA
CCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAG
CGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGA
TCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC GG
CAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGC
CCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAG
GACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCA
CCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAA
GGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGG
GCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGAG
ACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAG
CTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGC
CCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTG
AAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAA
GGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGA
AGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTG
GAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAA
GGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGC
TGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCTAC
GCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGG
CTGGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGC
AAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAG
CTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAG
CGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCA
TCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATG
GGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCA
CCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCAT
CAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGC

AGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGAC
CAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCCA
GAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGG
CCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAA
CTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACC
TGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAG
CGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAG
CCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTG
ATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAG
GTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGT
GGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCG
ACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGG
CAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGA
GATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCG
AGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTG
CTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTT
CAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
GCGGCGACAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAA
GAAGAAGAAGTCGGGCGGGGGTGGCTCAGACGCTAAGTCTCTGACCGCTTGGAGCA
GAACACTGGTCACCTTCAAGGACGTGTTCTGTCGACTTCACAAGAGAGGAGTGAAAA
CTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTCTATAGAAACGTCATGCTGGAGAACTACAA
GAATCTGGTGTCTCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATTCTGAGGCTGGA
GAAGGGCGAGGAGCCTTGGCTGGTGGAGAGAGAGATCCACCAAGAAACCCACCCC
GACAGCGAAACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGGGAGGTGGCGGATCGGGAA
AGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGTCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTA
CCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCG
GGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTT

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43 или 78. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или 77 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

G9A-dCas9-KRAB

MAPKKRKRVGIHGVPAASGGGGSGSAAIAEVLNARCDLHAVNYHGDTPHIA
ARESYHDCVLLFLSRGANPELRNKEGDTAWDLTPERSDVWFALQLNRKLR LGVGNRAI
RTEKIICRDVARGYENVPIPCVNGVDGEPEDYKYISENCETSTMNIDRNITHLQHCTC
VDDCSSSNCLCGQLSIRCWYDKDGRLQEFNKIEPLIFECNQACSCWRNCKNRVVQSG
IKVRLQLYRTAKMGWGVRALQTIPQGT FICEYVGELISDAEADVREDDSYLFDLDNKDG
EYCIDARYYGNISRFINHLCDPNIPVRVFMLHQDLRFPRIAFFSSRDIRTGEELGFDYGD
RFWDIKSKYFTCQCGSEKCKHSAEAIALEQSRLARLDHPHELLPELGS LPPVNTGGGGSG
DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA
TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGN
IVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV
DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI
ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAIL
LSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG
YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI
LRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVV
DKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLS
GEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKII
KDKDFLDNEENEDI EDIVLTLT LFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGW
GRLSRKLINGIRDKQSGKTILD FLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDS
LHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGQKNSR
ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD
VAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQR
KFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVK
VITLKS KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDY
KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD PKKY
GGFDSPTVAYSVLVVA KVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEV
KKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEK LKGSP
EDNEOKOLFVEOHKH YLDEIIEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREOAENII

HLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQSTGLYETRIDLSQLGGDSGG
 KRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSDAKSLTAWSRTLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQ
 ILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSS
 VGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 43)

G9A-dCas9-KRAB без HA-метки

MAPKKRKRKVGIVPAASGGGGSGSAAIAEVLLNARCDLHAVNYHGDTPLHIA
 ARESYHDCVLLFLSRGANPELRNKEGDTAWDLTPERSDVWFALQLNRKLRLGVGNRAI
 RTEKIICRDVARGYENVPIPCVNGVDGEPEDYKYISENCETSTMNIDRNITHLQHCTC
 VDDCSSNCLCGQLSIRCWYDKDGRLLQEFNKIEPPLIFECNQACSCWRNCKNRVVQSG
 IKVRLQLYRTAKMGWGVRLQQTIPQGTICEYVGELISDAEADVREDDSYLFDLDNKDG
 EVYCIDARYYGNISRFINHLCDPNIPVRVFMHLHQDLRFPRIAFFSSRDIRTGEELGFDYGD
 RFWDIKSKYFTCQCGSEKCKHSAEIALEQSRLARLDHPPELLPELGSPPVNTGGGGSG
 DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA
 TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGN
 IVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV
 DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI
 ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIL
 LSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG
 YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI
 LRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVV
 DKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLS
 GEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKII
 KDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGW
 GRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDS
 LHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR
 ERMKRIEEGIELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD
 VAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQR
 KFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVK
 VITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDY
 KUYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
 WDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
 GGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEV
 KKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGP
 EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHDKPIREQAENII
 HLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQSTGLYETRIDLSQLGGDSGG
 KRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSDAKSLTAWSRTLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQ
 ILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSS
 VGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 78)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9

S. pyogenes, и первый домен репрессора, предусматривающий FOG1, например домен FOG1, и второй домен репрессора, предусматривающий FOG1, например домен FOG1. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 32 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 32 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

FOG1-dCas9-FOG1 (MR-29434)

AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
 GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCTCGGGCGG
 GGGTGGCTCAAGCAGAAGGAAGCAGAGCAACCCCAGACAAATCAAGAGATCTCTG
 GGCGACATGGAGGCCAGAGAGGAAGTGCAGCTGGTGGGCGCCAGCCACATGGAGC
 AGAAGGCTACAGCCCCCGAGGCCCGAGCCCCGAGGTGGCGGATCGGGAGACAA
 GAAGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCA
 CCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG
 CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGC
 CGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAAC
 CGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAG
 CTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGC
 GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
 ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCG
 GCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGA
 GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGC
 AGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
 AAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGC
 CCAGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCC
 TGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTG
 CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
 CGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCT
 GAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCA
 TGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTG
 CGGCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGG
 CTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCA
 AGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGG
 GAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGAT
 CCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCT
 GAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACG

TGGGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAG
GAGACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCA
GAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGC
TGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAG
GTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAA
GAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGC
TGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGAGATCAGCGGC
GTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCAT
CAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATC
GTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAAC
CTACGCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACA
CCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGC
GGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATG
CAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGT
GAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCG
CCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTG
ATGGGCGCGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGA
CCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGG
CATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGC
TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTG
GACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCC
CCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACA
AGGCCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA
ACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATC
AAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCGAGATCCTGGA
CAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAG
GTGATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT
GGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACG
GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGAT
CGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGAC
CGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAG
GTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGG
CTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGA
AGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTAC
AGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCG
TGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCC
ATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAA

GCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCA
 GCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAAC
 TTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGA
 GCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGC
 AGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTG
 CTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACAT
 CATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGA
 CACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
 TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTG
 GGCGGCGACAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCA
 AGAAGAAGAAGTCGGGCGGGGGTGGCTCAAGCAGAAGGAAGCAGAGCAACCCCAG
 ACAAATCAAGAGATCTCTGGGCGACATGGAGGCCAGAGAGGAAGTGCAGCTGGTG
 GGCGCCAGCCACATGGAGCAGAAGGCTACAGCCCCCGAGGCCCCCAGCCCCGGAGG
 TGGCGGATCGGGAAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGTCAGGCCAAGAAG
 AAGAAGGGCAGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATT
 AAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCT
 GTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAA
 AAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 32)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44 или 79. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44 или 79 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

FOG1-dCas9-FOG1

MAPKKKRKVGIHGVPAASGGGGSSRRKQSNPRQIKRSLGDMEAREEVQLVGAS
 HMEQKATAPEAPSPGGGGSGDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTD
 RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFH
 RLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLLIYLALA
 HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKS
 RRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLA
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQL

IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSSRRKQSNPRQIKRSLG
 DMEAREEVQLVGASHMEQKATAPEAPSPGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYD
 VPDYA (SEQ ID NO: 44)

FOG1-dCas9-FOG1 без HA-метки

MAPKKKRKVGIHGVPAASGGGGSSRRKQSNPRQIKRSLGDMEAREEVQLVGAS
 HMEQKATAPEAPSPGGGGSGDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD
 RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFH
 RLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADRLIYLALA
 HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFILVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKS
 RRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLN
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
 LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSSRRKQSNPRQIKRSLG

DMEAREEVQLVGASHMEQKATAPEAPSPGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 79)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и домен репрессора, предусматривающий DNMT, например домен DNMT3b. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 15 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 15 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

dCas9-DNMT3b

AGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCGACAAGA
AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCGGTGATCACC
GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG
AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC
CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
TGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAG
ACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA
GGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
AGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCG
ACCAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCCGCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGCCAGCATG
ATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCG
GCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT
ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCC
ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA
AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG

GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGA
GACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT
GAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT
GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCT
ACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACC
GGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCG
GCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTG
AGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGA
TGGGCCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACC
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTG
CAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGA
CCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAG
GCCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGA
ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAC
CTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA
GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACA
GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGT
GATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGG
TGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCG
GCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG
AGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
GCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCT
TCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC

TGCCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
GCGGCGACAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAA
GAAGAAGAAGTCGGGCGGGGGTGGCTCAGTGACGTGCTGAGGAGAAGGAAGGAC
TGGAACGTGAGACTGCAAGCCTTCTTACCAGCGACACCGGACTGGAATACGAGGC
CCCTAAGCTGTACCCCGCCATTCCCGCCGCTAGACGCAGACCCATTAGAGTGCTCTC
TCTGTTTGACGGAATCGCCACCGGCTATCTGGTGCTGAAAGAGCTGGGCATCAAGGT
GGGCAAATACGTGGCCAGCGAGGTGTGCGAGGAGTCTATCGCCGTCGGAACCGTGA
AACACGAGGGAAACATCAAATACGTGAACGACGTGAGGAACATCACCAAGAAAAA
CATCGAGGAGTGGGGCCCCCTTCGATCTCGTGATCGGCGGCAGCCCTTGCAACGATCT
CTCCAATGTGAACCCCGCCAGAAAGGGACTGTACGAGGGCACCGGCAGACTGTTCT
TCGAGTTCTACCATCTGCTGAACTACAGCAGACCCAAGGAGGGCGACGACAGACCC
TTCTTCTGGATGTTTCGAAAACGTGGTTCGCCATGAAGGTGGGCGATAAGAGGGACAT
CAGCAGATTTCTGGAGTGTAACCCCGTCATGATCGATGCCATTAAGGTCAGCGCCGC
CCACAGAGCTAGGTACTTCTGGGGAAATCTGCCCCGGCATGAATAGACCCGTGATCG
CTTCCAAGAACGACAAGCTGGAGCTGCAAGACTGTCTGGAGTACAATAGAATCGCT
AAGCTCAAGAAGGTCCAGACCATCACCAACAAAATCCAACAGCATCAAGCAAGGCAA
GAACCAGCTGTTCCCCGTGGTCATGAACGGCAAGGAGGATGTGCTCTGGTGACCCG
AGCTGGAGAGGATCTTTGGCTTCCCCGTGCACTATACCGATGTGTCCAACATGGGAA
GAGGCGCTAGACAGAACTGCTGGGAAGAAGCTGGAGCGTGCCCGTGATTAGACAC
CTCTTCGCCCCCTCTGAAGGATTACTTCGCTTGCGAGGGAGGTGGCGGATCGGGAAAG
CGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGTCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGGCAGCTACC
CCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGG
GCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGA
ATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA (SEQ
ID NO: 15)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или 37. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или 37 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1

положение, отличающееся от нее.

dCas9-DNMT3b

MAPKKRKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLN
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVDELVKVMGRHK
PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSVDVLRRRKDWNVRL
QAFFTSDTGLEYEAPKLYPAIPAARRRPIRVLSLFDGIATGYLVKLKELGIKVGKYVASEV
CEESIAVGTVKHEGNIKYVNDVRNITKKNIEEWGPFDLVIGGSPCNDLSNVNPARKGLY
EGTGRLFFEFYHLLNYSRPKEGDDRPFFWMFENVVAMKVGDKRDISRFLECNPVMIDAI
KVSAAHRARYFWGNLPGMNRPVIAASKNDKLELQDCLEYNRIAKLKKVQTITTKSNSIKQ
GKNQLFPVVMNGKEDVLWCTELERIFGFPVHYTDVSNMGRGARQKLLGRSWSVPVIRH
LFAPLKDYFACEGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 16)

dCas9-DNMT3b без HA-метки

MAPKKRKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLN
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL

LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
 RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
 VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
 VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
 PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
 LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNPSEE
 VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTAKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
 QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
 VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
 ERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
 SKYVNFLYLASHYEKLKGGSPEDNEQKQLFVEQHKKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSVDVLRRRKDWNVRL
 QAFFTSDTGLEYEAPKLYPAIPAARRRPIRVLSLFDGIATGYLVKELGIKVGKYVASEV
 CEESIAVGTVKHEGNIKYVNDVRNITKKNIEEWGPFDLVIGGSPCNDLSNVNPARKGLY
 EGTGRLFFEFYHLLNYSRPKEGDDRPFFWMFENVVAMKVGDKRDISRFLECNPMIDAI
 KVSAAHRARYFWGNLPGMNRPVIAKNDKLELQDCLEYNRIAKLKKVQTITTKSNSIKQ
 GKNQLFPVVMNGKEDVLWCTELERIFGFPVHYTDVSNMGRGARQKLLGRSWSVPVIRH
 LFAPLKDYFACEGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 37)

Функциональные характеристики

Систему репрессии экспрессии по настоящему изобретению можно применять для снижения уровня экспрессии гена-мишени в клетке. В некоторых вариантах осуществления снижение уровня экспрессии предусматривает снижение уровня РНК, например mRNA, кодируемой геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления снижение уровня экспрессии предусматривает снижение уровня белка, кодируемого геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления снижение уровня экспрессии предусматривает снижение уровня как mRNA, так и белка, кодируемых геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена-мишени в клетке, находящейся в контакте с системой репрессии экспрессии или содержащей ее, в по меньшей мере 1,05х (т. е. в 1,05 раза), 1,1х, 1,15х, 1,2х, 1,25х, 1,3х, 1,35х, 1,4х, 1,45х, 1,5х, 1,55х, 1,6х, 1,65х, 1,7х, 1,75х, 1,8х, 1,85х, 1,9х, 1,95х, 2х, 3х, 4х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 20х, 30х, 40х, 50х, 60х, 70х, 80х, 90х или 100х ниже, чем уровень экспрессии гена-мишени в клетке не находящейся в контакте с системой репрессии экспрессии или не содержащей ее. Экспрессию гена-мишени можно оценить с помощью способов, известных специалистам в данной области, в том числе RT-PCR, ELISA, вестерн-блоттинга и способов из примеров 2-4.

Систему репрессии экспрессии по настоящему изобретению можно применять для снижения уровня экспрессии гена-мишени в клетке в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена-мишени в клетке, находящейся в контакте с системой репрессии экспрессии или содержащей ее, в значительной степени снижается в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 или 14 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет (например, в течение неопределенного периода времени). Необязательно уровень экспрессии гена-мишени в клетке, находящейся в контакте с системой репрессии экспрессии или содержащей ее, заметно снижается в течение более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 года.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии мишени в клетке, находящейся в контакте с репрессором экспрессии или системой или содержащей их, в значительной степени снижается в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений. Репрессор экспрессии или система по настоящему изобретению можно применять для метилирования нуклеотидов CpG в области-мишени. В некоторых вариантах осуществления метилирование сохраняется в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней или по меньшей мере 22 дней после обработки с помощью репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, раскрытых в данном документе.

Система репрессии экспрессии может содержать множество репрессоров экспрессии, где каждый репрессор экспрессии содержит домен репрессора с функциональным свойством, отличным от домена репрессора из другого репрессора экспрессии. Например, система репрессии экспрессии может содержать два репрессора экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит первый домен репрессора, обладающий функциональным свойством гистондеацетилазы, и второй репрессор экспрессии содержит второй домен репрессора, обладающий функциональным свойством ДНК-метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит репрессоры экспрессии, содержащие комбинацию доменов репрессора, функциональные свойства которых комплементарны друг другу в отношении подавления экспрессии гена-мишени, например, где функциональные свойства совместно обеспечивают подавление экспрессии и необязательно не подавляют или незначительно подавляют экспрессию, когда присутствуют по отдельности. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит множество репрессоров экспрессии, где каждый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, который дополняет домены репрессора каждого другого репрессора экспрессии, например каждый домен репрессора снижает уровень экспрессии гена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит репрессоры экспрессии, содержащие комбинацию доменов репрессора, функциональные

свойства которых действуют синергически друг с другом в отношении подавления экспрессии гена-мишени. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что эпигенетические модификации геномного локуса являются кумулятивными, поскольку множественные репрессивные эпигенетические маркеры (например, несколько различных типов эпигенетических маркеров и/или более обширная маркировка данного типа) по отдельности совместно снижают уровень экспрессии более эффективно, чем только отдельные модификации (например, вызывая большее снижение уровня экспрессии и/или более продолжительное снижение уровня экспрессии). В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит множество репрессоров экспрессии, где каждый репрессор экспрессии содержит домен репрессора, который действует синергически с доменами репрессора каждого другого репрессора экспрессии, например каждый домен репрессора снижает уровень экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии (содержащая множество репрессоров экспрессии, содержащих множество отличающихся доменов репрессора, которые действуют синергически друг с другом) более эффективно подавляет экспрессию гена-мишени, чем отдельный репрессор экспрессии и, например, его единственный домен репрессора. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии в по меньшей мере 1,05x (т. е. в 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,55x, 1,6x, 1,65x, 1,7x, 1,75x, 1,8x, 1,85x, 1,9x, 1,95x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x или 100x более эффективно подавляет экспрессию гена-мишени, чем отдельный репрессор экспрессии. Уровень эпигенетического маркера можно оценить с помощью способов, известных специалистам в данной области, в том числе полногеномного бисульфитного секвенирования, бисульфитного секвенирования со сниженным представителем, бисульфитного секвенирования ампликона, матрицы метилирования, пиросеквенирования, ChIP-seq или ChIP-qPCR.

Комбинации репрессоров

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первый домен репрессора, и второй репрессор экспрессии, содержащий второй домен репрессора, где первый домен репрессора и второй домен репрессора отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или содержит первую эпигенетическую модифицирующую функциональную группу (например, которая увеличивает или уменьшает уровень первого эпигенетического маркера) или ее функциональный фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или содержит вторую эпигенетическую модифицирующую функциональную группу (например, которая увеличивает или уменьшает уровень второго эпигенетического маркера) или ее функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или содержит гистонметилтрансферазу или ее функциональный фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или содержит ДНК-метилтрансферазу или ее

функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или содержит гистондеацетилазу или ее функциональный фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или содержит ДНК-метилтрансферазу или ее функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или содержит гистондеацетилазу или ее функциональный фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или содержит гистонметилтрансферазу или ее функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает KRAB (например, домен KRAB), домен SET (например, домен SET SETDB1, EZH2, G9A или SUV39H1), гистондеметилазу LSD1, FOG1 (например, N-концевые остатки FOG1), HDAC8, MQ1, DNMT1, DNMT3a/3l или KAP1 или функциональный фрагмент любого из них, и второй домен репрессора представляет собой или содержит KRAB (например, домен KRAB), домен SET (например, домен SET SETDB1, EZH2, G9A или SUV39H1), гистондеметилазу LSD1, FOG1 (например, N-концевые остатки FOG1), DNMT3A (например, человеческий DNMT3A), DNMT3B, DNMT3L, комплекс DNMT3A/3L или бактериальный MQ1 или функциональный фрагмент любого из них.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или предусматривает бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или предусматривает DNMT3A или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или предусматривает DNMT3B или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или предусматривает DNMT3L или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или предусматривает комплекс DNMT3A/3L или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает домен SET или его функциональный вариант или фрагмент, и

второй домен репрессора представляет собой или предусматривает бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает LSD1 или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или предусматривает бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает FOG1 или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или предусматривает бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый домен репрессора представляет собой или предусматривает KAP1 или его функциональный вариант или фрагмент, и второй домен репрессора представляет собой или предусматривает бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии представляет собой репрессор экспрессии, выбранный из dCas9-MQ1, dCas9-DNMT1, dCas9-DNMT3a/3l, G9A-dCas9, dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1, EZH2-dCas9, EZH2-dCas9-KRAB, G9a-dCas9-KRAB и Fog1-dCas9-Fog1, и второй репрессор экспрессии, где второй репрессор экспрессии представляет собой репрессор экспрессии, выбранный из dCas9-MQ1, dCas9-DNMT1, dCas9-DNMT3a/3l, G9A-dCas9, dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1, EZH2-dCas9, EZH2-dCas9-KRAB, G9a-dCas9-KRAB и Fog1-dCas9-Fog1.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии кодируется первой нуклеиновой кислотой, кодирующей первый репрессор экспрессии, где экспрессия управляется первым промотором или IRES, и второй нуклеиновой кислотой, кодирующей второй репрессор экспрессии, где экспрессия управляется вторым промотором или IRES.

Сайты-мишени

Системы репрессии экспрессии, раскрытые в данном документе, применимы для модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени в клетке, например у субъекта или пациента. Геном-мишенью может являться любой ген, известный специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень ассоциирован с заболеванием или состоянием у субъекта, например млекопитающего, например человека, крупного рогатого скота, лошади, овцы, курицы, крысы, мыши, кошки или собаки. Ген-мишень может содержать кодирующие последовательности, например экзоны, и/или не кодирующие последовательности, например интроны, 3'UTR или 5'UTR. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень функционально связан с элементом контроля транскрипции.

Функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, подходящая для применения в репрессоре экспрессии системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе, может связываться, например специфически связываться, с любым сайтом в пределах

гена-мишени, элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, или якорной последовательности (например, якорной последовательности, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью (например, объединение, опосредованное якорной последовательностью, функционально связано с геном-мишенью, если разрушение объединения изменяет уровень экспрессии гена-мишени)).

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с сайтом в пределах экзона гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с сайтом в пределах интрона гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с сайтом на границе раздела экзона и интрона, например сайтом сплайсинга гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с сайтом в пределах 5'UTR гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с сайтом в пределах 3'UTR гена-мишени. Гены-мишени включают без ограничения ген, кодирующий β -2-микроглобулин, ген, кодирующий MYC, ген, кодирующий HSPA1B, ген, кодирующий GATA1, ген, кодирующий APOB, ген, кодирующий FOXP3, ген, кодирующий CXCL1, ген, кодирующий CXCL2, ген, кодирующий CXCL3, ген, кодирующий CXCL4, ген, кодирующий CXCL5, ген, кодирующий CXCL6, ген, кодирующий CXCL7, и ген, кодирующий CXCL8.

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с элементом контроля транскрипции, функционально связанным с геном-мишенью, например промотором или энхансером. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК связывается с частью или сайтом в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с сайтом инициации транскрипции гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с частью или сайтом в пределах энхансера, функционально связанного с геном-мишенью. Промотор обычно представляет собой элемент последовательности, который инициирует транскрипцию ассоциированного гена. Промоторы обычно находятся вблизи 5'-конца гена, недалеко от сайта инициации его транскрипции. Как известно специалистам средней квалификации, транскрипция генов, кодирующих белок, в эукариотических клетках обычно инициируется путем связывания общих факторов транскрипции (например, TFIID, TFIIE, TFIIH и т. д.) и медиатора с коровыми промоторными последовательностями в виде преинициаторного комплекса, который направляет РНК-полимеразу II к сайту инициации транскрипции и во многих случаях остается связанным с

последовательностями корового промотора даже после того, как РНК-полимераза удаляется и иницируется удлинение первичного транскрипта. В некоторых вариантах осуществления промотор предусматривает элемент последовательности, такой как ТАТА, Inr, DPE или BRE, но специалистам в данной области хорошо известно, что такие последовательности не обязательно необходимы для определения промотора. Специалисты в данной области знакомы с различными положительными (например, энхансерами) или отрицательными (например, репрессорами или сайленсерами) элементами контроля транскрипции, которые ассоциированы с генами. В некоторых вариантах осуществления элемент контроля транскрипции представляет собой сайт связывания фактора транскрипции. Обычно когда родственный регуляторный белок связывается с таким элементом контроля транскрипции, уровень транскрипции ассоциированного гена(-ов) изменяется (например, увеличивается или уменьшается).

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с якорной последовательностью, например якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованном якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью (например, объединение, опосредованное якорной последовательностью, функционально связано с геном-мишенью, если разрушение объединения изменяет уровень экспрессии гена-мишени). В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с якорной последовательностью объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), или расположена проксимально по отношению к ней, которая содержит целевое множество генов, например CXCL1-8 человека. В целом, якорная последовательность представляет собой элемент геномной последовательности, с которым специфически связывается компонент геномного комплекса. В некоторых вариантах осуществления связывание компонента геномного комплекса с якорной последовательностью приводит к образованию комплекса, например образованию объединения, опосредованного якорной последовательностью. Каждое объединение, опосредованное якорной последовательностью, предусматривает одну или несколько якорных последовательностей, например множество. В некоторых вариантах осуществления объединение, опосредованное якорной последовательностью, может быть разрушено для изменения, например подавления, уровня экспрессии гена-мишени. С помощью таких разрушений можно модулировать экспрессию генов, например, путем изменения топологической структуры ДНК, например, путем модулирования способности гена-мишени взаимодействовать с элементом контроля транскрипции (например, усиливающая последовательность и последовательность сайленсинга/репрессивная последовательность).

Функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, подходящая для применения в репрессоре экспрессии системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе, может связываться, например специфически связываться, с сайтом, проксимальным по

отношению к гену-мишени (например, экзонам, интронам или сайтам сплайсинга в пределах гена-мишени), проксимальным по отношению к элементу контроля транскрипции, функционально связанному с геном-мишенью, или проксимальным по отношению к якорной последовательности, например якорной последовательности, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью (например, объединение, опосредованное якорной последовательностью, функционально связано с геном-мишенью, если разрушение объединения изменяет уровень экспрессии гена-мишени). Как используется в данном документе, проксимальный относится к близости двух сайтов, например сайтов нуклеиновой кислоты, так что связывание репрессора экспрессии в первом сайте и/или модификация первого сайта репрессором экспрессии будут давать такой же или по сути такой же эффект, как и связывание и/или модификация другого сайта. Например, функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, может связываться с первым сайтом, проксимальным по отношению к энхансеру (второму сайту), и домен репрессора, ассоциированный с указанной функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, может эпигенетически модифицировать первый сайт таким образом, что эффект энхансера в отношении экспрессии гена-мишени модифицируется по сути так же, как если бы второй сайт (энхансерная последовательность) был связан и/или модифицирован. В некоторых вариантах осуществления сайт, проксимальный по отношению к гену-мишени (например, экзону, интрону или сайту сплайсинга в гене-мишени), проксимальный по отношению к элементу контроля транскрипции, функционально связанному с геном-мишенью, или проксимальный по отношению к якорной последовательности, расположен на расстоянии менее чем 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 или 25 пар оснований от гена-мишени (например, экзона, интрона или сайта сплайсинга в пределах гена-мишени), элемента контроля транскрипции или якорной последовательности (и необязательно по меньшей мере 20, 25, 50, 100, 200 или 300 пар оснований от гена-мишени (например, экзона, интрона или сайта сплайсинга в пределах гена-мишени), элемента контроля транскрипции или якорной последовательности).

Функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, подходящая для применения в репрессоре экспрессии системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе, может связываться, например специфически связываться, с сайтом, содержащим по меньшей мере 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 или 50 нуклеотидов или пар оснований (и необязательно не более 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 или 10 нуклеотидов или пар оснований). В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с сайтом, содержащим 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 или 50 нуклеотидов или пар оснований.

Системы репрессии экспрессии по настоящему изобретению могут содержать два или более репрессоров экспрессии. В некоторых вариантах осуществления каждый из репрессоров экспрессии системы репрессии экспрессии содержит отличающуюся функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга), и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга). В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга), и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованной якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованной якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга). В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии

содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с первым сайтом, например в промоторе, функционально связанном с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается со вторым сайтом, например в промоторе, функционально связанном с геном-мишенью. Первый сайт и второй сайт могут являться отличающимися и неперекрывающимися сайтами, например первый сайт и второй сайт не имеют какой-либо общей последовательности. Первый сайт и второй сайт могут являться отличающимися, но перекрывающимися сайтами, например первый сайт и второй сайт содержат отличающиеся последовательности, но имеют некоторую общую последовательность.

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-21, или последовательностью с не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением по сравнению с ней.

ACGGCGGGCCACCAAGGAGA (SEQ ID NO: 6)

CAGCGCCGCGCCTTTGGGAC (SEQ ID NO: 7)

CCCTTTCGGCGGGGAGCAGGG (SEQ ID NO: 8)

GCTGCGCTGGGGGAGCCAGAG (SEQ ID NO: 9)

AGCGCCCCTCCACGCGTTCAC (SEQ ID NO: 10)

В некоторых вариантах осуществления первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-21, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-21, где первая и вторая функциональные группы, целенаправленно воздействующие на ДНК, связываются с одной и той же последовательностью. В некоторых вариантах осуществления первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-21, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-21, где первая и вторая функциональные группы связываются с отличающимися последовательностями.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии связывается с геномным локусом, имеющим последовательность, представленную в данном документе, например, любую из SEQ ID NO: 1-21. Понятно, что во многих случаях связываемый геномный локус содержит двухнитевую ДНК, и этот локус может быть описан путем указания последовательности его смысловой нити или его антисмысловой нити. Таким образом, gRNA, имеющая данную спейсерную последовательность, может вызывать связывание репрессора экспрессии с конкретным геномным локусом, где одна нить геномного локуса имеет последовательность, подобную или идентичную спейсерной последовательности, и другая нить геномного локуса имеет комплементарную последовательность. Обычно связывание gRNA с геномным локусом будет предусматривать некоторое раскручивание геномного локуса и соединение спейсера gRNA с нитью, которой этот спейсер комплементарен.

В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит связывающий мотив нуклеирующего полипептида, например CTCF-связывающий мотив: N(T/C/G)N(G/A/T)CC(A/T/G)(C/G)(C/T/A)AG(G/A)(G/T)GG(C/A/T)(G/A)(C/G)(C/T/A)(G/A/C) (SEQ ID NO: 81), где N представляет собой любой нуклеотид.

CTCF-связывающий мотив также может иметь противоположную ориентацию, например,

(G/A/C)(C/T/A)(C/G)(G/A)(C/A/T)GG(G/T)(G/A)GA(C/T/A)(C/G)(A/T/G)CC(G/A/T)N(T/C/G)N (SEQ ID NO: 82), где N представляет собой любой нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит SEQ ID NO: 81, или SEQ ID NO: 82, или последовательность, на по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную с любой из SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит связывающий мотив нуклеирующего полипептида, например YY1-связывающий мотив: CCGCCATNTT (SEQ ID NO: 83), где N представляет собой любой нуклеотид.

YY1-связывающий мотив также может иметь противоположную ориентацию, например, AANATGGCGG (SEQ ID NO: 84), где N представляет собой любой нуклеотид.

Функциональная группа, подходящая для применения в репрессоре экспрессии системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе, может связываться, например специфически связываться, с сайтом, содержащим по меньшей мере 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 или 50 нуклеотидов или пар оснований (и необязательно не более 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 или 10 нуклеотидов или пар оснований). В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с сайтом, содержащим 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 или 50 нуклеотидов или пар оснований.

Системы репрессии экспрессии по настоящему изобретению могут содержать два или более репрессоров экспрессии. В некоторых вариантах осуществления каждый из репрессоров экспрессии системы репрессии экспрессии содержит отличающуюся функциональную группу.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга), и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга). В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга), и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованной якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованной якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт

сплайсинга). В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, которая связывается с якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью.

Другие композиции

Нуклеиновые кислоты и векторы

Настоящее изобретение также частично направлено на нуклеиновые кислоты, кодирующие репрессоры экспрессии или системы репрессии экспрессии, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии может обеспечиваться посредством композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии, где нуклеиновая кислота ассоциирована с достаточным количеством других последовательностей с достижением экспрессии системы репрессии экспрессии, например репрессора(-ов) экспрессии системы репрессии экспрессии, в системе, представляющей интерес (например, в конкретных клетке, ткани, организме и т. д.).

В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает композиции нуклеиновых кислот, которые кодируют систему репрессии экспрессии, один или несколько репрессоров экспрессии или их полипептидную часть. В некоторых таких вариантах осуществления предусмотренные нуклеиновые кислоты могут представлять собой или предусматривать ДНК, РНК или любую другую функциональную группу или структурную единицу нуклеиновой кислоты, которые описаны в данном документе, и могут быть получены с помощью любой технологии, описанной в данном документе, или иным способом, доступным из уровня техники (например, синтез, клонирование, амплификация, транскрипция *in vitro* или *in vivo* и т. д.). В некоторых вариантах осуществления предусмотренные нуклеиновые кислоты, которые кодируют систему репрессии экспрессии, один или несколько репрессоров экспрессии или их полипептидную часть, могут быть функционально ассоциированы с одним или несколькими сигналами репликации, интеграции и/или экспрессии, подходящими и/или достаточными для достижения интеграции, репликации и/или экспрессии предусмотренной нуклеиновой кислоты в системе, представляющей интерес (например, в конкретных клетке, ткани, организме и т. д.). В некоторых вариантах осуществления композиция для доставки системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе, представляет собой или содержит вектор, например вирусный вектор, содержащий одну

или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько компонентов системы репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии, которая описана в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления композиция для доставки репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой или предусматривает РНК, например mRNA, содержащую одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько компонентов репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии, которая описана в данном документе.

Нуклеиновые кислоты, которые описаны в данном документе, или нуклеиновые кислоты, кодирующие белок, описанный в данном документе, могут быть включены в вектор. Векторы, в том числе полученные из ретровирусов, таких как лентивирусы, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Примеры векторов включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования. Вектор экспрессии может быть введен в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна из уровня техники и описана во множестве руководств по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно применять в качестве векторов, включают без ограничения ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую в по меньшей мере одном организме, промоторную последовательность, подходящие сайты рестрикционных эндонуклеаз и один или несколько селектируемых маркеров.

Экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, как правило, достигается с помощью функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес ген, с промотором, и включения данной конструкции в вектор экспрессии. Векторы могут быть подходящими для репликации и интеграции в эукариотах. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, применимые для экспрессии требуемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Дополнительные промоторные элементы, например усиливающие последовательности, могут регулировать частоту инициации транскрипции. Обычно эти последовательности расположены в области 30-110 п. о. выше сайта инициации транскрипции, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта инициации транскрипции. Промежуток между промоторными элементами зачастую является гибким, так что промоторная функция сохраняется, когда элементы инвертированы или перемещены друг относительно друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) промежуток между промоторными элементами можно увеличить до 50 п. о. перед тем, как активность начинает снижаться. В зависимости от

промотора, по-видимому, отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции.

Одним примером подходящего промотора является последовательность промотора гена немедленно-раннего ответа цитомегаловируса (CMV). Данная промоторная последовательность представляет собой последовательность сильного конститутивного промотора, способного управлять высокими уровнями экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ним. В некоторых вариантах осуществления подходящим промотором является фактор элонгации 1 α (EF-1 α). Однако также можно использовать другие последовательности конститутивных промоторов, включая в том числе без ограничения ранний промотор вируса 40 обезьян (SV40), промотор вируса рака молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (HIV), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как без ограничения промотор гена актина, промотор гена миозина, промотор гена гемоглобина и промотор гена креатинкиназы.

Настоящее изобретение не следует интерпретировать как ограничивающее применение какого-либо конкретного промотора или категории промоторов (например, конститутивных промоторов). Например, в некоторых вариантах осуществления индуцибельные промоторы рассматриваются как часть настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления применение индуцибельного промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия требуется. В некоторых вариантах осуществления применение индуцибельного промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный выключать экспрессию, когда экспрессия не требуется. Примеры индуцибельных промоторов включают без ограничения промотор гена металлотионина, промотор гена глюкокортикоидного рецептора, промотор гена прогестеронового рецептора и промотор гена устойчивости к тетрациклину.

В некоторых вариантах осуществления подлежащий введению вектор экспрессии также может содержать либо ген селективного маркера, либо репортерный ген, либо и то и другое для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые предполагается трансфицировать или инфицировать посредством вирусных векторов. В некоторых аспектах селективный маркер может переноситься на отдельном фрагменте ДНК и применяться в процедуре совместной трансфекции. Как селективируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы подходящими последовательностями контроля транскрипции с обеспечением экспрессии в клетках-хозяевах. Применимые селективируемые маркеры могут включать, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т. д.

В некоторых вариантах осуществления репортерные гены можно применять для

идентификации потенциально трансфицированных клеток и/или для оценки функционального свойства последовательностей контроля транскрипции. Как правило, репортерный ген обычно представляет собой ген, который отсутствует в реципиентном источнике (репортерного гена) или не экспрессируется в нем и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется с помощью некоторого легко выявляемого свойства, например ферментативной активности или визуализируемой флуоресценцией. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после того, как ДНК была введена в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать в себя гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу, или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с помощью известных методик или приобретены коммерческим путем. Обычно как промотор идентифицируют конструкцию с минимальной 5'-фланкирующей областью, которая демонстрирует наибольший уровень экспрессии репортерного гена. Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном, и их применяют для оценки средств в отношении способности модулировать транскрипцию под управлением промотора.

Клетки

Настоящее изобретение также частично направлено на клетки, содержащие репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, описанные в данном документе. Любая клетка, например линия клеток, например линия клеток, подходящая для экспрессии рекомбинантного полипептида, известная специалисту в данной области, является подходящей для включения в нее репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетку, например линию клеток, можно применять для экспрессии репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, например репрессора(-ов) экспрессии, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетку, например линию клеток, можно применять для экспрессии или амплификации нуклеиновой кислоты, например вектора, кодирующего репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанные в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый компонент репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, например первый репрессор экспрессии, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй компонент системы репрессии экспрессии, например второй репрессор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, где клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую систему репрессии экспрессии, содержащую два или больше репрессоров экспрессии, последовательности, кодирующие каждый репрессор

экспрессии, расположены в отдельных молекулах нуклеиновой кислоты, например в различных векторах, например первом векторе, кодирующем первый репрессор экспрессии, и втором векторе, кодирующем второй репрессор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления последовательности, кодирующие каждый репрессор экспрессии, расположены в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления некоторые или все нуклеиновые кислоты, кодирующие систему репрессии экспрессии, интегрированы в геномную ДНК клетки. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии системы репрессии экспрессии, интегрирована в геномную ДНК клетки, и нуклеиновая кислота, кодирующая второй репрессор экспрессии системы репрессии экспрессии, не интегрирована в геномную ДНК клетки (например, расположена в векторе). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие первый и второй репрессоры экспрессии системы репрессии экспрессии, интегрированы в геномную ДНК клетки, например в одних и тех же (например, смежных или совместно локализованных) или различных сайтах в геномной ДНК.

Примеры клеток, которые могут содержать и/или экспрессировать систему репрессии экспрессии или репрессор экспрессии, описанные в данном документе, включают без ограничения гепатоциты, нейрональные клетки, эндотелиальные клетки, миоциты и лимфоциты.

Настоящее изобретение также частично направлено на клетку, полученную посредством способа, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, полученную путем: обеспечения системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе, обеспечения клетки и приведения клетки в контакт с системой репрессии экспрессии (или нуклеиновой кислотой, кодирующей систему репрессии экспрессии, или композицией, содержащей указанную систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту). Без ограничения какой-либо теорией, клетка, находящаяся в контакте с описанной в данном документе системой репрессии экспрессии, может демонстрировать снижение уровня экспрессии гена-мишени и/или модификацию эпигенетических маркеров, ассоциированных с геном-мишенью, элементом контроля транскрипции, функционально связанным с геном-мишенью, или якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, по сравнению с аналогичной клеткой, которая не находилась в контакте с системой репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления клетка, демонстрирующая указанное снижение уровня экспрессии гена-мишени и/или модификацию эпигенетических маркеров, не содержит систему репрессии экспрессии. Снижение уровня экспрессии и/или модификация эпигенетических маркеров может сохраняться, например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24

часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 или 14 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет (например, в течение неопределенного периода времени) после контакта с системой репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления клетка, ранее находящаяся в контакте с системой репрессии экспрессии, сохраняет снижение уровня экспрессии и/или модификацию эпигенетических маркеров после того, как система репрессии экспрессии больше не присутствует в клетке, например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 или 14 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет (например, в течение неопределенного периода времени) после того, как система репрессии экспрессии больше не присутствует в клетке.

Способы получения систем подавления экспрессии и/или репрессоров экспрессии

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит или представляет собой белок и, таким образом, может быть получен посредством способов получения белков. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии, содержит один или несколько белков и, таким образом, может быть получена посредством способов получения белков. Как будет понятно специалисту в данной области, способы получения белков или полипептидов (которые могут быть включены в модулирующие средства, которые описаны в данном документе) являются стандартными в уровне техники. См., в целом, Smales & James (Eds.), *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2005); и Crommelin, Sindelar & Meibohm (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*, Springer (2013).

Белок или полипептид из композиций по настоящему изобретению можно синтезировать биохимически путем применения стандартных твердофазных методик. Такие способы включают эксклюзивный твердофазный синтез, способы парциального твердофазного синтеза, конденсацию фрагментов, классический синтез растворов. Эти способы можно применять, когда пептид является относительно коротким (например, 10 кДа) и/или когда его нельзя получить посредством рекомбинантных методик (т. е. он не кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты), а следовательно предусматривает отличающееся химическое взаимодействие.

Процедуры твердофазного синтеза хорошо известны из уровня техники и дополнительно описаны в John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, *Solid Phase Peptide Syntheses*, 2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984; и Coin, I., et al., *Nature Protocols*, 2:3247-3256, 2007.

Для более длинных пептидов можно применять рекомбинантные способы. Способы получения рекомбинантного терапевтического полипептида являются стандартными в уровне техники. См., в целом, Smales & James (Eds.), *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2005); и Crommelin,

Sindelar & Meibohm (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*, Springer (2013).

Иллюстративные способы получения терапевтического фармацевтического белка или полипептида включают экспрессию в клетках млекопитающих, хотя рекомбинантные белки также могут быть получены с использованием клеток насекомых, дрожжей, бактерий или других клеток под контролем соответствующих промоторов. Векторы экспрессии млекопитающих могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящий промотор и другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, а также 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности, такие как необходимые сайты связывания рибосом, сайт полиаденилирования, донорные и акцепторные сайты сплайсинга и последовательности терминирования. Последовательности ДНК, полученные из генома вируса SV40, например точку начала репликации, ранний промотор, сайты сплайсинга и полиаденилирования SV40, можно применять для получения других генетических элементов, требуемых для экспрессии гетерологичной последовательности ДНК. Подходящие клонирующие векторы и векторы экспрессии для применения с клетками-хозяевами, являющимися клетками бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих, описаны в Green & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012).

В тех случаях, когда требуются большие количества белка или полипептида, их можно получить с применением методик, таких как описанные в Brian Bray, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2:587-593, 2003; и Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463.

Различные системы культивирования клеток млекопитающих можно применять для экспрессии и получения рекомбинантного белка. Примеры систем экспрессии в клетках млекопитающих включают клетки CHO, клетки COS, линии клеток HeLa и ВНК. Способы культивирования клеток-хозяев для получения белковых терапевтических средств описаны в работе Zhou and Kantardjieff (Eds.), *Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology)*, Springer (2014). Композиции, описанные в данном документе, могут содержать вектор, такой как вирусный вектор, например лентивирусный вектор, кодирующий рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления вектор, например вирусный вектор, может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок. Композиции, описанные в данном документе, могут включать липидные наночастицы, инкапсулирующие вектор, такой как вирусный вектор, например лентивирусный вектор, кодирующий рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица, инкапсулирующая вектор, например вирусный вектор, может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок.

Белки содержат одну или несколько аминокислот. Аминокислоты включают любое соединение и/или вещество, которое может быть включено в полипептидную цепь,

например, посредством образования одной или нескольких пептидных связей. В некоторых вариантах осуществления аминокислота имеет общую структуру $H_2N-C(H)(R)-COOH$. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой неприродную аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой D-аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой L-аминокислоту. "Стандартная аминокислота" относится к любой из двадцати стандартных L-аминокислот, обычно встречающихся во встречающихся в природе пептидах. "Нестандартная аминокислота" относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных аминокислот, независимо от того, получена ли она синтетическим путем или получена из природного источника. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, в том числе карбокси- и/или аминоконцевая аминокислота в полипептиде, может содержать структурную модификацию по сравнению с общей структурой, представленной выше. Например, в некоторых вариантах осуществления аминокислота может быть модифицирована путем метилирования, амидирования, ацетилирования, пэгилирования, гликозилирования, фосфорилирования и/или замены (например, аминокислотной группы, карбоксильной группы, одного или нескольких протонов и/или гидроксильной группы) по сравнению с общей структурой. В некоторых вариантах осуществления такая модификация может, например, изменять период полужизни в кровотоке полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления такая модификация существенно не изменяет соответствующую активность полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту. Как будет ясно из контекста, в некоторых вариантах осуществления термин "аминокислота" может использоваться для обозначения свободной аминокислоты; в некоторых вариантах осуществления его можно использовать для обозначения аминокислотного остатка полипептида.

Очистка белковых терапевтических средств описана в работе Franks, *Protein Biotechnology: Isolation, Characterization, and Stabilization*, Humana Press (2013); и в Cutler, *Protein Purification Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press (2010). Составление терапевтических средств на основе белка описано в Meyer (Ed.), *Therapeutic Protein Drug Products: Practical Approaches to formulation in the Laboratory, Manufacturing, and the Clinic*, Woodhead Publishing Series (2012).

Фармацевтические композиции, составление, доставка и введение

Настоящее изобретение также частично относится к фармацевтическим композициям, содержащим репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанные в данном документе, к фармацевтическим композициям, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие репрессор экспрессии или

систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанные в данном документе, и/или к композициям, которые доставляют репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанные в данном документе, в клетку, ткань, орган и/или субъекту.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтическая композиция" относится к активному средству (например, репрессору экспрессии или нуклеиновым кислотам рецептора экспрессии, например системе репрессии экспрессии, например репрессору(-ам) экспрессии системы репрессии экспрессии или нуклеиновой кислоте, кодирующей то же самое), составленному вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (например, фармацевтически приемлемыми носителями, известными специалистам в данной области). В некоторых вариантах осуществления активное средство присутствует в количестве стандартной дозы, подходящем для введения по терапевтической схеме, которая демонстрирует статистически значимую вероятность достижения заранее определенного терапевтического эффекта при введении соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая репрессор экспрессии по настоящему изобретению, содержит репрессор экспрессии или нуклеиновую кислоту(-ы), кодирующую его. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая систему репрессии экспрессии по настоящему изобретению, содержит либо каждый из репрессоров экспрессии системы репрессии экспрессии, либо нуклеиновую кислоту(-ы), кодирующую то же самое (например, если система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, то фармацевтическая композиция содержит первый и второй репрессоры экспрессии). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит менее чем все репрессоры экспрессии системы репрессии экспрессии, включающей множество репрессоров экспрессии. Например, система репрессии экспрессии может содержать первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, и первая фармацевтическая композиция может содержать первый репрессор экспрессии или нуклеиновую кислоту, кодирующую то же самое, и вторая фармацевтическая композиция может содержать второй репрессор экспрессии или нуклеиновую кислоту, кодирующую то же самое.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут быть специально составлены для введения в твердой или жидкой форме, включая те, которые адаптированы для следующего: перорального введения, например капли (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например те, которые предназначены для трансбуккального, подъязычного и системного поглощения, пилюли, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; парентерального введения, например подкожная, внутримышечная, внутривенная или эпидуральная инъекция в виде, например, стерильных раствора или суспензии или состава с замедленным высвобождением; местного применения, например в виде крема, мази, пластыря или спрея с

контролируемым высвобождением, наносимых на кожу, в легкие или ротовую полость; введения интравагинально или интаректально, например в виде пессария, крема или пены; введения сублингвально; через глаза; трансдермально или назально в легкие и/или на поверхности других слизистых оболочек.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках здравого медицинского суждения являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерного воздействия токсичности, раздражения, аллергической ответной реакции или других проблемы или осложнения в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, чтобы он был совместимым с другими ингредиентами состава и не был вредным для пациента.

В некоторых вариантах осуществления, например, материалы, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воск для суппозиториев; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; pH-буферные растворы; сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям таких соединений, которые подходят для применения в фармацевтических ситуациях, т. е. к солям, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т. п. и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны из уровня техники. Например, S. M. Berge, et al. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают без

ограничения соли присоединения нетоксичных кислот, которые представляют собой соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с применением других способов, применимых в уровне техники, таких как ионный обмен. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения адипатные, альгинатные, аскорбатные, аспартатные, бензолсульфонатные, бензоатные, бисульфатные, боратные, бутиратные, камфоратные, камфорсульфонатные, цитратные, циклопентанпропионатные, диглюконатные, додецилсульфатные, этансульфонатные, формиатные, фумаратные, глюкогептонатные, глицерофосфатные, глюконатные, гемисульфатные, гептаноатные, гексаноатные, гидройодидные, 2-гидроксиэтансульфонатные, лактобионатные, лактатные, лауратные, лаурилсульфатные, малатные, малеатные, малонатные, метансульфонатные, 2-нафталинсульфонатные, никотинатные, нитратные, олеатные, оксалатные, пальмитатные, памоатные, пектинатные, персульфатные, 3-фенилпропионатные, фосфатные, пикратные, пивалатные, пропионатные, стеаратные, сукцинатные, сульфатные, тартратные, тиоцианатные, *n*-толуолсульфонатные, ундеcanoатные, валератные соли и т. п. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натриевые, литиевые, калиевые, кальциевые, магниевые и т. п. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, алкил с 1-6 атомами углерода, сульфонат и арилсульфонат.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, описанные в данном документе, с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество предусматривает вспомогательное вещество, которое можно применять в получении фармацевтической композиции, которая является, как правило, безопасной, нетоксичной и необходимой и включает вспомогательного вещества, которые являются приемлемыми для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического применения у человека. Такие вспомогательные вещества могут быть твердыми, жидкими, полутвердыми или, в случае аэрозольной композиции, газообразными.

Фармацевтические препараты могут быть получены согласно традиционным методикам фармации, включая измельчение, смешивание, грануляцию и прессование, когда это необходимо, для форм таблеток; или измельчение, смешивание и наполнение для форм твердых желатиновых капсул. При использовании жидкого носителя препарат может быть в форме сиропа, эликсира, эмульсии или водного или неводного раствора или суспензии. Такой жидкий состав можно вводить непосредственно перорально.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут быть

составлены для доставки в клетку и/или субъекту любым путем введения. Способы введения субъекту могут включать инъекцию, инфузию, ингаляцию, интраназальную, внутриглазную, местную доставку, доставку внутрь канюли или прием внутрь. Инъекция предусматривает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интравентрикулярную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, интрацереброспинальную и интрастернальную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления введение предусматривает вдыхание аэрозоля, например с помощью распыления. В некоторых вариантах осуществления введение является системным (например, пероральным, ректальным, назальным, сублингвальным, трансбуккальным или парентеральным), энтеральным (например, общесистемный эффект, но доставляемый через желудочно-кишечный тракт) или местным (например, местное применение на коже, интравитреальная инъекция). В некоторых вариантах осуществления одну или несколько композиций вводят системно. В некоторых вариантах осуществления введение является непарентеральным, а терапевтическое средство представляет собой парентеральное терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления введение может быть бронхиальным (например, путем инстилляции бронхов), трансбуккальным, дермальным (которое может представлять собой или включать, например, одно или несколько из: местного введения в дерму, интрадермального, внутрикожного, трансдермального и т. д.), энтеральным, внутриартериальным, интрадермальным, внутрижелудочным, интрамедуллярным, внутримышечным, интраназальным, интраперитонеальным, интратекальным, внутривенным, интравентрикулярным, в пределах определенного органа (например, внутрипечечным), мукозальным, назальным, пероральным, ректальным, подкожным, сублингвальным, местным, трахеальным (например, посредством интратрахеальной инстилляции), вагинальным, витреальным и т. д. В некоторых вариантах осуществления введение может представлять собой однократную дозу. В некоторых вариантах осуществления введение может предусматривать введение доз, которое является прерывистым (например, множество доз, разделенных во времени) и/или периодическим (например, отдельные дозы, разделенные общим периодом времени). В некоторых вариантах осуществления введение может предусматривать непрерывное введение доз (например, перфузию) в течение по меньшей мере выбранного периода времени.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть доставлены в терапевтически эффективном количестве. Точное терапевтически эффективное количество представляет собой количество композиции, которое дает наиболее эффективные результаты с точки зрения эффективности лечения у данного субъекта. Это количество будет варьироваться в зависимости от множества факторов, включая без ограничения характеристики терапевтического соединения (включая активность, фармакокинетику, фармакодинамику и биодоступность), физиологическое

состояние субъекта (включая возраст, пол, тип и стадию заболевания, общее физическое состояние, восприимчивость к данной дозе и тип медицинского средства), характер фармацевтически приемлемого носителя или носителей в составе и/или путь введения.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки терапевтического средства, предусматривающие введение субъекту композиции, которая описана в данном документе, где средство, модулирующее геномный комплекс, представляет собой терапевтическое средство и/или где доставка терапевтического средства вызывает изменения в экспрессии генов по сравнению с экспрессией генов в отсутствие терапевтического средства.

Способы, предусмотренные в различных вариантах осуществления в данном документе, можно применять в любых аспектах, изложенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько композиций целенаправленно воздействуют на конкретные клетки или одну или несколько конкретных тканей.

Например, в некоторых вариантах осуществления одна или несколько композиций целенаправленно воздействуют на эпителиальную, соединительную, мышечную и/или нервную ткань или клетки. В некоторых вариантах осуществления композиция целенаправленно воздействует на клетку или ткань конкретной системы органов, например сердечно-сосудистой системы (сердце, сосуды); пищеварительной системы (пищевод, желудок, печень, желчный пузырь, поджелудочная железа, кишечник, толстая кишка, прямая кишка и анус); эндокринной системы (гипоталамус, гипофиз, шишковидное тело или шишковидная железа, щитовидная железа, паращитовидные железы, надпочечники); выделительной системы (почки, мочеточники, мочевого пузыря); лимфатической системы (лимфа, лимфатические узлы, лимфатические сосуды, миндалины, аденоиды, тимус, селезенка); покровной системы (кожа, волосы, ногти); мышечной системы (например, скелетные мышцы); нервной системы (головной мозг, спинной мозг, нервы); репродуктивной системы (яичники, матка, молочные железы, яички, семявыводящие протоки, семенные пузырьки, простата); дыхательной системы (глотка, гортань, трахея, бронхи, легкие, диафрагма); костной системы (кости, хрящи) и/или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению проникает через гематоэнцефалический барьер, плацентарную мембрану или гематотестикулярный барьер.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, предусмотренную в данном документе, вводят системно.

В некоторых вариантах осуществления введение является непарентеральным, а терапевтическое средство представляет собой парентеральное терапевтическое средство.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению характеризуется улучшенными PK/PD, например повышенной фармакокинетикой или фармакодинамикой, например улучшенным целенаправленным воздействием, поглощением или транспортом (например, улучшенными на по меньшей

мере 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% или больше) по сравнению с активным средством отдельно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется уменьшенными нежелательными эффектами, такими как уменьшенная диффузия в месторасположение, не являющееся мишенью, нецелевая активность или токсический метаболизм, по сравнению с терапевтическим средством отдельно (например, уменьшенными на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% или больше по сравнению с активным средством отдельно). В некоторых вариантах осуществления композиция обеспечивает повышение эффективности и/или снижение токсичности терапевтического средства (например, на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% или больше) по сравнению с активным средством отдельно.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены, например, таким образом, чтобы они содержали носитель, например фармацевтический носитель и/или полимерный носитель, например липосому или везикулу, и доставляться посредством известных способов нуждающемуся в этом субъекту (например, человеку или отличному от человека сельскохозяйственному или домашнему животному, например крупному рогатому скоту, собаке, кошке, лошади, домашней птице). Такие способы включают трансфекцию (например, опосредованную липидами, катионными полимерами, фосфатом кальция); электропорацию или другие способы разрушения мембран (например, нуклеофекцию) и вирусную доставку (например, с помощью лентивируса, ретровируса, аденовируса, AAV). Способы доставки также описаны, например, в работе Gori et al., *Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy*. *Human Gene Therapy*. July 2015, 26(7): 443-451. Doi:10.1089/hum.2015.074 и Zuris et al. *Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo*. *Nat Biotechnol*. 2014 Oct 30;33(1):73-80.

Липосомы представляют собой сферические везикулярные структуры, состоящие из одно- или многослойного липидного бислоя, окружающего внутренние водные компартменты, и относительно непроницаемого внешнего липофильного фосфолипидного бислоя. Липосомы могут быть анионными, нейтральными или катионными. Липосомы являются биосовместимыми, нетоксичными, могут доставлять как гидрофильные, так и липофильные молекулы лекарственных средств, защищать свой "груз" от разрушения под действием ферментов плазмы крови и транспортировать свою нагрузку через биологические мембраны и гематоэнцефалический барьер (BBB) (см., например, для обзора Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679).

Везикулы можно получать из нескольких отличающихся типов липидов; однако для образования липосом в качестве носителей лекарственных средств чаще всего используют фосфолипиды. Везикулы могут содержать без ограничения DOTMA, DOTAP, DOTIM, DDAB в отдельности или вместе с холестерином с получением DOTMA и

холестерина, DOTAP и холестерина, DOTIM и холестерина, а также DDAB и холестерина. Способы получения многослойных липидных везикул известны из уровня техники (см., например, патент США № 6693086, идеи которого, относящиеся к получению многослойных липидных везикул, включены в данный документ посредством ссылки). Хотя образование везикул может быть спонтанным при смешивании липидной пленки с водным раствором, его также можно ускорить путем применения силы в форме встряхивания с использованием гомогенизатора, соникатора или экструзионного аппарата (обзор см., например, в Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679). Экструдированные липиды можно получать посредством экструзии через фильтры с уменьшающимся размером пор, как описано в работе Templeton et al., *Nature Biotech*, 15:647-652, 1997, идеи которой, относящиеся к получению экструдированных липидов, включены в данный документ посредством ссылки.

Способы и композиции, предусмотренные в данном документе, могут включать фармацевтическую композицию, вводимую по схеме, достаточной для облегчения симптома заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки терапевтического средства посредством введения композиций, которые описаны в данном документе.

Варианты применения

Настоящее изобретение дополнительно направлено на варианты применения систем репрессии экспрессии, раскрытых в данном документе. Среди прочего, в некоторых вариантах осуществления такие предусмотренные технологии можно применять для достижения модуляции, например репрессии, экспрессии гена-мишени и, например, обеспечения контроля активности, доставки и пенетрантности гена-мишени, например в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего, например человека. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой соматическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную клетку. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой соматическую клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления соматическая клетка млекопитающего представляет собой первичную клетку. В некоторых вариантах осуществления соматическая клетка млекопитающего представляет собой незэмбриональную клетку.

Доза

Доза вводимого средства или композиции может варьироваться в зависимости, например, от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, индивидуальных параметров субъекта, включая возраст, физиологическое состояние, размер и вес, продолжительности лечения, типа лечения, подлежащего осуществлению (если таковые имеются), конкретного пути введения и подобных факторов. Таким образом, вводимая доза средств, описанных в данном документе, может зависеть от таких различных параметров. Доза вводимой композиции также может варьироваться в зависимости от

других факторов, таких как пол субъекта, общее состояние здоровья и тяжесть заболевания, подлежащего лечению. Может оказаться необходимым обеспечить субъекту дозу репрессора экспрессии, или системы репрессии экспрессии, или комбинации репрессоров экспрессии, описанных в данном документе, в зависимости от обстоятельств. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят дозу репрессора экспрессии, или систему репрессии экспрессии, или комбинацию репрессоров экспрессии, раскрытых в данном документе, в зависимости от обстоятельств.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть доставлены в терапевтически эффективном количестве. Точное терапевтически эффективное количество представляет собой количество композиции, которое дает наиболее эффективные результаты с точки зрения эффективности лечения у данного субъекта. Это количество будет варьироваться в зависимости от множества факторов, включая без ограничения характеристики терапевтического соединения (включая активность, фармакокинетику, фармакодинамику и биодоступность), физиологическое состояние субъекта (включая возраст, пол, тип и стадию заболевания, общее физическое состояние, восприимчивость к данной дозе и тип медицинского средства), характер фармацевтически приемлемого носителя или носителей в составе и/или путь введения.

Липидные наночастицы

Репрессоры экспрессии или системы репрессии экспрессии, которые описаны в данном документе, могут быть доставлены с использованием любой биологической системы доставки/состава, включающей частицу, например системы доставки наночастиц. Наночастицы включают частицы размером (например, диаметром) от приблизительно 1 до приблизительно 1000 нанометров, от приблизительно 1 до приблизительно 500 нанометров, от приблизительно 1 до приблизительно 100 нанометров, от приблизительно 30 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 75 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 200 нм и в любом диапазоне между этими значениями. Наночастица имеет составную структуру наноразмерных размеров. В некоторых вариантах осуществления наночастицы обычно являются сферическими, хотя возможны различные морфологические типы в зависимости от состава наночастицы. Часть наночастицы, контактирующую с окружающей средой, наружной по отношению к наночастице, как правило, идентифицируют как поверхность наночастицы. В некоторых вариантах осуществления наночастицы имеют наибольший размер в диапазоне от 25 нм до 200 нм. Наночастицы, которые описаны в данном документе, содержат системы доставки, которые могут предусматриваться в любой форме, включая без ограничения твердые, полутвердые, эмульсионные или коллоидные наночастицы. Система доставки наночастиц может включать без ограничения системы на основе липидов, липосомы, мицеллы, микровезикулы, экзосомы или генную пушку. В одном варианте осуществления наночастица представляет собой липидную наночастицу (LNP). В некоторых вариантах осуществления LNP представляет собой частицу, которая содержит множество липидных

молекул, физически ассоциированных друг с другом межмолекулярными силами.

В некоторых вариантах осуществления LNP может содержать множество компонентов, например 3-4 компонента. В одном варианте осуществления репрессор экспрессии или фармацевтическую композицию, содержащую указанный репрессор экспрессии (или нуклеиновую кислоту, кодирующую его, или фармацевтическую композицию, содержащую указанную нуклеиновую кислоту репрессора экспрессии), инкапсулируют в LNP. В одном варианте осуществления систему репрессии экспрессии или фармацевтическую композицию, содержащую указанную систему репрессии экспрессии (или нуклеиновую кислоту, кодирующую ее, или фармацевтическую композицию, содержащую указанную нуклеиновую кислоту системы репрессии экспрессии), инкапсулируют в LNP. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии, и нуклеиновая кислота, кодирующая второй репрессор экспрессии, присутствуют в одной и той же LNP. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии, и нуклеиновая кислота, кодирующая второй репрессор экспрессии, присутствуют в различных LNP. Получение LNP и инкапсуляция модулирующего средства могут быть применены/и адаптированы согласно Rosin et al., *Molecular Therapy*, том 19, № 12, стр. 1286-2200, декабрь 2011 г.). В некоторых вариантах осуществления композиции липидных наночастиц, раскрытые в данном документе, применимы для экспрессии белка, кодируемого mRNA. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, если они присутствуют в липидных наночастицах, в водном растворе устойчивы к расщеплению нуклеазой.

В некоторых вариантах осуществления составы LNP могут включать CCD-липид, нейтральный липид и/или вспомогательный липид. В некоторых вариантах осуществления состав LNP содержит ионизируемый липид. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид может представлять собой ионный липид, ионизируемый катионный липид или аминсодержащий липид, который может легко протонироваться. В некоторых вариантах осуществления липид представляет собой катионный липид, который может существовать в положительно заряженной или нейтральной форме в зависимости от pH. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой липид, способный быть положительно заряженным, например, в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит катионный липид в составе с одним или несколькими нейтральными липидами, ионизируемыми аминоксодержащими липидами, биоразлагаемыми алкиновыми липидами, стероидами, фосфолипидами, включающими полиненасыщенные липиды, структурными липидами (например, стеринами), PEG, холестерином и липидами, конъюгированными с полимером.

В некоторых вариантах осуществления состав LNP (например, MC3 и/или SSOP) включает холестерин, PEG и/или вспомогательный липид. LNP могут представлять собой, например, микросферы (включая однослойные и многослойные везикулы, липидные

бислои ламеллярной фазы, которые в некоторых вариантах осуществления являются по сути сферическими.

В некоторых вариантах осуществления LNP может содержать водное ядро, например, содержащее нуклеиновую кислоту, кодирующую репрессор экспрессии или систему, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нагрузка для состава LNP включает по меньшей мере одну направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления нагрузка, например нуклеиновая кислота, кодирующая репрессор экспрессии или систему, которые раскрыты в данном документе, может адсорбироваться на поверхности LNP, например LNP, содержащей катионный липид. В некоторых вариантах осуществления нагрузка, например нуклеиновая кислота, кодирующая репрессор экспрессии или систему, которые раскрыты в данном документе, может ассоциироваться с LNP. В некоторых вариантах осуществления нагрузка, например нуклеиновая кислота, кодирующая репрессор экспрессии или систему, которые раскрыты в данном документе, может быть инкапсулирована, например полностью инкапсулирована и/или частично инкапсулирована в LNP.

В некоторых вариантах осуществления LNP, содержащую нагрузку, можно вводить для системной доставки, например доставки терапевтически эффективной дозы нагрузки, что может приводить к широкому воздействию активного средства в организме. Системную доставку липидных наночастиц можно осуществлять посредством любого способа, известного из уровня техники, включая, например, внутривенную, внутриартериальную, подкожную и интраперитонеальную доставку. В некоторых вариантах осуществления системную доставку липидных наночастиц осуществляют с помощью внутривенной доставки. В некоторых вариантах осуществления LNP, содержащую нагрузку, можно вводить для местной доставки, например доставки активного средства непосредственно в целевой участок в организме.

LNP могут быть составлены в виде дисперсной фазы в эмульсии, мицелл или внутренней фазы в суспензии. В некоторых вариантах осуществления LNP являются биоразлагаемыми. В некоторых вариантах осуществления LNP не накапливаются до цитотоксических уровней и не вызывают токсичность *in vivo* в терапевтически эффективной дозе. В некоторых вариантах осуществления LNP не накапливаются до цитотоксических уровней и не вызывают токсичность *in vivo* после повторного введения в терапевтически эффективной дозе. В некоторых вариантах осуществления LNP не вызывают врожденного иммунного ответа, который приводит к существенному неблагоприятному эффекту в терапевтически эффективной дозе.

В некоторых вариантах осуществления используемая LNP характеризуется формулой (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконт-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат или ssPalmO-фенил-P4C2-(ssPalmO-Phe, SS-OP). В некоторых вариантах осуществления состав LNP характеризуется формулой (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконт-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,2-диолеил-

sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), холестерин, 1,2-димиристоил-гас-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (PEG2k-DMG), например LNP MC3 или ssPalmO-фенил-P4C2 (ssPalmO-Phe, SS-OP), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), холестерин, 1,2-димиристоил-гас-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (PEG2k-DMG), например SSOP-LNP.

Липосомы представляют собой сферические везикулярные структуры, состоящие из одно- или многослойного липидного бислоя, окружающего внутренние водные компартменты, и относительно непроницаемого внешнего липофильного фосфолипидного бислоя. Липосомы могут быть анионными, нейтральными или катионными. Липосомы являются биосовместимыми, нетоксичными, могут доставлять как гидрофильные, так и липофильные молекулы лекарственных средств, защищать свой "груз" от разрушения под действием ферментов плазмы крови и транспортировать свою нагрузку через биологические мембраны и гематоэнцефалический барьер (BBB) (см., например, для обзора Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679).

Везикулы можно получать из нескольких отличающихся типов липидов; однако для образования липосом в качестве носителей лекарственных средств чаще всего используют фосфолипиды. Везикулы могут содержать без ограничения DOTMA, DOTAP, DOTIM, DDAB в отдельности или вместе с холестерином с получением DOTMA и холестерина, DOTAP и холестерина, DOTIM и холестерина, а также DDAB и холестерина. Способы получения многослойных липидных везикул известны из уровня техники (см., например, патент США № 6693086, идеи которого, относящиеся к получению многослойных липидных везикул, включены в данный документ посредством ссылки). Хотя образование везикул может быть спонтанным при смешивании липидной пленки с водным раствором, его также можно ускорить путем применения силы в форме встряхивания с использованием гомогенизатора, соникатора или экструзионного аппарата (обзор см., например, в Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679). Экструдированные липиды можно получать посредством экструзии через фильтры с уменьшающимся размером пор, как описано в работе Templeton et al., *Nature Biotech*, 15:647-652, 1997, идеи которой, относящиеся к получению экструдированных липидов, включены в данный документ посредством ссылки.

Способы и композиции, предусмотренные в данном документе, могут включать фармацевтическую композицию, вводимую по схеме, достаточной для облегчения симптома заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки терапевтического средства посредством введения композиций, которые описаны в данном документе.

Модулирование уровня экспрессии генов

Настоящее изобретение также частично направлено на способ модулирования, например снижения уровня экспрессии гена-мишени, включающий обеспечение

репрессора экспрессии (или нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или фармацевтической композиции, содержащей указанную нуклеиновую кислоту репрессора экспрессии) или системы репрессии экспрессии, описанных в данном документе (или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или фармацевтической композиции, содержащей указанную систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту), и приведение в контакт гена-мишени и/или функционально связанного элемента(-ов) контроля транскрипции с репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления модулирование, например снижение, уровня экспрессии гена-мишени, предусматривает модулирование уровня транскрипции гена-мишени по сравнению с эталонным значением, например транскрипцию гена-мишени в отсутствие репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления способ модулирования, например снижения, экспрессии гена-мишени применяют *ex vivo*, например в клетке субъекта, например субъекта-млекопитающего, например субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления способ модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени применяют *in vivo*, например у субъекта-млекопитающего, например у субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления способ модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени применяют *in vitro*, например в клетке или клеточной линии, описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также частично направлено на способ лечения состояния, ассоциированного со сверхэкспрессией гена-мишени у субъекта, включающий введение субъекту системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе (или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или фармацевтической композиции, содержащей указанную систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту). Состояния, ассоциированные со сверхэкспрессией конкретных генов, известны специалистам в данной области. Такие состояния включают без ограничения метаболические нарушения, нервно-мышечные нарушения, рак (например, солидные опухоли), фиброз, диабет, нарушения метаболизма мочевины, иммунные нарушения, воспаление и артрит.

Настоящее изобретение также частично направлено на способ лечения состояния, связанного с нарушением регуляции экспрессии гена-мишени у субъекта, включающий введение субъекту системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе (или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или фармацевтической композиции, содержащей указанную систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту). Без ограничения какой-либо теорией, считается, что систему репрессии экспрессии можно применять для целенаправленного воздействия (например, снижения уровня экспрессии) на ген, который модулирует уровень экспрессии гена-мишени, изменяя таким образом уровень экспрессии гена-мишени путем изменения уровня экспрессии модулирующего гена. Состояния, ассоциированные с нарушением регуляции экспрессии конкретных генов, известны специалистам в данной области. Такие состояния включают без ограничения метаболические нарушения, нервно-мышечные нарушения, рак (например, солидные

опухоли), фиброз, диабет, нарушения метаболизма мочевины, иммунные нарушения, воспаление и артрит.

С применением способов и композиций, предусмотренных в данном документе, можно лечить состояние, ассоциированное со сверхэкспрессией или нарушением регуляции гена-мишени, путем стабильного или временного изменения (например, снижения) уровня транскрипции гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления такая модуляция сохраняется в течение от по меньшей мере приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней или в течение по меньшей мере приблизительно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или дольше или любого периода времени в промежутке между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления такая модуляция сохраняется в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет (например, в течение неопределенного периода времени). Необязательно такая модуляция сохраняется не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 лет.

В некоторых вариантах осуществления посредством способа или композиции, предусмотренных в данном документе, можно снижать уровень экспрессии гена-мишени в клетке на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% (и необязательно не более 100%) по сравнению с экспрессией гена-мишени в клетке, не находящейся в контакте с композицией или обработанной данным способом.

В некоторых вариантах осуществления посредством способа, предусмотренного в данном документе, можно модулировать, например снижать, уровень экспрессии гена-мишени путем разрушения геномного комплекса, например объединения, опосредованного якорной последовательностью, ассоциированного с указанным геном-мишенью. Ген, который ассоциирован с объединением, опосредованным якорной последовательностью, может располагаться, по меньшей мере частично, в пределах объединения (т. е. расположен по последовательности между первой и второй якорными последовательностями), или он может быть внешним по отношению к объединению в отношении того, что он не расположен по последовательности между первой и второй якорными последовательностями, но расположен в той же хромосоме и в достаточной близости к по меньшей мере первой или второй якорным последовательностям, так что его экспрессию можно модулировать путем контроля топологии объединения, опосредованного якорной последовательностью. Специалистам средней квалификации в данной области будет понятно, что расстояние в трехмерном пространстве между двумя элементами (например, между геном и объединением, опосредованным якорной последовательностью) может в некоторых вариантах осуществления быть более важным, чем расстояние в пересчете на пары оснований. В некоторых вариантах осуществления

внешний, но ассоциированный ген расположен в пределах 2 м. о., в пределах 1,9 м. о., в пределах 1,8 м. о., в пределах 1,7 м. о., в пределах 1,6 м. о., в пределах 1,5 м. о., в пределах 1,4 м. о., с 1,3 м. о., в пределах 1,3 м. о., в пределах 1,2 м. о., в пределах 1,1 м. о., в пределах 1 м. о., в пределах 900 т. о., в пределах 800 т. о., в пределах 700 т. о., в пределах 500 т. о., в пределах 400 т. о., в пределах 300 т. о., в пределах 200 т. о., в пределах 100 т. о., в пределах 50 т. о., в пределах 20 т. о., в пределах 10 т. о. или в пределах 5 т. о. от первой или второй якорной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления модулирование экспрессии гена предусматривает изменение доступности последовательности контроля транскрипции для гена. Последовательность контроля транскрипции, внутренняя или внешняя по отношению к объединению, опосредованному якорной последовательностью, может представлять собой усиливающую последовательность или последовательность сайленсинга (или репрессивную).

Эпигенетическая модификация

Настоящее изобретение также частично направлено на способ эпигенетического модифицирования гена-мишени, элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, или якорной последовательности (например, якорной последовательности, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью), при этом способ включает обеспечение системы репрессии экспрессии (например, репрессора(-ов) экспрессии) или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или фармацевтической композиции, содержащей указанную систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту; и приведение в контакт гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, с системой репрессии экспрессии, эпигенетически модифицируя таким образом ген-мишень или элемент контроля транскрипции, функционально связанный с геном-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, включает увеличение или уменьшение степени метилирования ДНК гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, включает увеличение или уменьшение степени метилирования гистонов для гистона, ассоциированного с геном-мишенью, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, включает уменьшение степени ацетилирования гистонов для гистона, ассоциированного с геном-мишенью, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена мишени

или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, включает увеличение или уменьшение степени сумаоилирования гистонов для гистона, ассоциированного с геном-мишенью, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, включает увеличение или уменьшение степени фосфорилирования гистонов для гистона, ассоциированного с геном-мишенью, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления посредством способа эпигенетической модификации гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, можно снижать уровень эпигенетической модификации на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% (и необязательно не более 100%) по сравнению с уровнем эпигенетической модификации в данном сайте в клетке, не находящейся в контакте с композицией или не обработанной данным способом. В некоторых вариантах осуществления посредством способа эпигенетической модификации гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, можно повышать уровень эпигенетической модификации на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000% (и необязательно не более 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или 2000%) по сравнению с уровнем эпигенетической модификации в данном сайте в клетке, не находящейся в контакте с композицией или не обработанной данным способом. В некоторых вариантах осуществления эпигенетическая модификация гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, может модифицировать уровень экспрессии гена-мишени, например, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления эпигенетическая модификация, полученная посредством способа, описанного в данном документе, сохраняется в течение от по меньшей мере приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней или по меньшей мере приблизительно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или дольше или в течение любого времени между ними. В некоторых вариантах осуществления такая модуляция сохраняется в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет (например, в течение неопределенного периода времени). Необязательно такая модуляция сохраняется не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 лет.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии для

применения в способе эпигенетического модифицирования гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, содержит репрессор экспрессии, содержащий домен репрессора, который представляет собой или содержит эпигенетическую модифицирующую функциональную группу.

Например, домен репрессора может представлять собой или содержать эпигенетическую модифицирующую функциональную группу с ДНК-метилтрансферазной активностью, а эндогенная или встречающаяся в природе последовательность-мишень (например, ген-мишень или элемент контроля транскрипции) может быть изменена с повышением ее степени метилирования (например, уменьшения взаимодействия фактора транскрипции с частью гена-мишени или элементом контроля транскрипции, снижающим связывание нуклеирующего белка с якорной последовательностью и/или нарушающий или предотвращающий образование объединения, опосредованного якорной последовательностью), или может быть изменена со снижением ее степени метилирования (например, усиления взаимодействия фактора транскрипции с частью гена-мишени или элементом контроля транскрипции, усиления связывания нуклеирующего белка с якорной последовательностью и/или стимулирования или увеличения силы объединения, опосредованного якорной последовательностью).

Наборы

Настоящее изобретение также частично направлено на набор, содержащий репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии (например, репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии) и инструкции по применению указанного репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления набор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии или ее компонент (например, репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии), и инструкции по применению указанной нуклеиновой кислоты и/или указанного репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления набор содержит клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии или ее компонент (например, репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии), и инструкции по применению указанной клетки, нуклеиновой кислоты и/или указанной системы репрессии экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит единицу дозирования репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, например репрессора(-ов) экспрессии, описанных в данном документе, или единицу дозирования нуклеиновой кислоты, например вектора, кодирующего репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанные в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит b) набор инструкций, предусматривающий по меньшей мере один способ лечения заболевания или

модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени в клетке с помощью указанной композиции. В некоторых вариантах осуществления наборы могут необязательно включать средство доставки для указанной композиции (например, липидную наночастицу). Реагенты могут быть предоставлены во взвешенном состоянии во вспомогательном веществе и/или в средстве доставки или могут быть предоставлены в виде отдельного компонента, который впоследствии может быть объединен со вспомогательным веществом и/или средством доставки. В некоторых вариантах осуществления наборы могут необязательно содержать дополнительные терапевтические средства для совместного введения с композициями для воздействия на уровень экспрессии требуемого гена-мишени. Хотя инструкционные материалы обычно содержат письменные или печатные материалы, они не ограничиваются таковыми. Предполагается любой носитель, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю. Такие носители включают без ограничения электронные носители данных (например, магнитные диски, кассеты, картриджи, чипы), оптические носители (например, CD-ROM) и т. п. Такие средства массовой информации могут включать адреса интернет-сайтов, которые предоставляют такие инструкционные материалы.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит единицу дозирования репрессора экспрессии системы репрессии экспрессии, например репрессора(-ов) экспрессии, описанных в данном документе, или единицу дозирования нуклеиновой кислоты, например вектора, кодирующего систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанной в данном документе.

Следующие примеры представлены для дополнительной иллюстрации некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, однако не предполагают ограничения объема настоящего изобретения; из их иллюстративной природы будет понятно, что в качестве альтернативы можно применять другие процедуры, способы или методики, известные специалистам в данной области.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Выбор мишени и конструирование направляющей РНК

Ген микроглобулина β -2 (β 2M) был предназначен для снижения уровня экспрессии с применением системы репрессии экспрессии согласно настоящему изобретению. Применяли первый репрессор экспрессии, содержащий dCas9 *S. pyogenes* и домен KRAB (Sp-dCas9-KRAB, соответствующие последовательностям под SEQ ID NO: 91-93) и второй репрессор экспрессии, содержащий dCas9 и MQ1 *S. aureus* (Sa-dCas9-MQ1, соответствующие последовательностям под SEQ ID No: 94-96). Направляющие РНК (содержащие последовательности связывания мишени, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 1-5) нацеливали каждый репрессор экспрессии на область гипометилирования CpG в промоторной области гена β 2M (фигура 1), где метилирование варьируется от 0 до 1 (от 0 до 100%), а более высокий уровень метилирования показан красным полосами. Каждый столбец представляет сайт CpG. Синие направляющие (GD-28228 и GD-28229) применяли для нацеливания Sp-dCas9-

KRAB, а оранжевые направляющие (GD-28171, GD-28172 и GD-28173) применяли для нацеливания Sa-dCas9-MQ1 на CpG-островов в промоторной области гена $\beta 2M$.

Пример 2. Репрессия экспрессии гена $\beta 2M$ с применением одного или двух репрессоров экспрессии

Направляющие РНК из примера 1 применяли для нацеливания репрессора экспрессии Sp-dCas9-KRAB, репрессора экспрессии Sa-dCas9-MQ1 или обоих на промоторную область гена $\beta 2M$, а эффект на уровень экспрессии гена $\beta 2M$ отслеживали с помощью количественной qPCR. mRNA, кодирующая репрессор(-ы) экспрессии и направляющую(-ие) РНК, доставляли в клетки в виде липидных наночастиц (LNP).

Клетки HepG2 высевали в 96-луночный планшет при плотности 30000 клеток/луночку в 100 мкл RPMI (+10% FBS, +пен./стреп.). Клеткам давали возможность прикрепиться в течение 24 часов перед обработкой 0,125 мкг РНК (весовое соотношение 1:1 mRNA:sgRNA) на каждую направляющую РНК. РНК доставляли с помощью LNP, составленной с помощью ионизируемого липида COATSOME SS-OP (NOF America). LNP составляли с помощью одной mRNA и одной направляющей, за исключением образцов, отмеченных как "составленные совместно", которые были получены с помощью двух направляющих, поддерживая такое же весовое соотношение mRNA: направляющая РНК. Клетки инкубировали с LNP в течение 72 часов, после чего клетки собирали для анализа mRNA $\beta 2M$ с помощью qPCR (фигура 2), при этом уровни mRNA $\beta 2M$ давали относительно необработанных контрольных клеток.

Отдельно dCas9, нацеленный на промотор гена $\beta 2M$, не снижал уровни mRNA $\beta 2M$. Из данных видно, что Sp-dCas9-KRAB или Sa-dCas9-MQ1 отдельно снижали уровни mRNA $\beta 2M$ с некоторыми вариациями в снижении в зависимости от используемой направляющей(-их) РНК. Sp-dCas9-KRAB и Sa-dCas9-MQ1 вместе снижали уровни mRNA $\beta 2M$ в среднем больше, чем любой из репрессоров экспрессии отдельно, опять же с некоторыми вариациями в снижении в зависимости от используемой направляющей(-их) РНК. Применение системы репрессии экспрессии, включающей один или два репрессора экспрессии, снижало уровень экспрессии гена-мишени. система репрессии экспрессии, включающая два репрессора экспрессии, по-видимому, снижала уровень экспрессии гена-мишени в большей степени, чем один репрессор экспрессии.

Пример 3. Репрессия экспрессии $\beta 2M$ в зависимости от дозы и применение проточной цитометрии

Направляющую РНК из примера 1 (GD-28228 для Sp-dCas9 и Sp-dCas9-KRAB; GD-28172 для Sa-dCas9-MQ1; или GD-28228 и GD-28172 для Sp-dCas9-KRAB и Sa-dCas9-MQ1) применяли для нацеливания репрессора экспрессии Sp-dCas9-KRAB, репрессора экспрессии Sa-dCas9-MQ1 или обоих на промоторную область гена $\beta 2M$, а эффекты на уровень экспрессии $\beta 2M$ отслеживали с помощью qPCR, а также с помощью проточной цитометрии (с применением флуоресцентного $\beta 2M$ для мониторинга уровня белка $\beta 2M$). mRNA, кодирующая репрессор(-ы) экспрессии и направляющую(-ие) РНК, доставляли в клетки в виде LNP в разных дозах и составах.

Клетки HepG2 высевали в 12-луночный планшет при плотности 330000 клеток/лунку в 1,5 мл RPMI (+10% FBS, +пен./стреп.). Клеткам давали возможность прикрепиться в течение 24 часов перед обработкой 1,25 мкг или 2,5 мкг РНК (весовое соотношение 1:1 mRNA:sgRNA) на каждую направляющую РНК в 1 мл среды. РНК доставляли с помощью LNP, составленной с помощью ионизируемого липида COATSOME SS-OP (NOF America). LNP составляли с помощью одной mRNA и одной направляющей, за исключением образцов, отмеченных как "составленные совместно", которые были получены с помощью двух направляющих, поддерживая такое же весовое соотношение mRNA: направляющая РНК. Клетки инкубировали с LNP в течение 72 часов, после чего клетки собирали для анализа способом FACS и анализа уровня mRNA способом qPCR.

Как видно из примера 2, отдельно dCas9, нацеленный на промотор гена $\beta 2M$, не снижал уровни mRNA $\beta 2M$. Sp-dCas9-KRAB или Sa-dCas9-MQ1 отдельно и Sp-dCas9-KRAB и Sa-dCas9-MQ1 вместе снижали уровни mRNA $\beta 2M$ (фигура 3). Обе дозы репрессоров экспрессии (отдельно или вместе), равные 1,25 мкг/мл и 2,5 мкг/мл, снижали уровень mRNA $\beta 2M$, при этом более высокая доза Sp-dCas9-KRAB, по-видимому, давала большее снижение, чем более низкая доза. Мониторинг уровней белка $\beta 2M$ с использованием FACS показал, что клетки, обработанные Sp-dCas9-KRAB или Sa-dCas9-MQ1, показали уменьшение популяции клеток с уровнем $\beta 2M$ белка, как в необработанных клетках, а также появление новой популяции клеток с уменьшенным уровнем $\beta 2M$ белка. Эти данные согласуются с данными примера 2, показывая, что применение системы репрессии экспрессии, включающей один или два репрессора экспрессии, снижает уровень экспрессии гена-мишени, и что отдельные репрессоры экспрессии также снижают уровни белка, кодируемого геном-мишенью.

Пример 4. Репрессия экспрессии $\beta 2M$ с течением времени.

Направляющую РНК (GD-28228 для Sp-dCas9 и Sp-dCas9-KRAB; GD-28172 для Sa-dCas9-MQ1; или GD-28228 и GD-28172 для Sp-dCas9-KRAB и Sa-dCas9-MQ1) из примера 1 применяли для нацеливания репрессора экспрессии Sp-dCas9-KRAB, репрессора экспрессии Sa-dCas9-MQ1 или обоих на промоторную область гена $\beta 2M$, а эффекты на уровень экспрессии $\beta 2M$ отслеживали с помощью qPCR. Клетки собрали в разные дни после трансфекции для извлечения общей РНК и проверки изменений уровня экспрессии.

Клетки K562 помещали в 24-луночный планшет и трансфицировали составом LNP на основе MC3, содержащем: mRNA dCas9 с направляющей РНК, нацеленной на $\beta 2M$, mRNA Sp-dCas9-KRAB с направляющей РНК, нацеленной на $\beta 2M$, mRNA Sa-dCas9-MQ1 с направляющей РНК, нацеленной на $\beta 2M$, или смесь mRNA Sp-dCas9-KRAB и Sa-dCas9-MQ1 с направляющими РНК, нацеленными на $\beta 2M$. Клетки собрали в разные дни после трансфекции для извлечения общей РНК и проверки изменений экспрессии в mRNA $\beta 2M$ (фигура 4). Пунктирные линии указывают на средние значения уровней mRNA $\beta 2M$ без обработки с течением времени (вверху) и средние значения снижения уровней mRNA $\beta 2M$ через 24 часа после трансфекции (внизу).

В течение 22-дневного периода в нетрансфицированных (синяя линия) и трансфицированных dCas9 клетках (красная линия) не меняется уровень экспрессии $\beta 2M$, тогда как клетки, трансфицированные Sp-dCas9-KRAB (зеленая линия) характеризуются более низкими уровнями mRNA $\beta 2M$ в первые дни после трансфекции, при этом максимальным эффект достигается в день 2, но репрессия теряется после дня 5. Клетки, трансфицированные Sa-dCas9-MQ1 (фиолетовая линия), показывают значительную реессию (до 85% в день 4) уровней mRNA $\beta 2M$ и репрессия сохраняется, но затем постепенно уменьшается, что видно по линии, оставшейся чуть ниже пунктирной линии в конце периода тестирования. Комбинированная трансфекция Sp-dCas9-KRAB и Sa-dCas9-MQ1 (оранжевая линия) не дала дополнительной реессии, чем то, что уже наблюдается при применении Sa-dCas9-MQ1 отдельно (фиолетовая линия).

Из этих данных видно, что применение системы реессии экспрессии, включающей один или два репрессора экспрессии, снижает уровень экспрессии гена-мишени. Отдельные репрессоры экспрессии, такие как содержащие MQ1, могут репрессировать экспрессию гена-мишени в течение продолжительного времени, а системы реессии экспрессии, содержащие более одного репрессора экспрессии, например один из которых представляет собой репрессор экспрессии, предусматривающий MQ1, могут также репрессировать экспрессию гена-мишени на длительный срок.

Пример 5. Длительная репрессия экспрессии B2M после метилирования промотора с помощью ДНК-метилтрансфераз

В этом примере показано метилирование промоторной области гена B2M с применением LNP, содержащих различные DNMT, а также LNP, содержащих направляющую РНК, нацеленную на слияния dCas9 с промоторной областью гена B2M, что вызывает длительную реессию экспрессии гена B2M.

Клетки K-562 высевали в 24-луночные планшеты при плотности 200000 клеток на лунку в 750 мкл питательной среды (RPMI+10% FBS+пен./стреп.). mRNA, кодирующие эффекторы, dCas9-MQ1 (SEQ ID NO: 33), dCas9-DNMT3a/3L (m) ("m" означает, что область 3a имеет последовательность человека, а область 3L имеет последовательность мыши) (SEQ ID NO:36), dCas9-DNMT3a/3L (h ("h" означает, что и область 3a, и область 3L имеют последовательности человека) (SEQ ID NO:35), dCas9-DNMT1 (SEQ ID NO: 35), и dCas9-DNMT3B составляли в липидах MC3 с применением прибора Precision NanoSystems NanoAssembler Spark. Одиночные направляющие РНК (sgRNA) под SEQ ID NO: 21 составляли с одними и теми же липидами в одном и том же приборе в разных составах. Стандартные значения концентрации LNP составляли 100 мкг/мл. Клетки обрабатывали с помощью LNP, инкапсулирующими mRNA, и LNP, инкапсулирующими sgRNA, в соотношении 1:1 при конечной концентрации липидов 1,25 мкг/мл, после чего их выдерживали в инкубаторе. Каждую комбинацию эффектора и направляющей РНК трансфицировали в четырех экземплярах. В разные моменты времени после трансфекции из клеток удаляли по 200 мкл и обрабатывали для выделения общей РНК и проверки

изменений уровня экспрессии, а также 200 мкл из клеток переносили в 550 мкл свежей среды. Эта процедура продолжалась до 18 дней после первоначальной трансфекции. РНК экстрагировали с применением наборов RNeasy 96 Plus (Qiagen), преобразовывали в cDNA с помощью LunaScript RT SuperMix (New England Biolabs) и применяли для RT-qPCR с применением специфических для B2M наборов проб и праймеров TaqMan и TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Данные представлены в качестве кратности изменения по сравнению с контролем без трансфекции с применением способа ddCT.

Из результатов видно, что все конструкции, описанные в этом примере, были способны репрессировать экспрессию B2M в диапазоне от приблизительно 35% до 60% через 4 дня после обработки по сравнению с необработанным образцом (фигура 5). Все конструкции были способны репрессировать B2M в диапазоне от приблизительно 15% до 30% по истечении 8 дней по сравнению с необработанным образцом. По истечении 13 дней все эффекторы были способны репрессировать экспрессию B2M на приблизительно 45-55%, а по истечении 18 дней все эффекторы были способны репрессировать экспрессию B2M на приблизительно 30-40% по сравнению с необработанным образцом (фигура 5).

Пример 6. Выявление устойчивых репрессоров или систем репрессии, которые снижают уровень экспрессию MYC путем нацеливания на участок CTCF, расположенный выше гена MYC в клетках K-562

В этом примере показано выявление отдельных репрессоров экспрессии или систем репрессии экспрессии, которые подавляют экспрессию MYC путем нацеливания на участок CTCF, расположенный выше гена MYC.

Клетки K-562 выращивали в 96-луночных планшетах при плотности 1×10^6 клеток/мл в 100 мкл питательной среды (RPMI+10% FBS+пен./стреп.). Пул sgRNA получали посредством смешивания GD-29639 (SEQ ID NO: 11) и GD-29640 (SEQ ID NO: 12) в соотношении 1:1. Планшет с эффекторами для репрессии готовили путем добавления 5 мкл mRNA, кодирующих эффекторы или комбинации эффекторов из таблицы 4, в каждую лунку. После добавления в каждой лунке присутствовало 17,5 нг каждой mRNA или комбинации mRNA. После посева планшеты с эффекторами хранили в замороженном виде до момента трансфекции.

Таблица 4. Перечень протестированных репрессоров экспрессии или систем репрессии экспрессии

	Репрессоры экспрессии или системы репрессии экспрессии
1	Без эффектора (необработанный)
2	dCas9
3	dCas9-DNMT1
4	dCas9-DNMT3B
5	G9A-dCas9

6	dCas9-MQ1
7	dCas9-HDAC8
8	dCas9-DNMT3a/3L (h)
9	dCas9-DNMT3a/3L (m)
10	EZH2-dCas9
11	dCas9-LSD1
12	dCas9-KRAB
13	EZH2-dCas9-KRAB
14	G9A-dCas9-KRAB
15	FOG1-dCas9- FOG1
16	dCas9-KRAB+FOG1-dCas9- FOG1
17	EZH2-dCas9-KRAB+dCas9-HDAC8
18	dCas9-LSD1+dCas9-HDAC8
19	G9A-dCas9-KRAB+EZH2-dCas9-KRAB
20	G9A-dCas9+dCas9-HDAC8
21	EZH2-dCas9+dCas9-HDAC8
22	dCas9-LSD1+G9A-dCas9-KRAB
23	dCas9-LSD1+EZH2-dCas9-KRAB
24	dCas9-LSD1+EZH2-dCas9
25	G9A-dCas9-KRAB+dCas9-HDAC8
26	G9A-dCas9+EZH2-dCas9
27	dCas9-MQ1+EZH2-dCas9-KRAB
28	dCas9-LSD1+G9A-dCas9
29	dCas9-MQ1+dCas9-HDAC8
30	dCas9-MQ1+G9A-dCas9-KRAB

Перед трансфекцией в каждую лунку добавляли 5 мкл пула sgRNA так, чтобы в каждой лунке присутствовало по 8,75 нг каждой sgRNA. Смесь эффекторной mRNA и sgRNA разбавляли средой Opti-MEM (Thermo Fisher) до общего объема 40 мкл в каждой лунке. Готовили мастер-смесь для трансфекции, содержащую Lipofectamine™ MessengerMAX™ (Thermo Fisher) и Opti-MEM в соотношении 0,3 мкл Lipofectamine™ MessengerMAX™ на 100 нг общей РНК, как описано в таблице 5. Непосредственно перед трансфекцией в каждую лунку, содержащую РНК, добавляли 35 мкл мастер-смеси для трансфекции, чтобы довести конечный объем до 75 мкл, смесь инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре и применяли для трансфекции клеток К-562. После трансфекции клетки инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в стандартном инкубаторе.

Таблица 5

Реагент	На лунку	На 96- луночный планшет	На 2 96- луночных планшета	На 4 96- луночных планшета
MessengerMax (мкл)	4,2	189	378	756
Optimem (мкл)	30,8	1386	2772	5544

Через 24 часа после трансфекции в каждую лунку добавляли по 100 мкл свежей среды. Сбор образцов начинали через 48 часов после трансфекции и продолжали до 6 дней. Образцы клеточной суспензии собирали через 48 часов, 72 часа и 144 часа. Каждый раз, когда образцы удаляли для анализа, добавляли эквивалентные объемы свежей среды и продолжали инкубацию. РНК экстрагировали с использованием наборов Rneasy[®] Plus 96 (Qiagen), преобразовывали в cDNA с помощью LunaScript[®] RT SuperMix (New England Biolabs) и применяли для RT-qPCR с использованием специфических для MYC наборов проб и праймеров Taqman с помощью Taqman[™] Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Данные были представлены в качестве кратности изменения по сравнению с контролем, обработанным dCas9, с применением способа ddCT. В качестве калибраторов применяли необработанные образцы и образцы dCas9.

Из эксперимента видно, что по меньшей мере клетки, обработанные dCas9-DNMT3a/3L (h), dCas9-KRAB, FOG1-dCas9-FOG1, G9A-dCas9+EZH2-dCas9, dCas9-MQ1+EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-LSD1+G9A-dCas9, dCas9-MQ1+dCas9-HDAC8 и dCas9-MQ1+G9A-dCas9-KRAB показали репрессию экспрессии MYC через 48 часов и/или 72 часа (фигура 6).

Пример 7. Выявление устойчивых репрессоров или систем репрессии, которые снижают уровень экспрессии β 2M путем нацеливания на область, расположенную выше сайта инициации транскрипции β 2M в клетках K-562

В этом примере показано выявление отдельных репрессоров экспрессии или систем репрессии экспрессии, которые подавляют экспрессию β 2M путем нацеливания на область, расположенную выше промотора гена β 2M.

Клетки K-562 выращивали в 96-луночных планшетах при плотности 1×10^6 клеток/мл в 100 мкл питательной среды (RPMI+10% FBS+пен./стреп.). Пул sgRNA получали посредством смешивания GD-27634 (SEQ ID NO: 13) и GD-29500 (SEQ ID NO: 14) в соотношении 1:1. Эффекторы, которые описаны в таблице X, и смесь пула sgRNA применяли для трансфекции клеток в соответствии с протоколом, описанным в примере 6. Образцы клеточной суспензии собирали через 48 часов, 72 часа, 144 часа, 192 часа и 240 часов и обрабатывали в соответствии с протоколом, описанным в примере 6. Данные были представлены в качестве кратности изменения по сравнению с контролем, обработанным dCas9, с применением способа ddCT. В качестве калибраторов применяли необработанные образцы и образцы dCas9.

Из данных видно, что по меньшей мере клетки, обработанные с помощью dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1, dCas9-MQ1, FOG1-dCas9- FOG1, G9A-dCas9-KRAB, dCas9-

DNMT3a/3L (h), G9A-dCas9, EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-KRAB, EZH2-dCas9-KRAB+dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1+EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-LSD1+dCas9-HDAC8, dCas9-KRAB+FOG1-dCas9- FOG1, dCas9-MQ1+G9A-dCas9-KRAB, G9A-dCas9+EZH2-dCas9, dCas9-MQ1+EZH2-dCas9-KRAB и dCas9-MQ1+dCas9-HDAC8, проявляли репрессию экспрессии $\beta 2M$ через 48 часов, 72 часа и/или 144 часа (фигура 7).

Пример 8. Выявление устойчивых репрессоров или систем репрессии, которые подавляют экспрессию гена HSPA1B путем нацеливания на область, расположенную ниже сайт инициации транскрипции гена HSPA1B в клетках K-562

В этом примере показано выявление отдельных репрессоров экспрессии или систем репрессии экспрессии, которые подавляют экспрессию HSPA1B путем нацеливания на область, расположенную ниже промотора гена HSPA1B.

Клетки K-562 выращивали в 96-луночных планшетах при плотности 1×10^6 клеток/мл в 100 мкл питательной среды (RPMI+10% FBS+пен./стреп.). Пул sgRNA получали посредством смешивания GD-29542 (SEQ ID NO: 17) и GD-29544 (SEQ ID NO: 18) в соотношении 1:1. Эффекторы, которые описаны в таблице 4, и смесь пула sgRNA применяли для трансфекции клеток в соответствии с протоколом, описанным в примере 6. Образцы клеточной суспензии собирали через 48 часов, 72 часа и 144 часа и обрабатывали в соответствии с протоколом, описанным в примере 6. Данные были представлены в качестве кратности изменения по сравнению с контролем, обработанным dCas9, с применением способа ddCT. В качестве калибраторов применяли необработанные образцы и образцы dCas9.

Данные показали, что по меньшей мере клетки, обработанные с помощью dCas9-HDAC8, EZH2-dCas9, dCas9-MQ1, dCas9-DNMT1, dCas9-DNMT3a/3L (h), dCas9-DNMT3a/3L (m), G9A-dCas9-KRAB, FOG1-dCas9-FOG1, G9A-dCas9, dCas9-KRAB, G9A-dCas9+dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1+G9A-dCas9-KRAB, dCas9-LSD1+EZH2-dCas9, G9A-dCas9+EZH2-dCas9, dCas9-LSD1+EZH2-dCas9-KRAB, EZH2-dCas9 +dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1+dCas9-HDAC8, dCas9-MQ1+EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-MQ1+dCas9-HDAC8, G9A-dCas9-KRAB+EZH2-dCas9-KRAB, dCas9-LSD1+G9A-dCas9 и dCas9-MQ1+G9A-dCas9-KRAB, проявляли репрессию экспрессии гена HSPA1B через 48 часов, 72 часа и/или 144 часа (фигура 8).

Пример 9. Выявление устойчивых репрессоров или систем репрессии, которые снижают уровень экспрессии гена GATA1 в клетках K-562

В этом примере показано выявление отдельных репрессоров экспрессии или систем репрессии экспрессии, которые подавляют экспрессию гена GATA1 в клетках K-562.

Клетки K-562 выращивали в 96-луночных планшетах при плотности 1×10^6 клеток/мл в 100 мкл питательной среды (RPMI+10% FBS+пен./стреп.). Пул sgRNA получали посредством смешивания GD-29536 (SEQ ID NO: 19) и GD-29693 (SEQ ID NO: 20) в соотношении 1:1. Эффекторы, которые описаны в таблице 4, и смесь пула sgRNA применяли для трансфекции клеток в соответствии с протоколом, описанным в примере 6.

Образцы клеточной суспензии собирали через 48 часов, 72 часа и 144 часа и обрабатывали в соответствии с протоколом, описанным в примере 6. Данные были представлены в качестве кратности изменения по сравнению с контролем, обработанным dCas9, с применением способа ddCT. В качестве калибраторов применяли необработанные образцы и образцы dCas9.

Из данных видно, что по меньшей мере клетки, обработанные с помощью dCas9-HDAC8, dCas9-LSD1+dCas9-HDAC8, dCas9-MQ1+dCas9-HDAC8, and G9A-dCas9+dCas9-HDAC8, проявляли репрессию экспрессии гена GATA1 через 48 часов, 72 часа и/или 144 часа (фигура 9).

Эквиваленты

Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано совместно с его подробным описанием, предшествующее описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Некоторые аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система репрессии экспрессии, содержащая
 - первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и первый домен репрессора, и
 - второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и второй домен репрессора,
 - где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с первой последовательностью ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается со второй последовательностью ДНК, отличающейся от первой последовательности ДНК, и
 - где первый домен репрессора отличается от второго домена репрессора.
2. Система репрессии экспрессии, содержащая
 - первый репрессор экспрессии, содержащий первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и первый домен репрессора, и
 - второй репрессор экспрессии, содержащий вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, и второй домен репрессора,
 - где первый или второй домен репрессора предусматривает домен MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент,
 - где первый домен репрессора отличается от второго домена репрессора.
3. Система репрессии экспрессии по п. 2, где
 - первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с первой последовательностью ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается со второй последовательностью ДНК, отличающейся от первой последовательности ДНК, или
 - первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связываются с одной и той же последовательностью ДНК.
4. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-3,
 - где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает первую молекулу CRISPR/Cas, содержащую первый белок CRISPR/Cas и первую направляющую РНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает вторую молекулу CRISPR/Cas, содержащую второй белок CRISPR/Cas и вторую направляющую РНК.
5. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-4,
 - где первый белок CRISPR/Cas содержит другую аминокислотную последовательность, нежели второй белок CRISPR/Cas.
6. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-5, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

7. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-6, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает первую молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает вторую молекулу CRISPR/Cas, содержащую отличающийся белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

8. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-7, где первый или второй домен репрессора характеризуются гистонметилтрансферазной активностью (например, белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2 или функционального варианта или фрагмента любого из них, например домен SET любого из них), гистондеметиلاзной активностью (например, белок, выбранный из KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66 или функционального варианта или фрагмента любого из них), гистондеацетилазной активностью (например, белок, выбранный из HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9 или функционального варианта или фрагмента любого из них), ДНК-метилтрансферазной активностью (например, белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L или функционального варианта или фрагмента любого из них) или активностью репрессора транскрипции (например, белок, выбранный из KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функционального варианта или фрагмента любого из них).

9. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-8, где первый домен репрессора предусматривает белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент, и

второй домен репрессора предусматривает другой белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2,

DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, или его функциональный вариант или фрагмент.

10. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-9, где первый домен репрессора предусматривает KRAB, и второй домен репрессора предусматривает DNMT3A (например, человеческий DNMT3A).

11. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-9, где первый домен репрессора предусматривает KRAB, и второй домен репрессора предусматривает бактериальный MQ1.

12. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-11, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, выбрана из эффекторной молекулы TAL, молекулы CRISPR/Cas, домена по типу "цинкового пальца», домена tetR, мегануклеазы или олигонуклеотида.

13. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-12, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas (например, который представляет собой или предусматривает белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них), и направляющую РНК.

14. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-13, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas, который представляет собой или предусматривает белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них, и

вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает молекулу CRISPR/Cas, содержащую отличающийся белок CRISPR/Cas, который представляет собой или предусматривает белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

15. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-14, где первая или вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, специфически связывается с

промоторной последовательностью или ДНК, проксимальной по отношению к промоторной последовательности, например промоторной последовательности, функционально связанной с геном-мишенью;

энхансерной последовательностью или ДНК, проксимальной по отношению к энхансерной последовательности, например энхансерной последовательности, которая влияет на уровень экспрессии гена-мишени и/или функционально связана с ним;

геном-мишенью, например последовательностью, расположенной между сайтом инициации и стоп-кодоном транскрипции гена-мишени;

сайтом инициации транскрипции гена-мишени;

интроном, например сайтом сплайсинга, ассоциированным с интроном, гена-мишени; или

экзоном гена-мишени.

16. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-15, где первая последовательность ДНК представляет собой первый сайт, расположенный в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему, и вторая последовательность ДНК представляет собой второй сайт, расположенный в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью, или проксимально по отношению к нему.

17. Система репрессии экспрессии по любому пп. 1-16, где расстояние между первой последовательностью ДНК и второй последовательностью ДНК составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 пар оснований или любую величину между этими значениями, например 20-500 пар оснований.

18. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-17, где расстояние между первой последовательностью ДНК и второй последовательностью ДНК составляет не более чем 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 пар оснований или любую величину между этими значениями, например 20-500 пар оснований.

19. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-18, где ген-мишень представляет собой β -2-микроглобулин, MYC, HSPA1B, GATA1, APOB, FOXP3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, и/или CXCL8.

20. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-19, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, не связывается в значительной степени со второй последовательностью ДНК, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, не связывается в значительной степени с первой последовательностью ДНК, например, где первая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывает вторую последовательность ДНК с K_D , составляющей по меньшей мере 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 5000, 10000 или 100000 нМ, и вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывает первую последовательность ДНК с K_D , составляющей по меньшей мере 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 5000, 10000 или 100000 нМ.

21. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-20, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и/или связывание второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК снижает в клетке уровень экспрессии гена-мишени, например гена-мишени, функционально связанного с первой и/или второй последовательностью ДНК, например, на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в отсутствие первого и/или второго репрессора экспрессии.

22. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-21, где связывание первого и/или второго репрессора экспрессии с первой и/или второй последовательностью ДНК в значительной степени снижает уровень экспрессии гена-мишени, например гена-мишени, функционально связанного с первой и/или второй последовательностью ДНК, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

23. Система репрессии экспрессии по любому из п. 21 или п. 22, где уровень экспрессии снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в отсутствие первого и второго репрессоров экспрессии, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

24. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 21-23, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК в значительной степени снижает уровень экспрессии гена-мишени, например гена-мишени, функционально связанного с первой последовательностью ДНК, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

25. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 21-24, где снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК больше, чем снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК или связывания второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК по отдельности.

26. Система репрессии экспрессии по п. 25, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК снижает уровень экспрессии в 1,05х (т. е. в 1,05 раза), 1,1х, 1,15х, 1,2х, 1,25х, 1,3х, 1,35х, 1,4х, 1,45х, 1,5х, 1,6х, 1,7х, 1,8х, 1,9х, 2х, 3х, 4х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 20х, 50х или 100х больше, чем либо связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК, либо связывание второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК по отдельности, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

27. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 21-26, где снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК сохраняется в течение более длительного периода времени

(например, большего количества часов, дней или клеточных делений), чем снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК или связывания второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК по отдельности.

28. Система репрессии экспрессии по п. 27, где связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК и второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК снижает уровень экспрессии в 1,05х (т. е. в 1,05 раза), 1,1х, 1,15х, 1,2х, 1,25х, 1,3х, 1,35х, 1,4х, 1,45х, 1,5х, 1,6х, 1,7х, 1,8х, 1,9х, 2х, 3х, 4х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 20х, 50х или 100х больше (например, при измерении в часах, днях или клеточных делениях), чем либо связывание первого репрессора экспрессии с первой последовательностью ДНК, либо связывание второго репрессора экспрессии со второй последовательностью ДНК по отдельности, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

29. Система репрессии экспрессии по любому из пп. 1-28, где
 первый репрессор экспрессии содержит первую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, предусматривающую молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas *S. pyogenes*, выбранный из таблицы 1, или его вариант (например, мутантный), например dCas9 *S. pyogenes*, и первый домен репрессора, предусматривающий KRAB или его функциональный вариант или фрагмент; и

второй репрессор экспрессии содержит вторую функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК, предусматривающую молекулу CRISPR/Cas, содержащую белок CRISPR/Cas *S. aureus*, выбранный из таблицы 1, или его вариант (например, мутантный), например dCas9 *S. aureus*, и второй домен репрессора, предусматривающий бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

30. Полипептид, содержащий
 функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК; и
 домен репрессора, предусматривающий бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

31. Нуклеиновая кислота, кодирующая
 первый репрессор экспрессии,
 второй репрессор экспрессии,
 систему репрессии экспрессии (например, первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии) или полипептид по любому из пп. 1-30.

32. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 31.

33. Клетка, содержащая систему репрессии экспрессии, нуклеиновую кислоту, вектор или полипептид по любому из пп. 1-32.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая систему репрессии экспрессии, нуклеиновую кислоту, полипептид или вектор по любому из пп. 1-32 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.

35. Способ снижения уровня экспрессии геномной последовательности-мишени в

клетке, включающий

обеспечение системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты, полипептида, фармацевтической композиции или вектора по любому из пп. 1-32 или п. 34; и

приведение клетки в контакт с системой репрессии экспрессии, нуклеиновой кислотой, полипептидом, фармацевтической композицией или вектором,

со снижением таким образом уровня экспрессии геномной последовательности-мишени.

36. Способ эпигенетического модифицирования геномной последовательности-мишени в клетке, включающий

обеспечение системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты, полипептида, фармацевтической композиции или вектора по любому из пп. 1-32 или п. 34; и

приведение клетки в контакт с системой репрессии экспрессии, нуклеиновой кислотой, вектором, полипептидом или фармацевтической композицией,

с модифицированием эпигенетически таким образом геномной последовательности-мишени.

37. Способ по любому из п. 35 или п. 36, где геномная последовательность-мишень представляет собой

ген-мишень (например, сайт в пределах гена-мишени, например экзон, интрон или сайт сплайсинга), например ген, кодирующий β -2-микроглобулин (β 2M),

элемент контроля транскрипции, функционально связанный с геном-мишенью, или якорную последовательность, проксимальную по отношению к гену-мишени или ассоциированную с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью.

38. Способ по любому из пп. 35-37, где уровень экспрессии

снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в остальном аналогичной клетки в отсутствие системы репрессии экспрессии; и/или

снижается в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA или как описано в примерах 2-4.

39. Способ по любому из пп. 35-38, где снижение уровня экспрессии предусматривает снижение

уровня РНК, например mRNA, кодируемой геном-мишенью; и/или

уровня белка, кодируемого геном-мишенью.

40. Способ по любому из пп. 35-39, где обеспечение предусматривает

приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, например вектором, кодирующим систему репрессии экспрессии, направленную на клетку, содержащую ген-мишень; или

приведение клетки в контакт с липидной наночастицей (LNP), содержащей систему

репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту, например вектор, кодирующий систему репрессии экспрессии.

41. Способ лечения состояния, ассоциированного с чрезмерной экспрессией или нарушением регуляции гена-мишени у субъекта, включающий

введение субъекту системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты, полипептида, фармацевтической композиции или вектора по любому из пп. 1-32 или п. 34, с обеспечением таким образом лечения у субъекта состояния, ассоциированного с чрезмерной экспрессией гена-мишени.

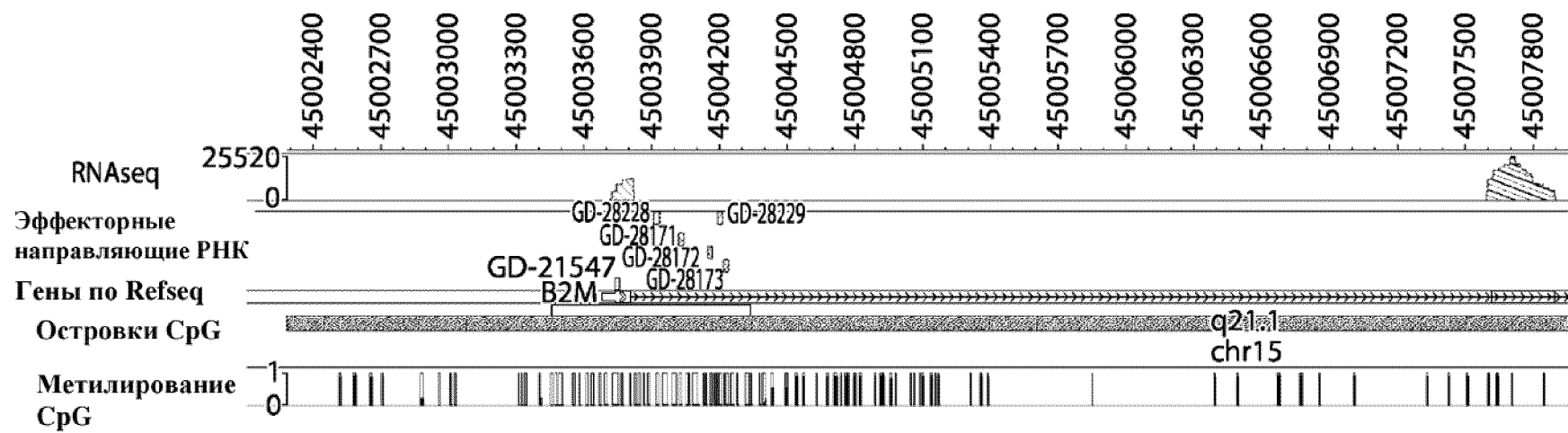
42. Способ получения клетки, содержащей систему репрессии экспрессии, включающий

обеспечение системы репрессии экспрессии, нуклеиновой кислоты, фармацевтической композиции или вектора по любому из пп. 1-29, 31, 32 или п. 34; и

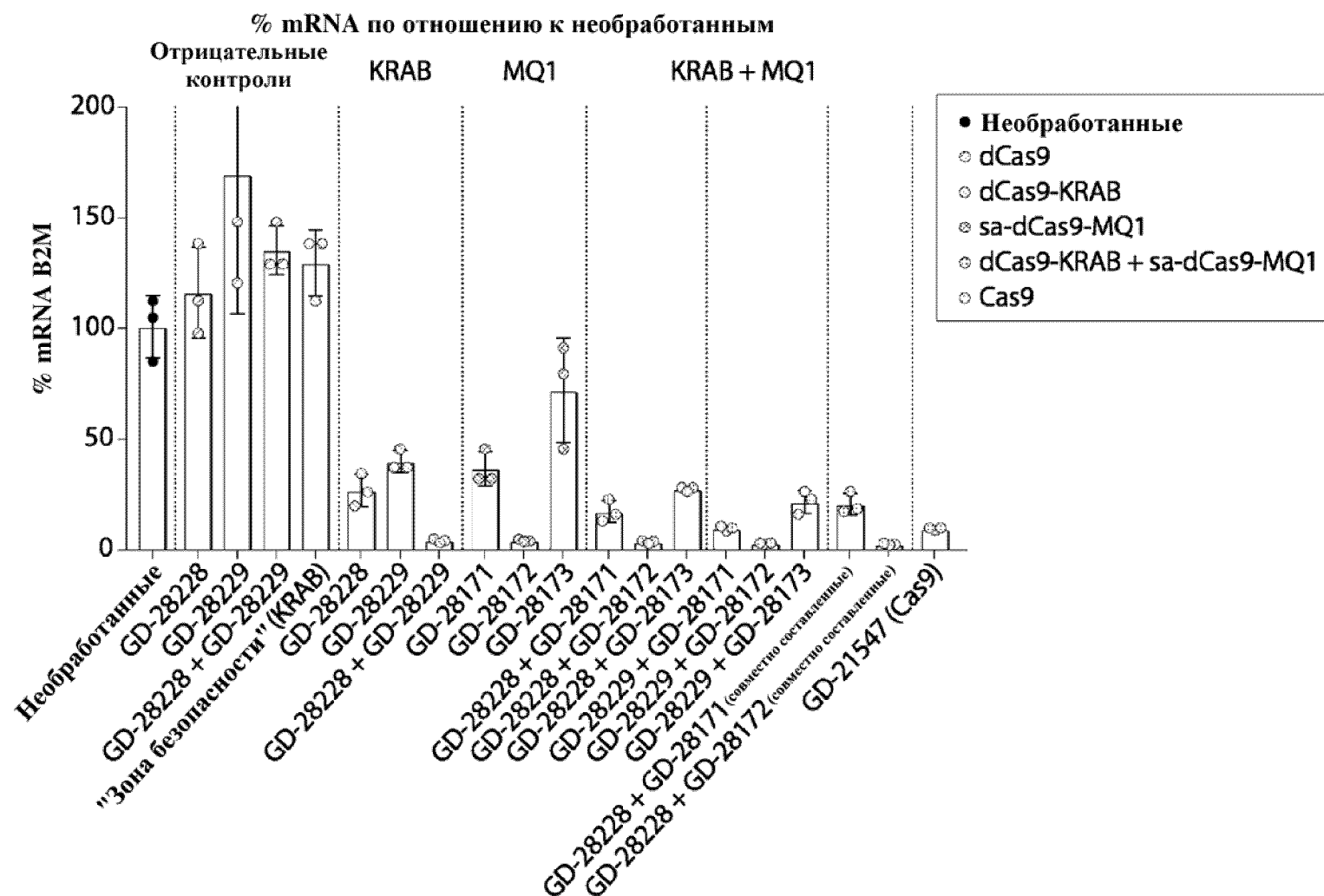
приведение клетки в контакт с системой репрессии экспрессии, нуклеиновой кислотой, вектором или фармацевтической композицией,

с получением таким образом клетки, содержащей систему репрессии экспрессии.

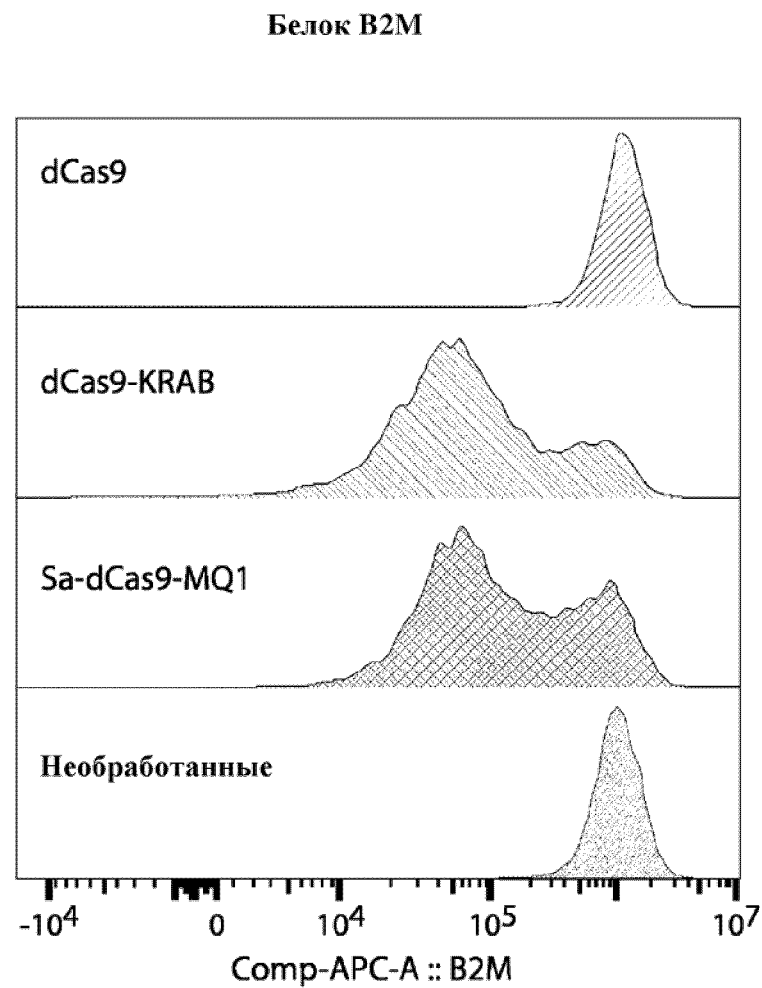
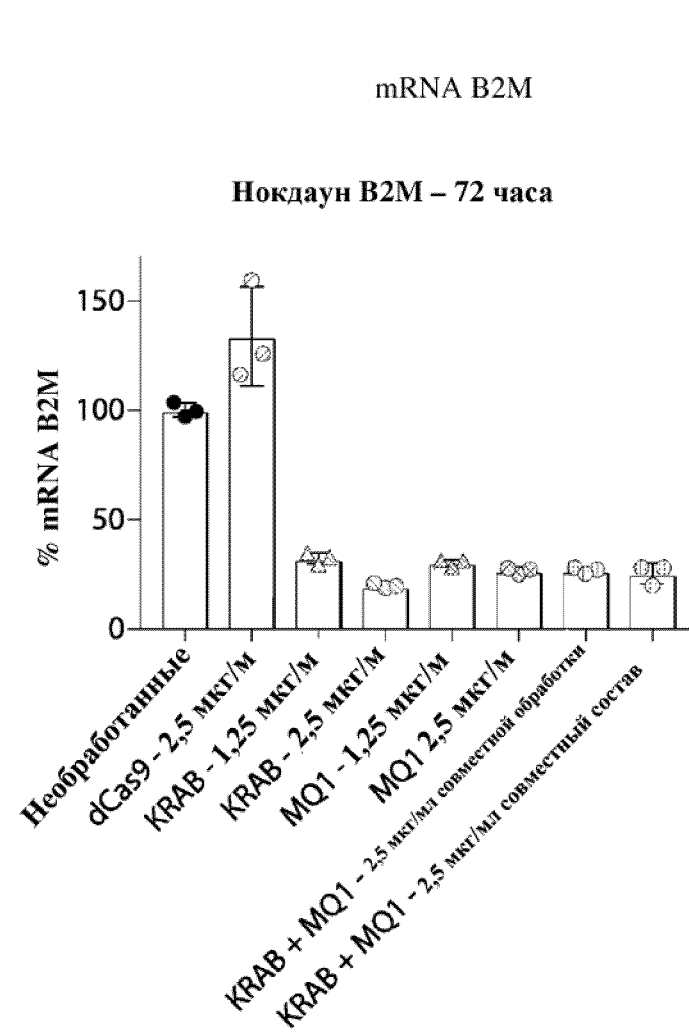
По доверенности



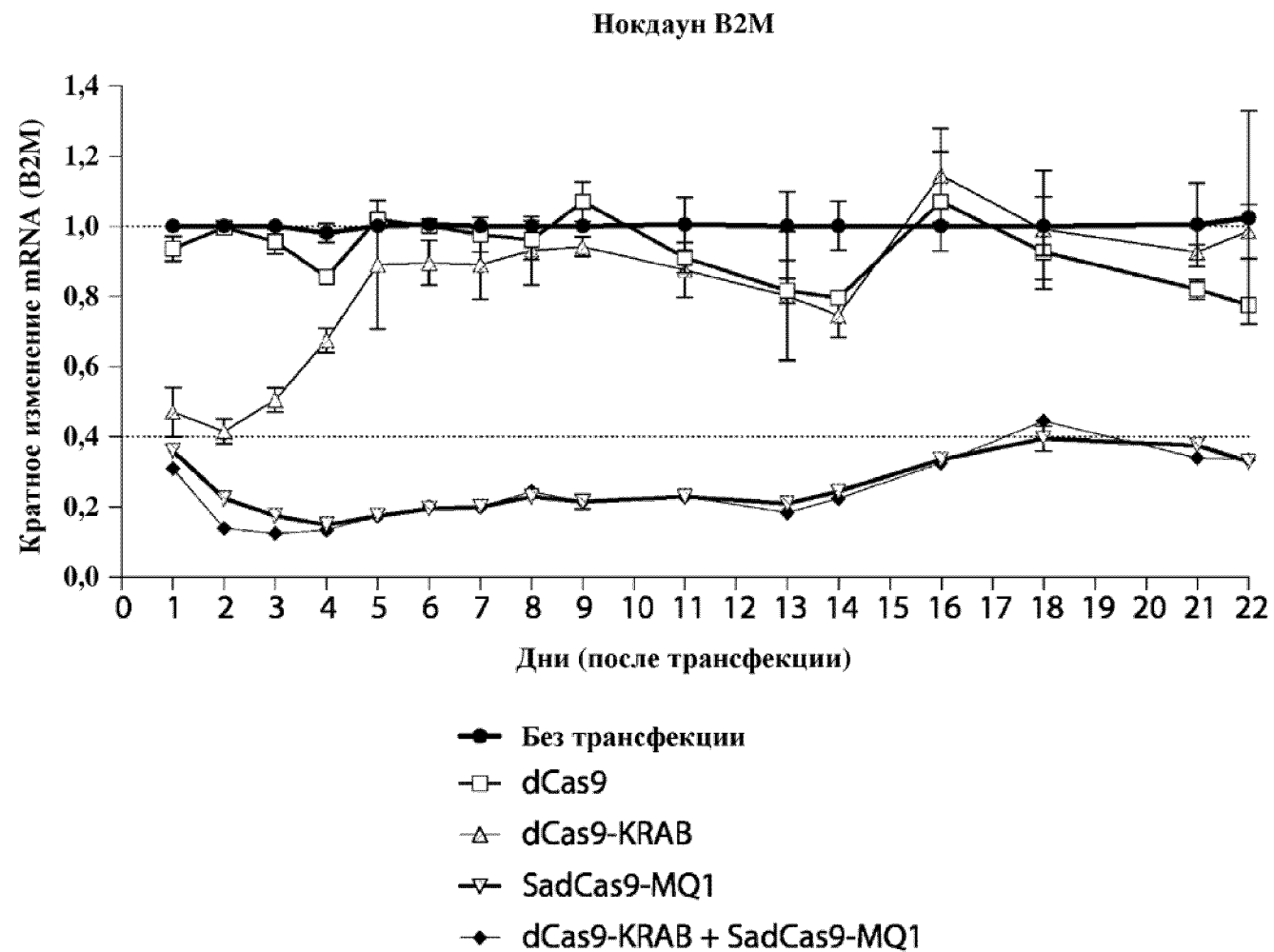
Фиг. 1



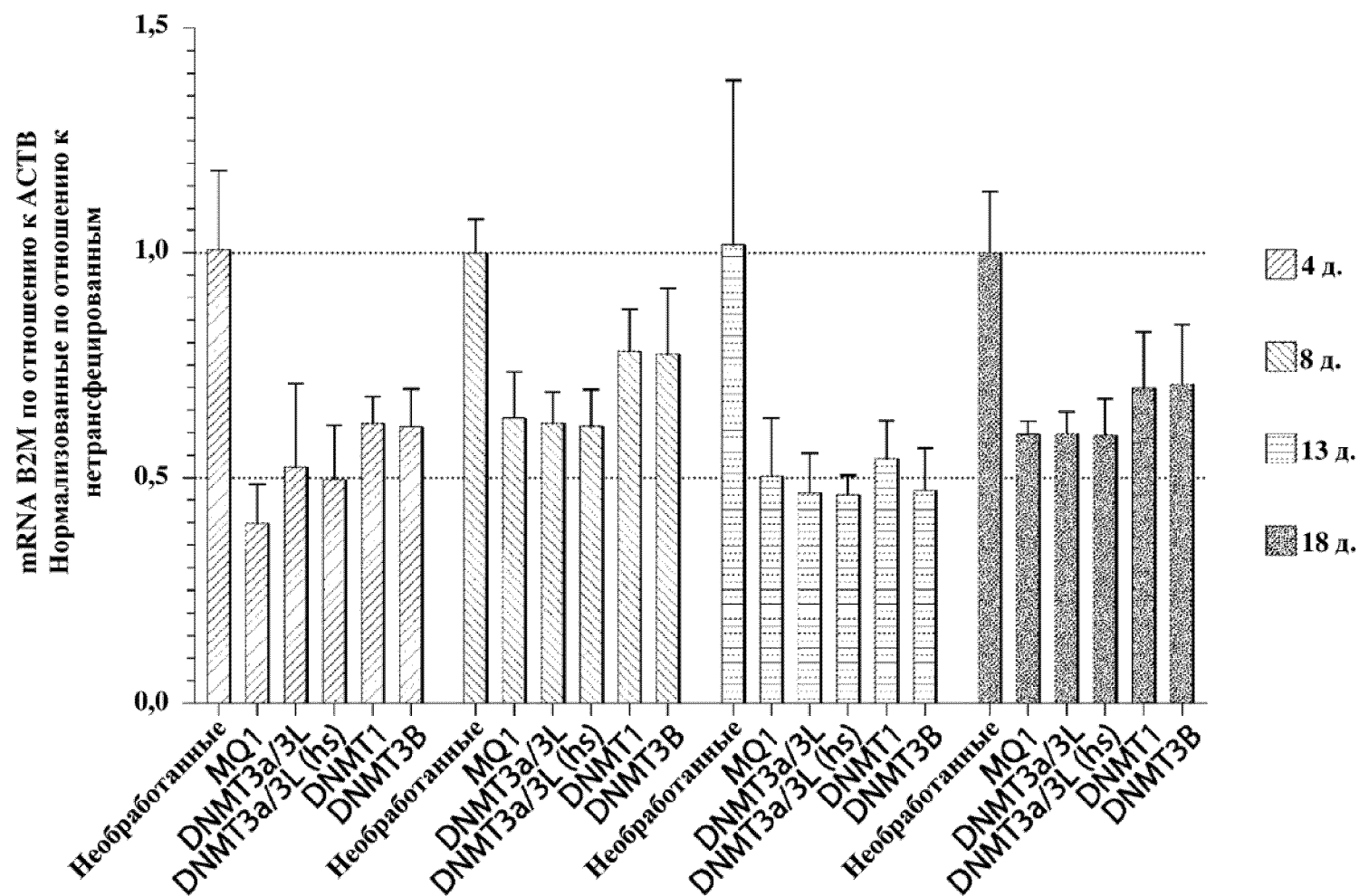
Фиг. 2



Фиг. 3

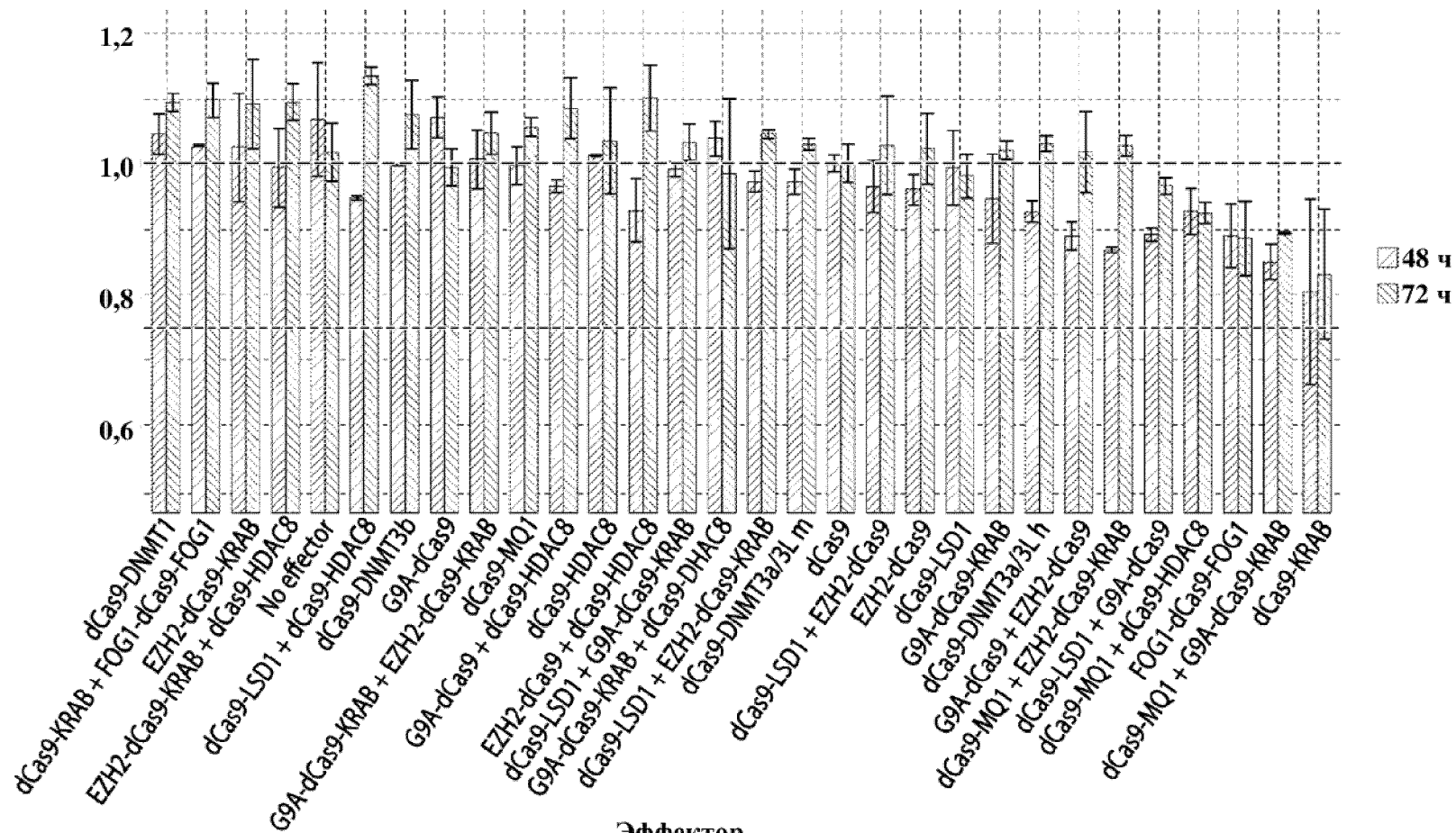


Фиг. 4



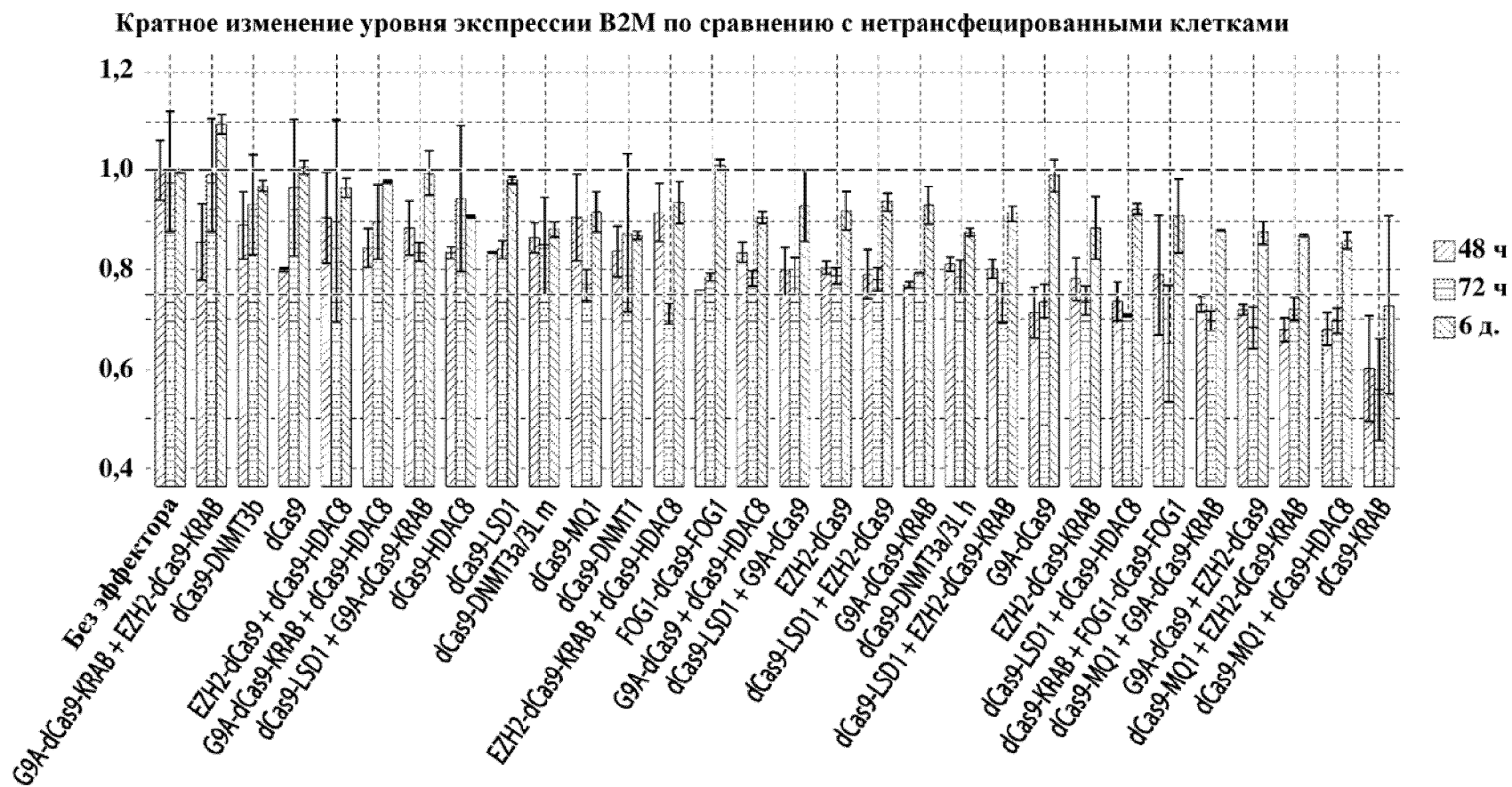
Фиг. 5

Кратное изменение уровня экспрессии MYC по сравнению с клетками, обработанными dCas9
Направляющие РНК, расположенные выше MYC - Репрессия



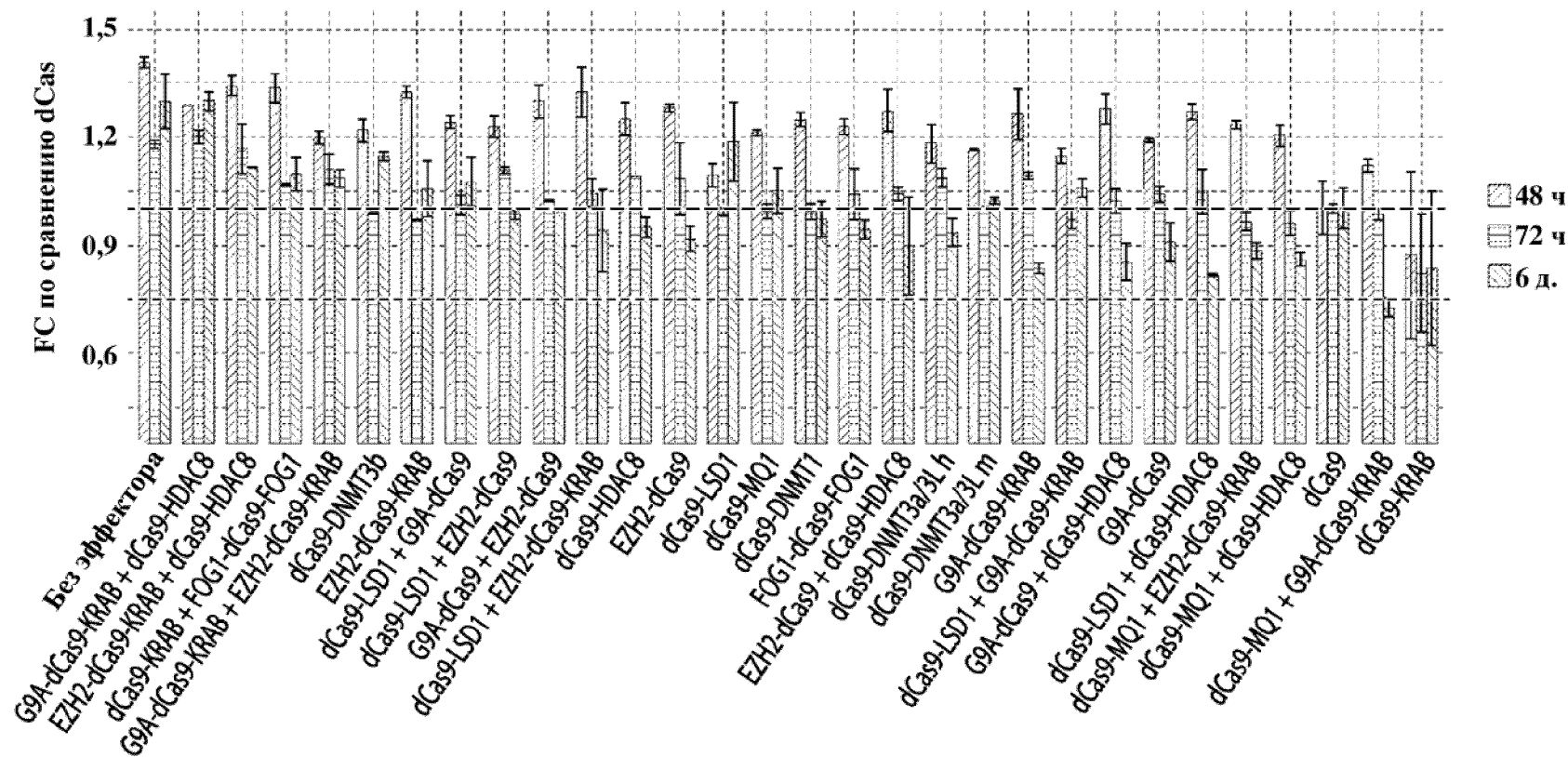
Эффектор

Фиг. 6



Фиг. 7

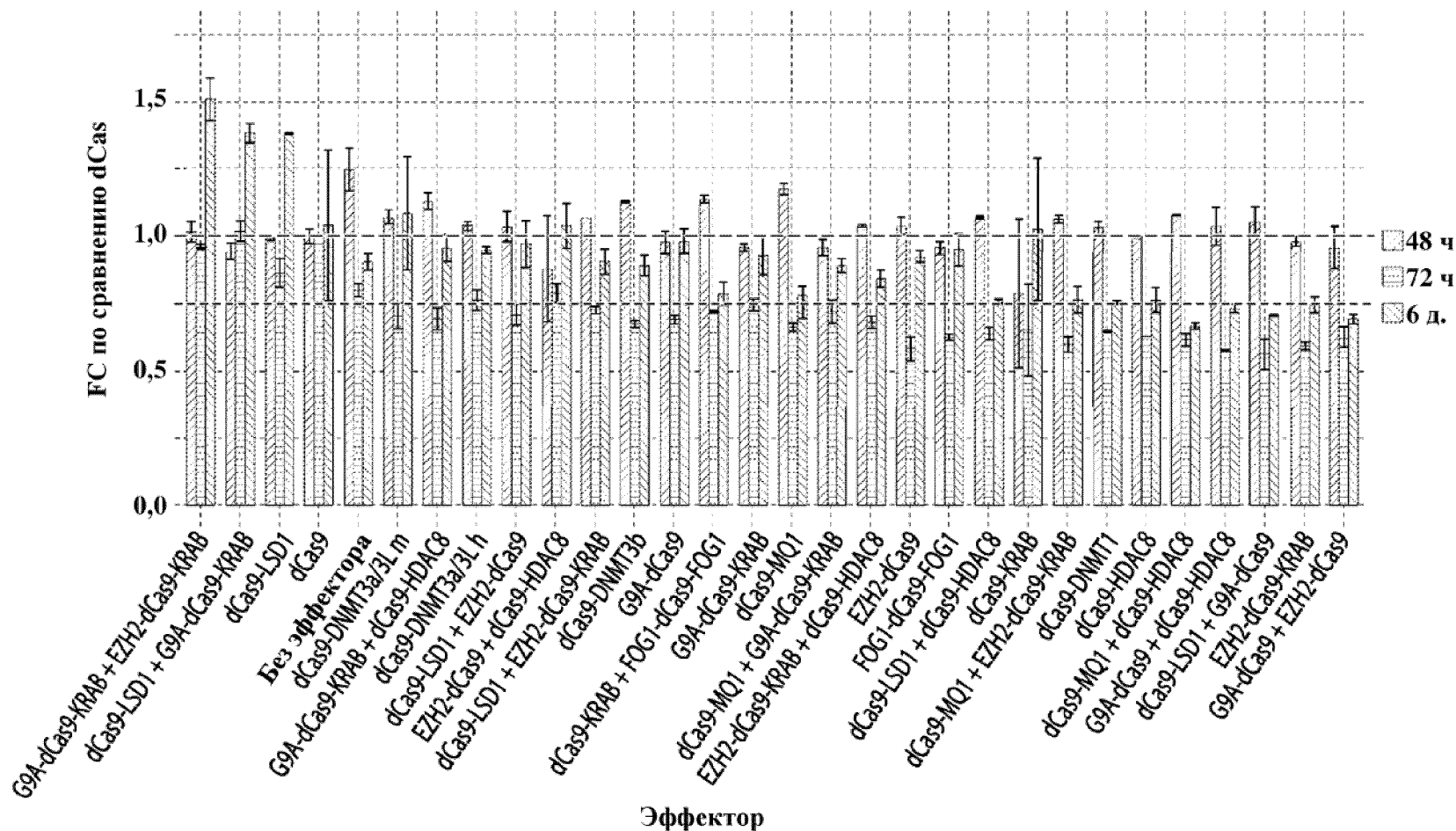
Кратное изменение уровня экспрессии HSPA1B по сравнению с клетками, обработанными dCas9
Направляющие РНК, расположенные ниже HSPA1B - Репрессия



Эффектор

Фиг. 8

Направляющие РНК, расположенные выше GATA1 - Репрессия



Фиг. 9